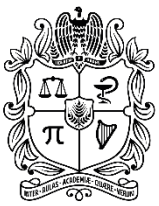

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

CELSR en los procesos de polaridad en una línea celular de cáncer de seno

Andrés Felipe Correa Sánchez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2020

CELSR en los procesos de polaridad en una línea celular de cáncer de seno

Andrés Felipe Correa Sánchez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora:

Yadi Adriana Umaña Pérez
Química MSc Doctor en Ciencias

Línea de Investigación:

Factores de crecimiento, diferenciación y cáncer

Grupo de Investigación en Hormonas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2020

A mi esposo, por ser mi apoyo incondicional y mi más grande motivación.

Declaración de obra original

Yo Andrés Felipe Correa Sánchez declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

_____

Andrés Felipe Correa Sánchez

Fecha 19/08/2020

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, en especial a la Maestría en Ciencias-Bioquímica por permitir mi desarrollo académico.

A la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología-FPIT del Banco de la república por la financiación a través del proyecto 4428.

Al grupo de investigación en Hormonas por ser el lugar en dónde pude desarrollar mis habilidades científicas, en dónde conocí gente con muchos talentos y capacidades, en donde hice amigos y compartí muy buenos momentos.

Al profesor Mauricio Urquiza por sus consejos y recomendaciones.

A la profesora Adriana Umaña por dirigir este trabajo, por su dedicación y por su paciencia.

A mi madre por su amor y sus sabios consejos. A toda mi familia por su apoyo y comprensión.

A mi amado esposo, gracias por ser mi apoyo incondicional, por confiar en mí, por ser quien siempre tuvo las palabras indicadas en los momentos difíciles, por alegrar mis días y brindarme amor.

Resumen

CELSR en los procesos de polaridad en una línea celular de cáncer de seno

Las cadherinas son una superfamilia de moléculas de adhesión con funciones en reconocimiento celular, morfogénesis tisular y supresión tumoral. A esta familia pertenece un subgrupo de receptores de adhesión acoplados a proteína G, que contienen repeticiones de cadherina en su N-terminal, las cadherinas EGF LAG seven pass G-type receptor o CELSR. De estas cadherinas no clásicas existen 3 miembros (CELSR 1 a 3), y están involucradas en mecanismos de polaridad celular por activación de la vía de señalización Wnt no canónica en el tejido epitelial. Recientemente, estas cadherinas se encontraron en el tejido hematopoyético, aunque su implicación funcional aún no es clara. Debido a la importancia que tienen las moléculas de adhesión en la promoción de los procesos migratorios en cáncer, este trabajo se centró en identificar la presencia de los miembros de la familia CELSR en la línea epitelial derivada de cáncer de seno MCF-7 y en las líneas celulares de leucemia linfoide aguda Jurkat y CCRF-CEM y evaluar su implicación funcional. Se encontró un mayor nivel de expresión de las cadherinas en la línea celular MCF-7 en comparación con líneas de leucemia. El silenciamiento triple de CELSR 1, 2 y 3, en MCF-7, disminuyó la migración celular en respuesta a la activación de la vía de señalización Wnt no canónica disminuyendo a su vez, la producción de diacilglicerol sin alterar la viabilidad ni la proliferación celular.

Palabras clave: Polaridad celular, cadherinas, cáncer de seno, señalización celular, migración, Wnt.

Abstract

CELSR in polarity processes in a breast cancer cell line

Cadherins are a superfamily of adhesion molecules with functions in cell recognition, tissue morphogenesis and tumour suppression. Among the members of this family, there is a subgroup of adhesion receptors coupled to G protein, that contain cadherin repeats on their N-terminus, called EGF LAG seven-pass G- typed receptor or CELSR. Three types of non-classical cadherins exist (CELSR 1,2 and 3), and they are involved in the mechanism of cell polarity by activation of the non-canonical Wnt signalling pathway in the epithelial tissue.

Recently, these cadherins have been found in the hematopoietic tissue, but their functional role is not clear. Due to the importance of adhesion molecules to promote migration processes in cancer, we studied the presence of CELSR family in an epithelial cell line derived from breast cancer MCF-7 and in cell lines from acute lymphoid leukaemia Jurkat and CCRF-CEM to evaluate functional involvement. A high expression level of the CELSR receptor was found in the MCF-7 cell line in comparison to the epithelial cell lines. Triple silencing of CELSR 1, 2 and 3 in MCF-7 decreased cell migration in response to the activation to the non-canonical Wnt signalling pathway, decreased of production of diacylglycerol was also seen without altering proliferation and cell viability.

Keywords: Cell polarity, cadherins, breast cancer, Cell signalling, migration, Wnt.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XIV**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XV**

Introducción **1**

1. Marco teórico **3**
1.1 Polaridad celular y sus elementos básicos 3
1.2 Vía de señalización Wnt 5
1.3 Cadherinas y polaridad celular 7
1.4 CELSR 8
1.5 Cáncer de seno y polaridad celular planar 11

2. Objetivos **13**
2.1 Objetivo general 13
2.2 Objetivos específicos 13

3. Metodología **15**
3.1 Cultivo de líneas celulares 15
3.2 Extracción de linfocitos de sangre periférica 16
3.3 Determinación de la presencia de CELSR en líneas celulares 16
3.3.1 Extracción de RNA 16
3.3.2 Transcripción reversa 17
3.3.3 Diseño de primers 17
3.3.4 Ensayos de expresión génica 17
3.3.5 Silenciamiento de los genes de CELSR en una línea celular de cáncer de seno 18
3.4 Ensayos funcionales 19
3.4.1 Ensayo de migración celular 19
3.4.2 Ensayo de actividad metabólica 19
3.4.3 Ensayo de proliferación 20
3.4.4 Cuantificación de diacilglicerol (DAG) 20

4. Resultados y discusión **23**
4.1 Expresión de CELSR en las líneas celulares 23
4.2 Silenciamiento génico para CELSR 1, 2 y 3 26

4.3 Ensayos funcionales 27
4.3.1 Ensayo de migración celular 27
4.3.2 Ensayo de actividad metabólica 30
4.3.3 Ensayos de proliferación 32
4.3.4 Cuantificación de diacilglicerol 34

5. Conclusiones y recomendaciones 37
5.1 Conclusiones 37
5.2 Recomendaciones 37

A. Anexo: Condiciones para determinar la expresión de CELSR 1-3 por qPCR 39

B. Anexo: Resultados de la cuantificación de diacilglicerol 43

Bibliografía 45

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1 Esquema de la polaridad en células epiteliales 4
Figura 1-2 Activación de la vía de señalización Wnt canónica 6
Figura 1-3 Activación de las vías de señalización Wnt no canónicas 7
Figura 1-4 Estructura general de los CELSR..... 9
Figura 1-5 Interacción homofílica entre CELSR y colocalización con Frizzled y Vangl 9
Figura 4-1 Expresión génica de CELSR 1, 2 y 3 en líneas celulares..... 24
Figura 4-2 Expresión de los genes de CELSR 1, 2 y 3 en MCF-7 en respuesta al silenciamiento 26
Figura 4-3 Efecto del silenciamiento de CELSR 1,2 y 3 en la migración celular de MCF-7 28
Figura 4-4 Efecto del silenciamiento de CELSR 1,2 y 3 en la actividad metabólica de MCF-7 31
Figura 4-5 Efecto del silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3 en la proliferación de MCF-7 33
Figura 4-6 Efecto del silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3 en la cantidad de diacilglicerol en el sobrenadante de la línea MCF-7 35
Figura 4-7 Efecto del silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3 en la cantidad de diacilglicerol en el lisado de la línea MCF-7. 35

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1 *Primers* diseñados para determinar la expresión de transcritos de CELSR 17
Tabla 3-2 Temperatura de anillamiento para los *primers* de CELSR 18

Lista de Símbolos y abreviaturas

aPKC	Proteína quinasa C atípica
CELSR	*Cadherinas EGF LAG seven pass G-type receptor*
Dgo	Diego
Dsh/Dvl	*Dishevelled*
EGF	Factor de crecimiento epidermal
Fmi	Flamingo
Fz	*Frizzled*
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
JNK	Quinasa N-terminal c-Jun
LLA	Leucemia linfoide aguda
PCP	Polaridad celular planar
Pk	*Prickle*
PLC	Fosfolipasa C
SFB	Suero fetal bovino
DAG	Diacilglicerol

Introducción

El estudio de la polaridad celular ha surgido como una alternativa interesante para analizar el comportamiento de células en procesos como la adhesión, migración, invasión, la alteración de vías de señalización, entre otros [1]. Regulando este tipo de eventos se encuentran distintas biomoléculas, entre ellas resaltan las cadherinas, las cuales se han encontrado alteradas en muchos tipos de cáncer, siendo asociadas a diferencias significativas en eventos mediados por polaridad celular, como lo son la migración, invasión y proliferación, por lo que se vislumbran como moléculas con un alto potencial de estudio [2].

Dentro de la familia de cadherinas se encuentran las cadherinas EGF LAG seven pass G-type receptor (CELSR), las cuales pertenecen a la subfamilia Flamingo y se encuentran involucradas con desarrollo neuronal, trastornos motores, movilidad celular, entre otros [3]. Adicionalmente, se ha reportado que los genes de CELSR se encuentran alterados en condiciones de cáncer [4]. Sin embargo, son escasos los estudios funcionales asociados al receptor y a esta patología, y es probable que la pérdida de su función o la disminución de su expresión, se encuentren relacionados con la alteración del desarrollo y la migración en células cancerosas.

La vía de señalización Wnt es una de las más importantes en procesos de polarización celular y allí se han visto identificadas proteínas como CELSR actuando en conjunto con otros factores como Frizzled y Van Gogh, mediante vías no canónicas [2]. Dichas proteínas y su acción mediante la vía Wnt se han estudiado principalmente en células epiteliales y neuronales. Sin embargo, los estudios en células cancerosas son escasos y su relevancia no es del todo clara, razón por la cual el estudio de esta vía de señalización resulta de gran interés científico en la actualidad.

El cáncer de seno es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia a nivel mundial [5]. Esto ha generado que muchos estudios se enfoquen en los mecanismos moleculares que pueden dar origen a esta patología y en los que se generan durante la progresión de la enfermedad [6]. Algunos estudios han mostrado la relevancia que tienen los mecanismos de polaridad celular en el desarrollo de la patología [7,8]. Sin embargo, la asociación de los CELSR en dichos mecanismos de polaridad aún no es clara.

Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio buscó indagar en el papel que las CELSR cumplen en células cancerosas, utilizando como modelo una línea celular de cáncer de seno e identificando si este tipo de biomoléculas presentan las mismas características y funcionalidad que el que presentan en el desarrollo de tejidos en modelos murinos y en moscas, en donde se ha caracterizado la activación de la vía de señalización Wnt no canónica [2].

En este orden de ideas, este estudio permitió identificar la presencia de las CELSR en líneas celulares de cáncer y se realizó silenciamiento en una línea celular cuya expresión de CELSR, permitiera correlacionar la expresión del receptor y los efectos derivados de la inducción de mecanismos de polaridad celular, contribuyendo así con las investigaciones emergentes en la alteración de la polaridad celular en cáncer.

1. Marco teórico

1.1 Polaridad celular y sus elementos básicos

La polaridad celular es una característica intrínseca que comparten todas las células animales que les confieren propiedades que controlan la localización y distribución de una variedad de proteínas de membrana, organelos y componentes citoesqueléticos [9]. El control apropiado de esta condición de asimetría permite que la célula realice adecuadamente sus funciones fisiológicas tal como se ve en los conductos del revestimiento de células epiteliales, los cuales cuando se encuentran bien polarizados, son vitales para establecer y mantener una función de barrera, que restringe la permeabilidad celular de fluidos, solutos, células y patógenos a través de la capa de células epiteliales hacia el intersticio del tejido [4]. Para entender estos procesos de polaridad celular, se ha tomado como referencia los modelos de células epiteliales dónde se diferencian claramente dos tipos de polaridad: apical-basal y planar [10].

La polaridad celular apical-basal puede entenderse como la distribución asimétrica en torno a dos superficies. La primera superficie será aquella que se encuentra en contacto con el exterior o con el lumen de un órgano y se llamará apical. La segunda superficie será aquella que se encuentra en contacto con las células vecinas y con la lámina basal y se llamará basal [9], tal como se muestra en la figura 1-1A. Este tipo de polaridad le permite a la célula utilizar proteínas de membrana para transducir señales desde el exterior hacia el interior de la célula, y cumplir procesos de alta envergadura celular como lo son la división asimétrica, muy común en células madre y en la cual Par3, Par6 y la proteína quinasa C atípica (aPKC) juegan un papel clave en la distribución de los determinantes del destino celular y en la alineación del polo del huso acromático, necesario para la segregación de estos determinantes entre las células hijas; los defectos en esta distribución pueden resultar en tumores de células madre y algunas otras complicaciones [11].

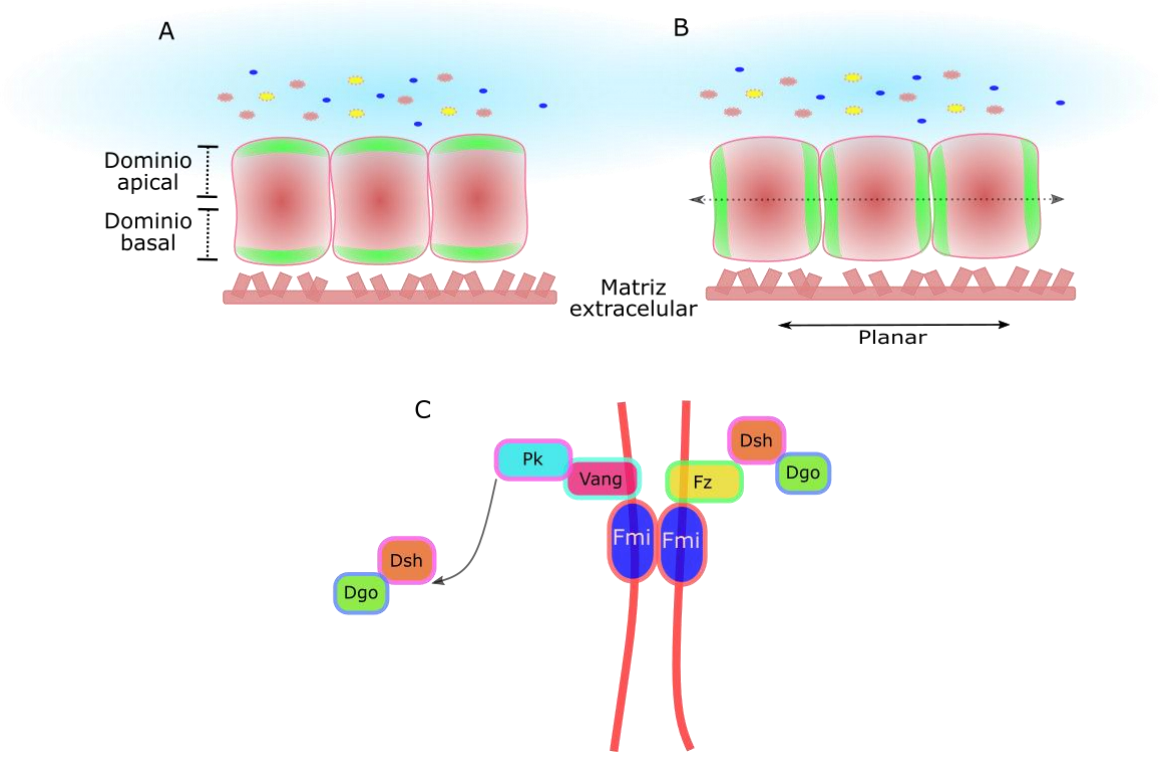

Figura 1-1 Esquema de la polaridad en células epiteliales
Orientación de la polaridad celular apical-basal (A) y planar (B) con formación de complejos (C) al interactuar dos receptores Fmi de manera intercelular.

Por otro lado, la polaridad celular planar (PCP) se refiere a distribución asimétrica a lo largo del eje perpendicular en el plano de la lámina epitelial, tal como se muestra en la figura 1-1B. Su principal función es la comunicación entre células vecinas laterales permitiendo cumplir funciones principalmente relacionadas con movilidad y migración [12]. Así mismo, estudios realizados en modelos como *Drosophila* evidencian que la asimetría que genera los efectos de polarización está regida principalmente por la conformación de los complejos Fmi-Fz-Dsh-Dgo y Fmi-Vang-Pk[2] tal como se muestra en la figura 1-1C. La PCP se activa mediante la transducción de señales que generan dichos complejos, dándose la activación de la vía de señalización Wnt mediada por calcio en donde intervienen proteínas como Frizzled (Fz), Flamingo (Fmi/CELSR en vertebrados), Van Gogh (Vang/Vangl en vertebrados), Dishevelled (Dsh/Dvl en mamíferos), Prickle (Pk) y Diego (Dgo/Inversina o Diversina en vertebrados) [10].

Es importante mencionar que a pesar que estas definiciones están basadas en células epiteliales, los mecanismos e interacciones moleculares que se han identificado, pueden estar regulando la polaridad en células no epiteliales [2].

También es importante resaltar que se ha mostrado una fuerte correlación entre la regulación al alza de los componentes de la PCP, incluidos varios ligandos de Wnt, y diagnósticos desfavorables de pacientes con cáncer de colon y recto o con carcinoma hepatocelular, entre otros [13]. Sin embargo, realizar esta asociación directa no es tarea sencilla, ya que también se ha descrito una función supresora de tumores asociada a dichos componentes en otros tipos de cáncer como es el caso del carcinoma tiroideo y los carcinomas ductal y lobular de seno [13]. En este orden de ideas, el estudio de las vías de señalización asociadas no puede ser generalizado, por el contrario, es necesario establecer el impacto de la vía de señalización para un tipo de cáncer en particular.

1.2 Vía de señalización Wnt

La vía de señalización Wnt está altamente conservada en eucariotas y es una de las vías de señalización más importantes tanto en el desarrollo embrionario y de tejidos. Además de esto, se ha correlacionado con el establecimiento de muchas enfermedades [14]. Es por esto que las señales de la vía Wnt son consideradas pleiotrópicas, con efectos como la estimulación mitogénica, la especificación del destino celular y la diferenciación [15].

La vía de señalización Wnt canónica controla la estabilidad de la proteína β-catenina. En la ausencia de ligando Wnt, el complejo de degradación formado por las proteínas Axina, APC, GSK-3 y CK-1 promueve la degradación de β-catenina. Cuando los ligandos Wnt se acoplan a un receptor como Frizzled, Axina y el complejo GSK-3 se reclutan con *Disheveled*, que interrumpe el complejo de degradación y estabiliza la β-catenina. Luego, la β-catenina se transloca al núcleo, donde interactúa con los miembros de la familia del factor de transcripción de células T (TCF) para regular la expresión génica [16], tal como se muestra en la figura 1-2.

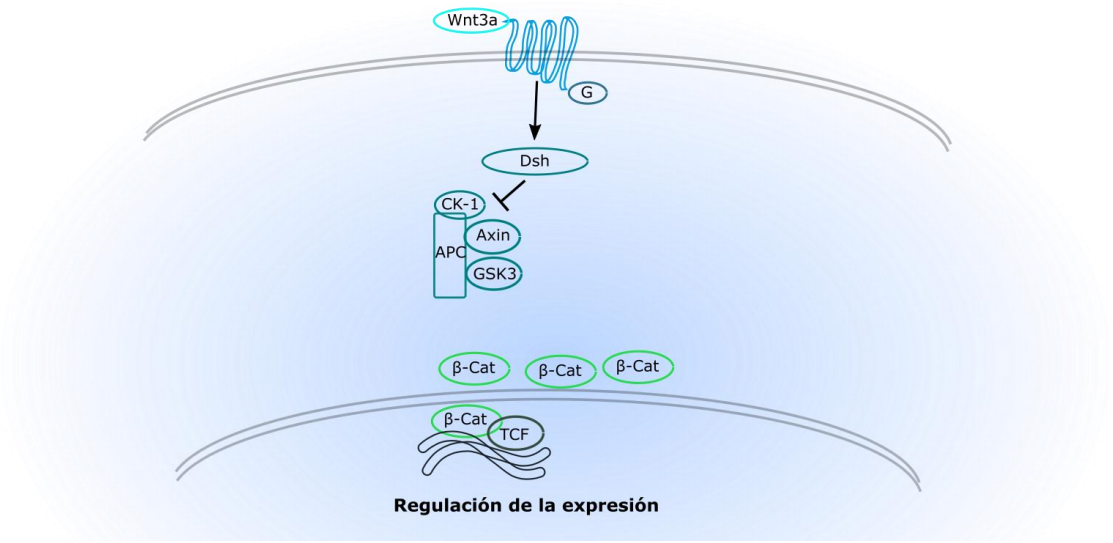

Figura 1-2 Activación de la vía de señalización Wnt canónica

Por otro lado, las vías de señalización Wnt no canónicas son denominadas como aquellas que son activadas por los ligandos Wnt pero son independientes de β-catenina. Entre estas vías no canónicas la mejor caracterizada es la vía de la PCP. En esta señalización, los receptores Fz activan una cascada que involucra a las pequeñas GTPasas RAC1 y RHOA y la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) como efectores que controlan los reordenamientos en el citoesqueleto y la expresión génica [17], tal como se esquematiza en la figura 1-3.

Otra vía independiente de la β-catenina es la vía Wnt dependiente de calcio (Wnt-Ca^{2+}). En este caso, los ligandos Wnt desencadenan la activación mediada por Fz de proteínas G heterotriméricas, que a su vez activan la fosfolipasa C (PLC). Finalmente, PLC desencadena la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares y la activación de los efectores que regulan la transcripción de los genes que controlan el destino y la migración celular [17].

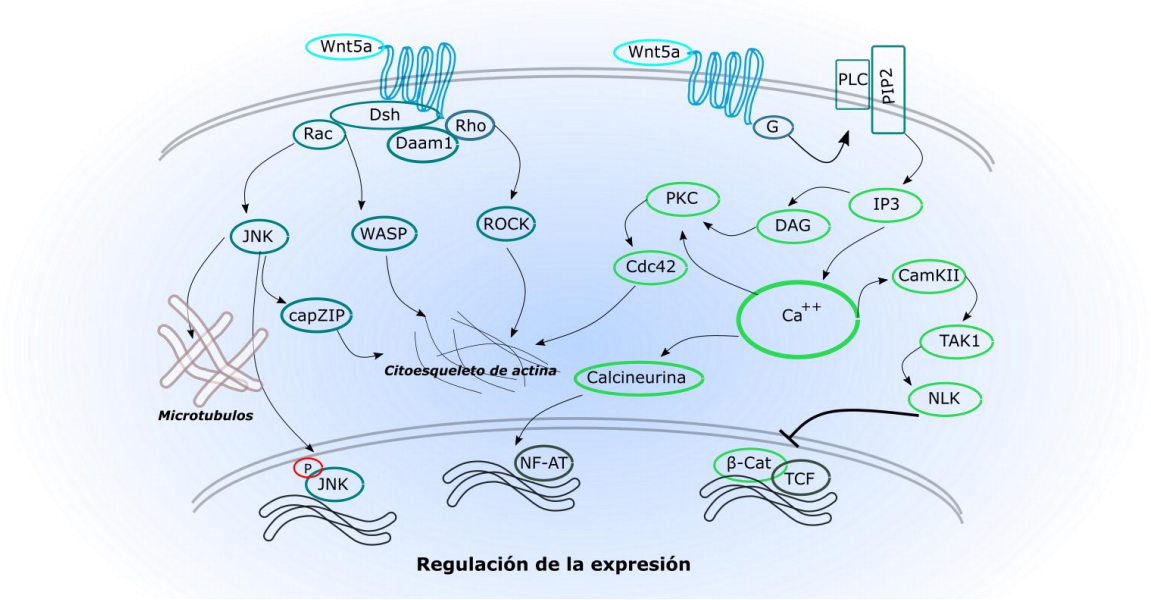

Figura 1-3 Activación de las vías de señalización Wnt no canónicas

1.3 Cadherinas y polaridad celular

La polaridad celular, a pesar de ser un fenómeno que involucra la interacción de varias biomoléculas, algunas de ellas tienen efectos con mayor impacto biológico, como es el caso de las moléculas de adhesión, entre ellas las cadherinas. Estas biomoléculas, son una superfamilia de proteínas que se encuentran desde organismos unicelulares hasta mamíferos, en donde participan en procesos morfogénicos como separación de células embrionarias, formación de sinapsis, movilidad y especificidad en el sistema nervioso central, mecano transducción de señales celulares y homeostasis física de tejidos maduros [18]. Esta superfamilia comparte como característica común la presencia de dominios extracelulares de cadherina, los cuales permiten clasificarlas en la familia de cadherinas clásicas, una familia de protocadherinas y una familia de cadherinas relacionadas [19].

Las cadherinas son proteínas de membrana que dependen de calcio [20] y al ser una de las principales moléculas para la adhesión, se han asociado fuertemente a procesos cancerosos, con un papel importante en la señalización y la homeostasis de la formación de tumores sólidos [21]. Además, se ha visto que la perdida de la adhesión mediada por cadherinas contribuye de forma significativa con el establecimiento y la metástasis del cáncer [22]. Este es el caso de la E-cadherina, considerada como supresor del crecimiento y la invasión en células cancerosas [23].

Las funciones de adhesión de las cadherinas, han permitido plantear de manera relevante los mecanismos de interacción célula-célula, área que se conoce hoy en día como conectómica, y que ha permitido establecer que dichos mecanismos de conexión entre cadherinas, resultan distintos dependiendo el tejido en el que se presentan, la abundancia a nivel de proteína, situaciones de estrés o condiciones de enfermedad [24].

1.4 CELSR

CELSR, son un subgrupo especial de cadherinas que poseen una estructura de receptor acoplado a proteína G (GPCR) en su región transmembranal. Razón por la cual también se denominan un tipo especial de GPCR de adhesión. Sin embargo, a pesar de poseer dominios de cadherina, estos receptores no tienen interacción directa con las cateninas como lo hacen las cadherinas clásicas y por lo general exhiben una adhesión más débil [25].

Estructuralmente, estas cadherinas poseen un ectodominio de aproximadamente 2700 aminoácidos con 9 repeticiones de dominios cadherina en el extremo N-terminal, varios dominios similares al factor de crecimiento epidermal (EGF), repeticiones de laminina tipo G, un sitio proteolítico de receptor acoplado a proteína G que se encuentra incrustado en un dominio de auto proteólisis inducida de GPCR (GAIN), una región de siete pasos transmembranales y una cola citoplasmática poco conservada entre los miembros de la sub familia [3], tal como se muestra en la figura 1-4.

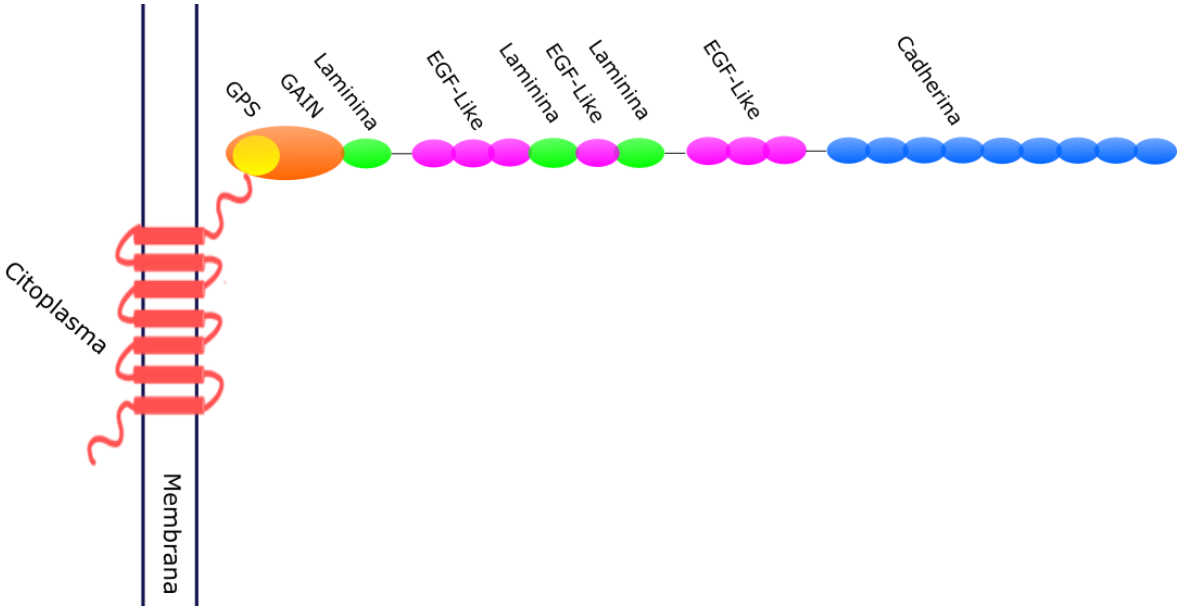

Figura 1-4 Estructura general de los CELSR

Las proteínas colocalizadas con receptores como Vangl y Frizzled parecen estar regulando la polaridad celular epitelial por interacción célula - célula mediante interacciones homofílicas [26] tal como se muestra en la figura 1-5. Además, dichas interacciones pueden generar un aumento en la liberación de calcio por la activación de la vía de señalización Wnt no canónica.

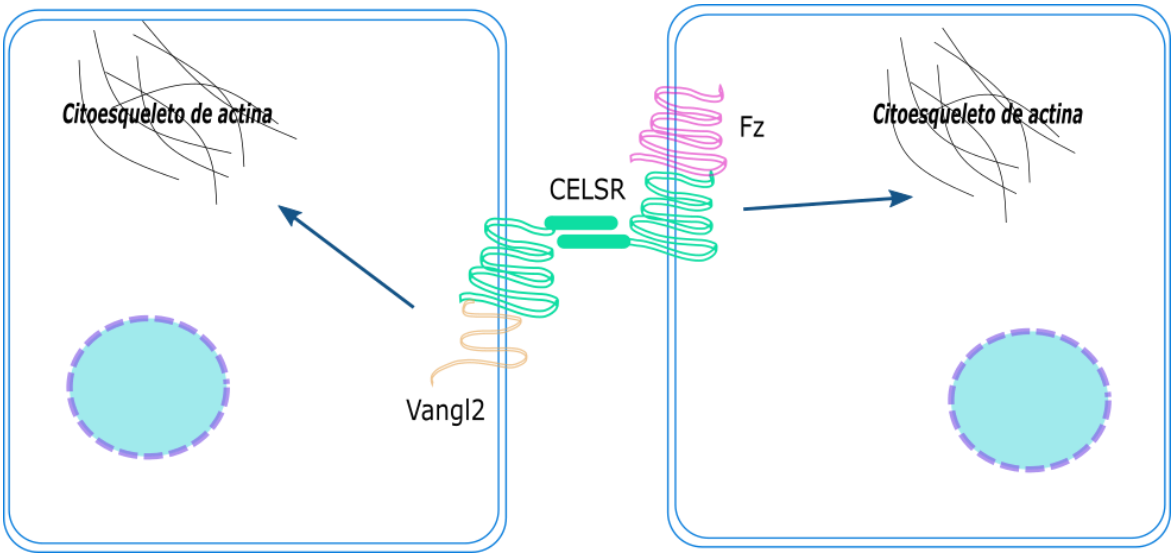

Figura 1-5 Interacción homofílica entre CELSR y colocalización con Frizzled y Vangl

Vale la pena mencionar que los genes CELSR en mamíferos, se caracterizan por sus patrones complementarios de expresión en sistemas de tejidos y órganos en desarrollo, tal como se ve en el desarrollo del sistema nervioso, en el que se expresan los tres genes CELSR. En la médula espinal en desarrollo, por ejemplo, la familia CELSR parece expresarse de manera secuencial, reflejando roles individuales en diferentes compartimientos neurales [27].

Las cadherinas CELSR1, CELSR2 y CELSR3 se identificaron inicialmente en ratones. Sin embargo, la mayoría de sus estudios se han realizado en Drosophila, permitiendo la asociación de estas biomoléculas en distintos procesos biológicos como en el desarrollo y la organización de cilios, formación del epéndimo, movilidad y migración neuronal [3]. Es importante mencionar, que estos procesos biológicos se relacionan fuertemente con la polaridad celular en dónde la vía de polaridad celular planar Wnt (Wnt/PCP) se presenta como una de las más relevantes.

Puntualmente, CELSR1 modula la polarización en células epiteliales y se ha visto en problemas de fertilidad de ratones, en el desarrollo del tubo neural [3]. CELSR2, a comparación de los otros miembros de su subfamilia, ha sido una proteína poco estudiada. Sin embargo, las alteraciones de los genes que la producen han sido reportados en casos de insuficiencias cardiacas [28], síndrome de Joubert [29] y escoliosis idiopática [30]. CELSR3 ha sido implicada en la formación de redes neuronales, así como en la estructuración dendrítica y en el desarrollo del tejido cerebral, tanto en modelos murinos como en moscas [3].

Estas moléculas han sido estudiadas en cerebro, ojo, páncreas, testículos, y pulmones [31] y en su mayoría han involucrado fenómenos de polaridad y vías de señalización asociadas. Sin embargo, los estudios en tejido hematopoyético son aún emergentes como es el caso de la identificación de CELSR1 y la activación de la vía Wnt no canónica en células de leucemia linfoide crónica tipo B [32].

Además de la presencia de las CELSR en procesos relacionados con polaridad, se ha visto que de igual manera que sucede con los genes de otras cadherinas en cáncer, los genes de CELSR se encuentran altamente mutados [4], por lo que la expresión de estas

proteínas, al igual que la interacción con sus proteínas efectoras, podrían estar desempeñando un papel importante en el desarrollo y la progresión de la enfermedad [33].

1.5 Cáncer de seno y polaridad celular planar

El cáncer de seno es una enfermedad con características heterogéneas cuyo origen no es claro [34]. A nivel mundial es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia y el primero en Colombia. Se estima que más de 2 millones de personas presentan la enfermedad a nivel mundial, de los cuales cerca de 13.000 se encuentran en Colombia [5].

Una de las características principales del tejido canceroso, es la capacidad que tienen las células de dicho tejido para invadir tejidos circundantes, activando mecanismos de polaridad que facilitan la migración y microambientes propicios para su eventual establecimiento [7]. En cáncer de seno, los estudios relacionados con la polaridad celular se han enfocado principalmente en los mecanismos de polaridad apical-basal debido al papel fundamental que cumple en los procesos de proliferación celular y organización de las láminas epiteliales en los tejidos mamarios [7, 8]. Sin embargo, se ha visto que los mecanismos inducidos por polaridad celular planar son fundamentales para la migración e invasión de las células del tejido mamario canceroso y contribuyen de manera significativa con el desarrollo de la metástasis [35].

Uno de los ligandos que contribuye de manera significativa con el desarrollo de la vía de señalización Wnt/PCP es Wnt5a, el cual se ha caracterizado como promotor de mecanismos de migración asociada a polaridad celular [36]. En cáncer de seno, Wnt5a tiene diferentes roles y su papel no es del todo claro ya que bajo diferentes contextos podría estar favoreciendo o dificultando la activación de procesos de migración, invasión, proliferación, entre otros [37]. Sin embargo, varios estudios muestran la relevancia de la activación de mecanismos de migración inducidos por Wnt5a en líneas celulares de cáncer de seno como MCF-7 y MDA-MB-231 [38, 39].

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Identificar la expresión de CELSR 1, 2 y 3 en líneas celulares de cáncer y establecer su posible relación en procesos de polaridad celular.

2.2 Objetivos específicos

Identificar la presencia de los transcritos de CELSR 1, 2 y 3 en líneas celulares de cáncer.

Silenciar los genes de CELSR 1, 2 o 3 en una línea celular de cáncer de seno.

Establecer si la migración de las células cancerosas es dependiente de la presencia de CELSR.

Analizar el efecto del silenciamiento de CELSR sobre la proliferación de una línea celular de cáncer.

3. Metodología

3.1 Cultivo de líneas celulares

Línea celular de cáncer de seno

El cultivo de la línea celular de cáncer de seno MCF-7 (ATCC® HTB-22™) se inició sometiendo el criovial a una temperatura de 37°C, el contenido se depositó en un tubo con 10 mL de medio RPMI 1640 (Gibco®- Thermo Fisher Scientific) a 37°C, se dejó descongelar completamente el contenido del criovial, se agitó suavemente y se centrifugó a 300 xg por 5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se suspendió en 5 mL de medio de mantenimiento compuesto de RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células suspendidas se sembraron en una caja de cultivo T-25, dejando en incubación por 48 horas a 37°C y 5% de CO_2. Posteriormente, se realizaron cambios de medio cada 48 horas y se monitorearon hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Al alcanzar esta confluencia se retiró el medio de cultivo y se despegó la monocapa de células utilizando 1 mL de una solución de tripsina-EDTA 0.25% durante 2 minutos a 37°C. Posteriormente se diluyó con medio de mantenimiento y se centrifugó a 300 xg por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet se suspendió en medio RPMI 1640 con SFB 10% y el contenido se llevó a una caja T-75 dejando en incubación a 37°C y 5% de CO_2. Este mismo proceso se utilizó para realizar el pasaje de las células y el montaje de los experimentos.

Líneas celulares de leucemia

Las líneas celulares CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) y Jurkat (ATCC® TIB-152™) se descongelaron sometiendo el criovial a una temperatura de 37°C permitiendo que el hielo interior se desprenda, posteriormente el contenido se depositó en un tubo con 10 mL de medio RPMI 1640 (Gibco®- Thermo Fisher Scientific) a 37°C, se dejó descongelar completamente el contenido del criovial, se agitó suavemente y se centrifugó a 300 xg por

5 min. El sobrenadante se descartó y el pellet se suspendido en 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 con 20% de suero fetal bovino (SFB). Las células suspendidas se sembraron en una caja de cultivo T-25 dispuesta de manera vertical para el crecimiento del cultivo en suspensión, dejando en incubación por 48 horas a 37°C y 5% de CO_2. Posteriormente, se realizaron adiciones de 2 mL medio, esta vez utilizando medio de mantenimiento cada 48 horas.

El monitoreo de la cantidad de células se realizó por conteo en cámara de Neubauer utilizando el método de exclusión por azul de tripán [40].

3.2 Extracción de linfocitos de sangre periférica

Se tomaron 3 mL de sangre periférica de donante sano y se diluyeron 1:1 con una solución de NaCl 0.90%. Esta solución se colocó sobre 3 mL de Percoll 1.077 g/mL y se centrifugó a 800xg por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron las células de la interfaz y se diluyeron 1:1 con la solución salina. Con el fin de enriquecer la fracción de linfocitos se depositó la suspensión de células sobre un gradiente continuo de Percoll, previamente formado por centrifugación, y se centrifugó nuevamente a 300xg por 20 min. Luego se tomaron las células de la interfaz generada y se lavaron 2 veces solución salina. Finalmente, se centrifugó a 250 xg por 5 min para utilizar el pellet en la extracción de RNA.

3.3 Determinación de la presencia de CELSR en líneas celulares

3.3.1 Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó utilizando el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific). Se tomó un pellet de $1x10^7$ células y se mezcló con 1 mL del reactivo homogenizando por agitación. Posteriormente, se adicionaron 200µL de cloroformo, se homogenizó y se centrifugó a 12000xg por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa en un nuevo tubo de 1.5 mL y se precipitó el RNA con 500 µL de isopropanol. Se centrifugó por 10 minutos a 12000xg a 4°C. El sobrenadante se retiró y el pellet se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Se centrifugó a 7500xg por 5 min a 4°C y el pellet resultante, que contiene el RNA, se

disolvió en agua libre de RNAsas y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Se midió la relación de absorbancia 260/280 nm como indicativo de pureza.

3.3.2 Transcripción reversa

El cDNA se obtuvo por transcripción reversa de 5 µg de RNA por acción de la enzima SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific) utilizando hexámeros aleatorios en concentración de 2.5 µM. El programa de amplificación se realizó según las especificaciones del fabricante.

3.3.3 Diseño de primers

Los *primers* se diseñaron con la herramienta *primer* BLAST [41] dirigidos a los genes de CELSR1 (Gene ID: 9620), CELSR2 (Gene ID: 1952) y CELSR3 (Gene ID: 1951). Para la escogencia de los mejores *primers* se tuvo en cuenta un rango de temperaturas de 55 a 63°C, un %GC de 40 a 60% y un tamaño de amplicón inferior a 150 bp. Las secuencias se evaluaron con la herramienta Sequence Manipulation Suit [42] con el fin de evitar secuencias con auto-anillamiento o formación de estructuras secundarias. En la tabla 3-1 se muestran las secuencias de los *primers*

Gen	**Secuencia del primer (5’ → 3’)**
CELSR1	Forward primer ATTTGTACTTCTGCGGTGCT
	Reverse primer GTCCGTAAACCGTCCCTTC
CELSR2	Forward primer CCCTTAGGCTACCTGGTTCT
	Reverse primer TGTGCCATTGTTGATGGTGA
CELSR3	Forward primer GGACTACAAGCAGGAACGCT
	Reverse primer TTTGAAAGACCGGCCGATGA

Tabla 3-1 *Primers* diseñados para determinar la expresión de transcritos de CELSR

3.3.4 Ensayos de expresión génica

Con el cDNA sintetizado se procedió a realizar la amplificación de los genes de CELSR 1, 2 y 3. En la optimización de las condiciones, se evaluaron las temperaturas de anillamiento para cada pareja de primers, obteniendo como resultado las temperaturas mostradas en

la tabla 3-2. Posteriormente, se evaluaron las eficiencias para cada ensayo mediante diluciones seriadas de la muestra de cDNA (ver anexo A).

Gen	Temperatura de anillamiento (°C)
CELSR1	61.0
CELSR2	57.0
CELSR3	58.0

Tabla 3-2 Temperatura de anillamiento para los *primers* de CELSR

Los ensayos se realizaron por triplicado a partir del material de las líneas celulares utilizando una dilución del cDNA 1:5 en un volumen de reacción de 3µL. Con las condiciones optimizadas se procedió a realizar cuantificación relativa de la expresión génica por el método de Pfaffl [43], utilizando para la normalización el valor de la media geométrica de los Cq de los genes de referencia 18S (NCBI Reference: NR_145820.1) y β-actina (Gene ID:60). Los datos en graficas se muestran como expresión relativa a los genes de referencia y barras de desviación estándar.

3.3.5 Silenciamiento de los genes de CELSR en una línea celular de cáncer de seno

Se sembraron $1x10^4$ células/pozo de la línea celular MCF-7 en placas de 24 pozos con medio de mantenimiento, dejando en incubación a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas. Se realizó cambio de medio, y la infección de las células en una mezcla de Polybrene (Santa Cruz Biotechnology, sc-134220) en concentración final de 7µg/mL y partículas lentivirales con MOI=1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-60349-V, sc-60351-V y sc-60353-V) con el fin de silenciar simultáneamente los genes de CELSR1 CELSR2 y CELSR3 por medio de shRNA. Como control de silenciamiento especifico se realizó la infección con un shRNA con secuencia aleatoria. Adicionalmente se dejó un pozo sin tratamiento.

Se retiraron las partículas lentivirales 24 horas después, y se colocó nuevamente medio RPMI 1640 y SFB 10%, dejando en incubación durante 48 horas a 37°C y 5% de CO_2. La selección se realizó adicionando puromicina en concentración de 4 ug/mL al medio de cultivo durante los días posteriores. Una vez alcanzada la confluencia en el pozo, las

células sembradas en una caja T-25 para su crecimiento. El pozo sin tratamiento se usó como control de la selección.

3.4 Ensayos funcionales

3.4.1 Ensayo de migración celular

El cultivo estable de células MCF-7, la línea de control (MCF-7-SC) y la línea silenciada de CELSR (MCF-7-CELSR) se incubaron en ausencia de SFB, utilizando medio RPMI 1640 con BSA al 2% durante 18 horas. Posteriormente, se sembraron $1x10^5$ células en los insertos de una placa de 24 pozos con tamaño de poro de 8µm en medio suplementado con BSA al 2% en el inserto superior. En el inserto inferior se sembraron las condiciones de estímulo: medio de mantenimiento con SFB 10%, (Wnt5a 100 ng/mL), o los dos estímulos al tiempo. Después de 24 horas se retiraron los insertos, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos. Se realizó una tinción con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) en concentración 0.1 µg/mL durante 30 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS. Las imágenes se registraron por microscopía de fluorescencia en el microscopio EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific), tomando fotografías de 4 campos en cada pozo. El conteo de núcleos se realizó utilizando el programa ImageJ-Fiji [44]. Los datos se muestran en gráficos de barras expresando la tasa de migración utilizando la condición sin estímulo (Medio RPMI con BSA al 2%) de cada tratamiento como normalizador. La desviación estándar se calculó a partir de la propagación de las desviaciones estándar de los conteos de la respectiva condición de estímulo y el normalizador.

3.4.2 Ensayo de actividad metabólica

Se sembraron $5x10^3$ células/pozo en placas de 96 pozos colocando de cada uno de los modelos celulares (MCF-7, MCF-7-SC y MCF-7-CELSR) y se permitió la adhesión. Luego, se dejaron en medio RPMI con BSA 2% durante 18 horas a 37°C y 5% de CO_2. Posteriormente, se remplazó el medio utilizando las mismas condiciones de estímulo que en el ensayo de migración, dejando en incubación por 24 horas. Luego, se incubo en medio RPMI con reactivo MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich) a 0.5 ug/mL por 3 horas, permitiendo la formación de cristales de formazán

que se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO), por incubación en oscuridad y agitación por 20 minutos. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Los ensayos se montaron por triplicado técnico y los datos obtenidos se muestran en gráficos de barras expresando la actividad metabólica relativa utilizando la absorbancia de la condición sin estímulos de cada tratamiento como normalizador. La desviación estándar se calculó como la suma cuadrática de las desviaciones estándar de cada medición con la de su respectivo normalizador. Se realizó una prueba ANOVA de dos vías para evaluar las diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos.

3.4.3 Ensayo de proliferación

De la misma manera que en el ensayo de actividad metabólica, se sembraron $5x10^3$ células/pozo en placas de 96 pozos, de cada una de las líneas (MCF-7, MCF-7-SC y MCF-7-CELSR) y se permitió la adhesión. Se dejaron en medio RPMI con BSA 2%. Luego de 18 horas, se remplazó el medio utilizando las mismas condiciones de estímulo que en el ensayo de migración (medio de mantenimiento con SFB 10%, Wnt5a, o los dos estímulos al tiempo), incubando por 24 horas. Posteriormente, se realizó la tinción con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) en concentración 0.1 µg/mL durante 30 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS. Las imágenes se registraron por microscopía de fluorescencia en el microscopio EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific), tomando fotografías de 4 campos en cada pozo. El conteo de núcleos se realizó utilizando el programa ImageJ-Fiji [44].

3.4.4 Cuantificación de diacilglicerol (DAG)

Para determinar la cantidad de diacilglicerol que se genera con los estímulos utilizados se utilizó el kit Diacylglycerol ELISA (Aviva systems biology). Para esto se tomó un cultivo celular en monocapa de cada una de las líneas (MCF-7, MCF-7-SC y MCF-7-CELSR) en placas de 6 pozos dejando en incubación durante 18 horas en 2 mL de medio RPMI con BSA 2%.

Se tomaron 300 µL de los sobrenadantes de cada tratamiento (Basal, Wnt5a, SFB 10% y SFB10%+Wnt5a). Para las muestras que contenían suero fetal bovino, se diluyeron para ajustar la concentración a 1 µg/mL.

Las células se lisaron por raspado de cada uno de los pozos con PBS en frio y posteriormente se llevaron a ultrasonido por 10 min. Posteriormente, se realizó la cuantificación de los lisados y se diluyó para obtener una concentración de 1 µg/mL de cada muestra. Para realizar el ensayo, los sobrenadantes se utilizaron en dilución 1:2 y los lisados de las células en dilución 1:3.

Se realizó la dilución seriada del estándar de DAG y se colocaron 50µL de muestra por pozo, de la curva de diluciones y de las muestras a analizar, y 50 µL del reactivo Diacilglicerol-Biotin complex 1X (complejo de diacilglicerol biotinilado). Luego de 60 minutos de incubación a 37°C, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con el buffer de lavado (T-TBS). Posteriormente, se tomaron 100µL del conjugado Avidina-HRP y se incubó por 45 minutos a 37°C. Se hicieron nuevamente 3 lavados de 10 minutos con buffer de lavado, se adicionó 90µL del sustrato TBM y se dejó en incubación por 30 minutos a 37°C en oscuridad. Por último, se detuvo la reacción con el reactivo stop solution 1X (HCl 1M) y se leyó la absorbancia a 450 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado y la cantidad de DAG se determinó por interpolación en la curva de calibración. Los resultados se muestran en gráficos de barras con la desviación estándar asociada a la interpolación con la curva de calibración. Las diferencias significativas se determinaron con una prueba ANOVA de dos vías con un valor $p<0.001$.

4. Resultados y discusión

Con la evaluación de la expresión de los transcritos de CELSR se buscó analizar la relevancia de estos receptores en la migración asociada a la activación de la vía Wnt no canónica, asociada con polaridad celular, permitiendo identificar si otros ensayos funcionales como la actividad metabólica y la proliferación celular se ven afectados por la disminución de estos receptores.

4.1 Expresión de CELSR en las líneas celulares

Mediante qPCR se observó la expresión de los transcritos de CELSR1, 2 y 3 en la línea celular de cáncer de seno MCF-7, en las líneas celulares de leucemia linfoide aguda Jurkat y CCRF-CEM, y en los linfocitos extraídos de sangre periférica (Figura 4-1). En todas las líneas celulares analizadas, fue posible identificar la presencia de los transcritos de CELSR. Se observa que la expresión de los transcritos en la línea celular MCF-7 supera la expresión de los genes en las líneas celulares de leucemia. En los tres genes esta expresión no supera el 2% de la expresión en la célula de tipo epitelial. Adicionalmente, es posible observar que la presencia de dichos transcritos es significativamente menor en una línea no tumoral como son los linfocitos extraídos de sangre periférica ya que se presenta una expresión inferior al 10% al compararse con las líneas celulares de leucemia.

Al comparar la expresión entre genes, CELSR2 tiene mayor expresión relativa que los transcritos de los otros 2 genes, siendo 10 veces mayor que la expresión de CELSR3 y 100 veces mayor que la expresión de CELSR1 tanto para la línea MCF-7 como para las líneas celulares leucémicas.

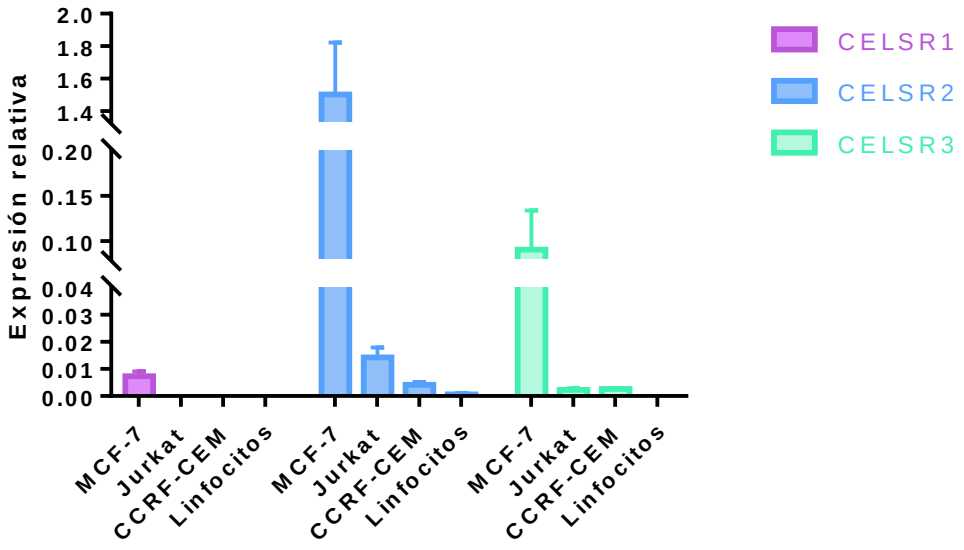

Figura 4-1 Expresión génica de CELSR 1, 2 y 3 en líneas celulares
Expresión de CELSR relativa a la expresión de los genes de referencia 18S y β-actina medida en la línea celular epitelial de cáncer de seno MCF-7, en linfocitos extraídos de sangre periférica y en las líneas celulares de leucemia linfoide aguda Jurkat y CCRF-CEM.

La información sobre la expresión y funciones asociadas de las CELSR es escasa. Esto puede ser resultado de la complejidad estructural del receptor, ya que no se conoce una estructura completa proveniente de la cristalización del receptor, tan solo se conocen estructuras de fragmentos del ectodominio N-terminal [3]. Adicionalmente, no se conocen proteínas G asociadas aunque tiene los dominios transmembranales de un receptor acoplado a proteína G y no hay descripción de auto-proteólisis a pesar de tener un dominio característico de esta función [3, 31]. Lo anterior puede ser consecuencia de la dificultad de cristalizar receptores acoplados a proteína G y los complejos que pueden formar este tipo de receptores [42, 43]. Por estas razones, como primera aproximación, se buscó establecer la presencia de los transcritos por qPCR en modelos celulares con características de adhesión diferentes como lo son MCF-7, cuyo crecimiento es en monocapa, y las células de leucemia Jurkat y CCRF-CEM cuyo crecimiento es en suspensión.

La expresión de los transcritos de CELSR 1, 2 y 3 en las líneas celulares de cáncer analizadas, fue mayor en la línea MCF-7. Es de esperarse que las líneas celulares epiteliales, posean una alta expresión de moléculas de adhesión debido a la necesidad de generar interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, como se ha visto en la expresión de cadherinas en células epiteliales. No obstante, no se puede descartar el papel de la expresión de estas moléculas en el tejido hematopoyético, ya que, bajo diversas condiciones, las moléculas de adhesión pueden sobre expresarse para cumplir funciones como la sinapsis inmunológica o la división asimétrica.

Anteriormente, se reportó la presencia de los transcritos en las células MCF-7 y Jurkat cuyos resultados se encuentran reportados en las bases de datos del *European Bioinformatics Institute – EBI* [47]. Sin embargo, estos datos se adquirieron por estudios de transcriptómica por RNA-seq, y debido a la diferencia en la sensibilidad que se presenta frente a la qPCR se hizo necesario realizar ensayos que permitieran identificar los transcritos por esta técnica.

El estudio del EBI, muestra que en la línea celular MCF-7 se presenta una expresión caracterizada de 41 Transcritos Por Millón (TPM) para CELSR1, 181 TPM para CELSR2 y 5 TPM para CELSR3. Por otro lado, la expresión para los genes de CELSR 1, 2 y 3 en las células de Jurkat es de 5, 26 y 15 TPM para cada uno de los genes respectivamente. En este reporte no se incluye la línea celular CCRF-CEM y a la fecha no hay evidencia reportada de la presencia de estos transcritos en esta línea celular. Este trabajo muestra la presencia de los 3 transcritos en esta línea celular.

Se encontró que la proporción de CELSR2 fue mayoritaria en las líneas celulares analizadas en este estudio. A pesar de no contar con un estándar que permitiera la cuantificación absoluta de los transcritos, se puede asumir que la proporción de la expresión de los transcritos de las isoformas en cada línea celular es concordante con los datos de la base de datos del EBI y a pesar de tener una sensibilidad menor, es posible evidenciar la presencia de los transcritos por qPCR.

Se realizó el análisis de la expresión de estas cadherinas en linfocitos extraídos de sangre periférica mostrando una expresión inferior a las presentadas por las líneas celulares de cáncer. Esto podría sugerir una posible sobre expresión de los transcritos de CELSR que

contribuiría a los procesos de malignización tal como se ha descrito para la N-cadherina en algunos tipos de tejido epitelial [21], [23].

4.2 Silenciamiento génico para CELSR 1, 2 y 3

Con el fin de generar un modelo celular que permitiera observar respuestas a los estímulos, en función de la expresión de CELSR y teniendo en cuenta que la expresión de los transcritos de CELSR fue mayor en las células de cáncer de seno MCF-7, se silenciaron dichos genes en esta línea celular utilizando *shRNA* con partículas lentivirales (MCF-7-CELSR), obteniendo una expresión de los transcritos disminuida en más de un 80% para los genes de CELSR2 y CELSR3 con respecto al control, tal como se muestra en la figura 4-2. Vale la pena mencionar que el silenciamiento mediante partículas lentivirales que expresan shRNA, permite una integración al genoma más eficiente que otros métodos de silenciamiento con iRNA, generando así silenciamientos estables y duraderos en las líneas celulares objetivo [45-47].

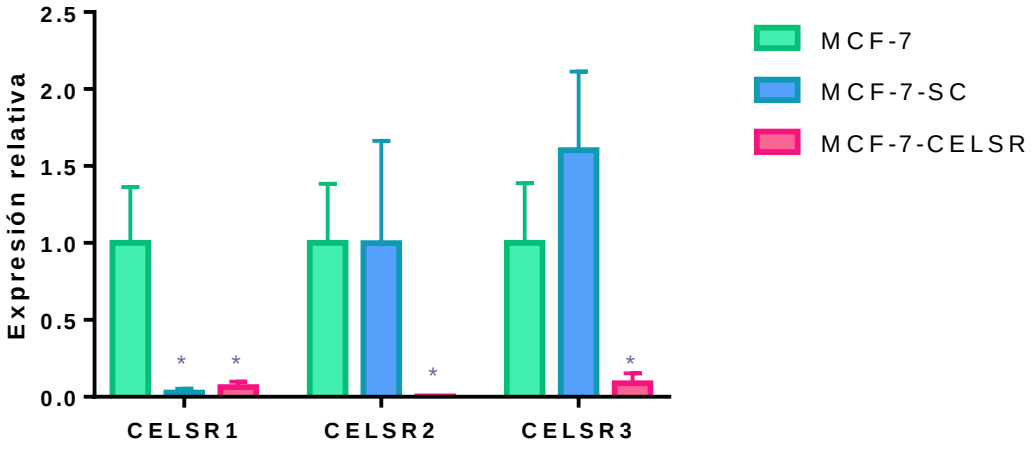

Figura 4-2 Expresión de los genes de CELSR 1, 2 y 3 en MCF-7 en respuesta al silenciamiento
MCF-7: Línea celular sin silenciamiento. **MCF-7-SC:** Línea celular con transducción de secuencia aleatoria. **MCF-7-CELSR:** Línea celular silenciada para los genes de CELSR1, CELSR2 y CELSR3 simultáneamente. Mediante qPCR se midió la expresión de los genes CELSR1 CELSR2 y CELSR3 utilizando como genes de referencia β-actina y 18S. Las

diferencias significativas con respecto al comportamiento de la línea basal se muestran con un asterisco * $p<0.05$

Resulta interesante que la expresión de CELSR1 se encuentra disminuido en la línea celular objetivo, pero también en la línea celular transfectada con la secuencia aleatoria (MCF-7-SC). Este resultado puede ser debido al procedimiento utilizado para el silenciamiento de los genes ya que a pesar de tener una buena eficiencia de silenciamiento, el silenciamiento con vectores lentivirales puede dar origen a silenciamientos inespecíficos o respuestas celulares variadas causadas por la interacción con reguladores de la expresión como lo son los miRNA [45, 47]. Valdría la pena analizar en estudios posteriores la causa y la consecuencia de la disminución de este receptor en este tipo de metodologías.

4.3 Ensayos funcionales

4.3.1 Ensayo de migración celular

La migración celular determinada por ensayo en la cámara de Boyden se aumentó en respuesta al suero fetal bovino al 10% y la combinación de este estímulo con Wnt5a, con respecto a las condiciones basales (Figura 4-3).

La línea celular MCF-7 respondió al estímulo de SFB generando un aumento en el índice de migración (30 veces) que se potencia en presencia de Wnt5a (50 ± 10 veces). Se observó que la activación dada por el estímulo Wnt5a depende de la presencia de SFB; en ausencia de él, las células no presentan una diferencia significativa en la tasa de migración al compararse con la condición basal (16±4 células). Este comportamiento se mantuvo al utilizar la línea de control de silenciamiento (MCF-7-SC) pero no en la línea silenciada en los genes CELSR (MCF-7), en donde se evidencia una disminución de la tasa de migración al compararse con las líneas control y en donde no se presenta una migración estadísticamente diferencial entre el estímulo con SFB 10% y SFB10%+Wnt5a.

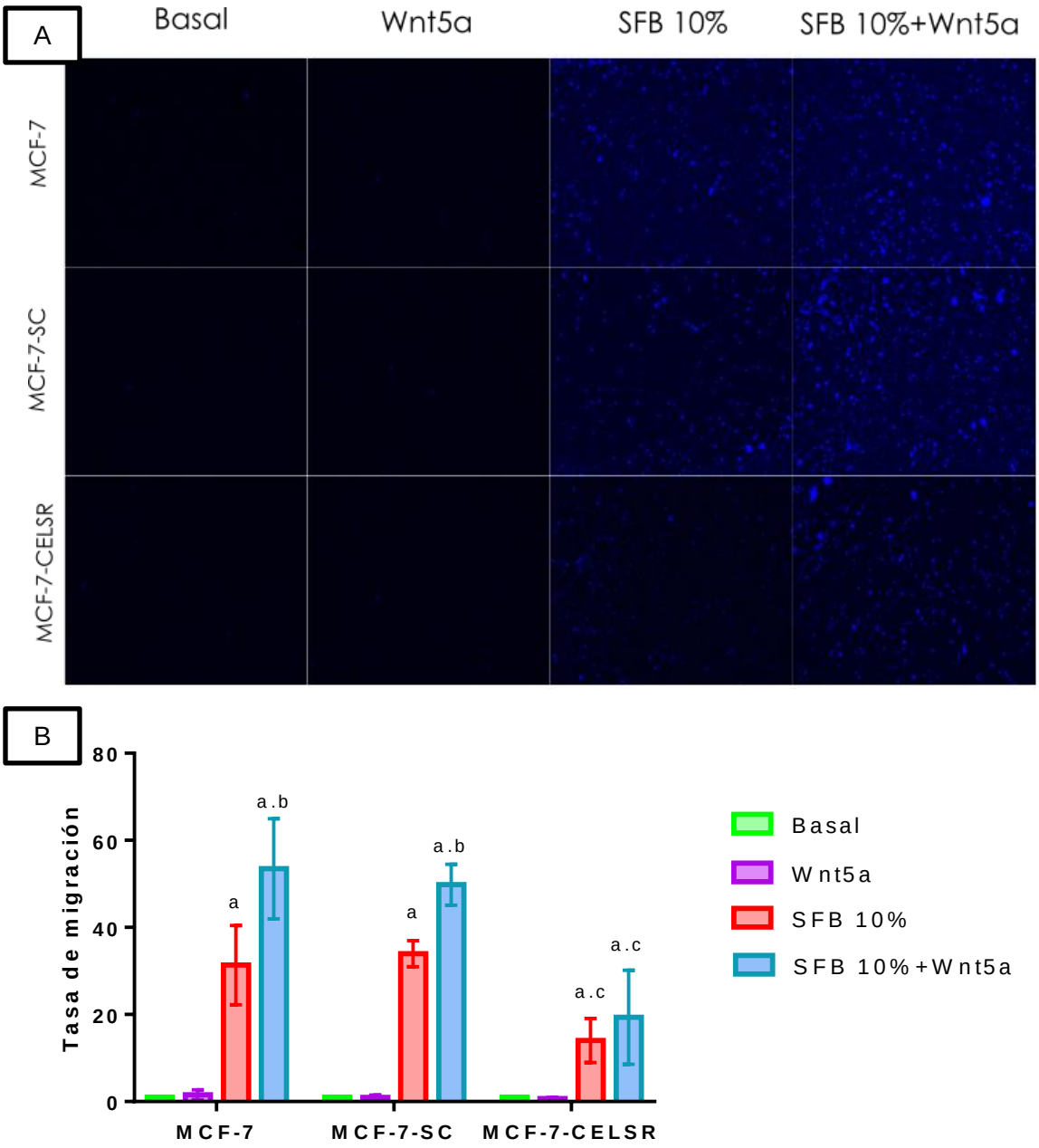

Figura 4-3 Efecto del silenciamiento de CELSR 1,2 y 3 en la migración celular de MCF-7

A. Imagen representativa de los campos utilizados para el conteo de núcleos en el ensayo de migración en la cámara de Boyden. **B.** Tasa de migración de la línea celular al estimular durante 24 horas. **MCF-7:** Línea celular sin silenciamiento. **MCF-7-SC:** Línea celular control con shRNA aleatorio. **MCF-7-CELSR:** Línea celular silenciada para los genes de CELSR1, CELSR2 y CELSR3 simultáneamente. Las letras en el gráfico indican las diferencias significativas a $p<0.05$: **a.** condición de estímulo vs su respectiva condición basal, **b.** condición de estímulo con SFB 10%+Wnt5a vs la condición de estímulo con SFB 10%, **c.** condición de estímulo vs la misma condición de estímulo en la línea celular sin silenciamiento

La migración celular es un proceso fundamentalmente polarizado, principalmente en células cancerosas con el fin de buscar un microambiente propicio para establecimiento del nicho tumoral [12, 48]. Estos procesos de migración se ven mediados principalmente por pequeñas GTPasas, las cuales son activadas por vías de señalización como la Wnt no canónica [36, 48].

La migración en las células de cáncer de seno MCF-7, muestra una dependencia de CELSR 2 y CELSR 3 para generar mecanismos de polaridad estimulados por la vía de señalización Wnt no canónica, a pesar de no tener interacción directa con Wnt5a, las CELSR podrían apoyar la estabilización de la señal producida por receptores activados directamente por este estimulo como lo son Vangl y Frizzled, tal como se ha reportado en modelos de *Drosophila* [2]. Esto se sugiere por la migración que resulta significativamente menor en las líneas silenciadas. En este análisis no es posible incluir el efecto de CELSR1, debido a que la línea control con el shRNA de secuencia aleatoria muestra una disminución en la expresión de este receptor y es posible que la expresión del receptor se vea afectada por otros factores como se describió en la sección 4.2.

La sinergia que presenta el estímulo Wnt5a al acompañarse con suero fetal bovino en las células de MCF-7, puede darse debido a la activación de otras vías de señalización que permiten cumplir procesos de migración que confluyen en mecanismos comunes con la vía de señalización Wnt no canónica principalmente por la activación de pequeñas GTPasas, como es el caso de la vía MAPK y Akt/mTORC1 [49, 50].

Estos resultados que indican que la migración activada por la vía de señalización Wnt no canónica de la línea celular MCF-7 se ve alterada por la disminución de las CELSR, sería concordante con los estudios realizados en otros modelos biológicos como pez cebra [54] y ratón [55], en donde CELSR afectan la migración de células neuronales y epiteliales.

Por otro lado, se esperaría que la disminución de la expresión de una cadherina contribuyera a los procesos de migración ya que se ha visto que la perdida de la adhesión mediada por cadherinas contribuye de forma significativa con el establecimiento y la metástasis del cáncer [22]. Este es el caso de la E-cadherina, considerada como supresor del crecimiento y la invasión en células cancerosas [23]. Sin embargo, el comportamiento que presentan las CELSR parece no seguir estos mismos patrones, ya que la disminución

del receptor genera un efecto de disminución de la migración, al alterar la estabilidad de la señal de Wnt5a para activar la vía Wnt no canónica.

Resulta interesante que el tratamiento realizado con la secuencia aleatoria presenta una disminución en la expresión del receptor CELSR1. Sin embargo, esta alteración no representa un cambio significativo en los patrones de migración que presenta la línea tratada con la secuencia aleatoria al compararse con la línea sin tratamiento. Esto podría implicar que CELSR1 no estaría contribuyendo de manera significativa a la migración activada por Wnt5a. Estudios anteriores han mostrado que las CELSR tienen patrones de expresión complementarios durante el desarrollo embrionario, sugiriendo una mayor relevancia de CELSR1 durante etapas tempranas del desarrollo y cuya expresión disminuiría con la maduración del tejido, permitiendo que CELSR2 y CELSR3 se expresen mayoritariamente y suplan las funciones de regulación de la polaridad asociadas [27]. Teniendo en cuenta que la línea MCF-7 es una línea celular de cáncer que ya ha pasado por procesos de maduración, es posible que CELSR1 no presente un rol importante, razón por la cual su expresión es baja en comparación con las otras isoformas, tal como se muestra en los ensayos de expresión génica (Numeral 5.1). Es necesario realizar ensayos para la determinación de la relevancia de CELSR1 en tejidos cancerosos, preferiblemente con estadios de maduración diferentes, con el fin de elucidar el papel que este receptor pudiera estar cumpliendo.

4.3.2 Ensayo de actividad metabólica

Con el fin de verificar que la migración diferencial que presentan las células de la línea celular MCF-7 al silenciar las CELSR no se afectó por una alteración de la actividad metabólica celular, se realizó un ensayo de MTT empleando las mismas condiciones de estímulo que en el ensayo de migración. Esto permitió observar que no existen diferencias significativas en la actividad metabólica relativa al compararse la línea silenciada, la línea sin silenciar y la línea silenciada con la secuencia aleatoria, cuando se estimula con Wnt5a o con SFB 10% tal como se muestra en la figura 4-4.

Este ensayo permite determinar la viabilidad del cultivo celular por medio de la actividad mitocondrial que transforma el MTT [Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)] en un compuesto de formazan púrpura, utilizando las reductasas

mitocondriales [53, 54]. Al no encontrarse diferencias significativas entre las mismas condiciones de estímulo entre las líneas MCF-7, MCF-7-SC y MCF-7-CELSR, se puede inferir que la viabilidad celular no ha sido afectada debido al silenciamiento

Se muestra que, para las células MCF-7 tanto en presencia como en ausencia de suero fetal bovino, el estímulo con Wnt5a no contribuye significativamente en el aumento de la actividad metabólica relativa a la condición basal, y dicha respuesta está dada por la actividad promovida por el SFB, ya que se evidencia un incremento significativo ($p<0.001$) en la actividad metabólica de cada línea celular al estimularse con SFB 10%.

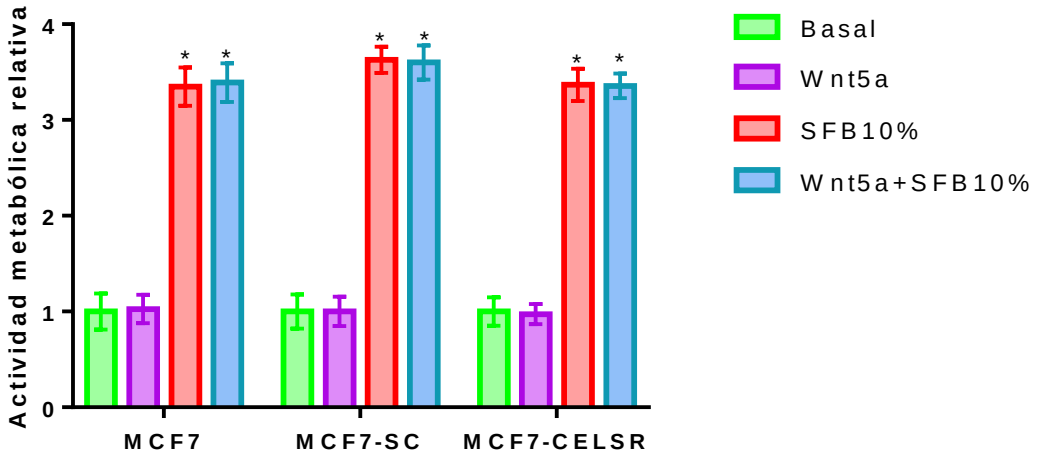

Figura 4-4 Efecto del silenciamiento de CELSR 1,2 y 3 en la actividad metabólica de MCF-7

MCF-7: Línea celular sin tratamiento. **MCF-7-SC**: Línea celular control con shRNA aleatorio. **MCF-7-CELSR**: Línea celular con silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3. *Diferencia significativa con la condición basal sin estímulos $p<0.001$. Los cultivos se estimularon durante 24 h.

4.3.3 Ensayos de proliferación

Debido a que los ensayos de actividad metabólica muestran un aumento en dicha actividad generado por el estímulo con suero, se verificó si este comportamiento se correlaciona con un aumento en el número de células bajo las mismas condiciones de ensayo. En la figura 4-5, se muestra un ensayo de proliferación por conteo de núcleos, en el cual se observa que no se presentan cambios en la cantidad de células durante las 24 horas de estimulación con SFB 10%, Wnt5a y con la combinación de ambos estímulos en las líneas celulares. Esto muestra que a pesar del incremento en la actividad metabólica en respuesta a suero mostrado por el ensayo de MTT, no hay cambios evidentes en la proliferación de la línea celular inducidos por los estímulos en un tiempo de 24 horas de ensayo. Es posible que el incremento de la actividad metabólica esté relacionado con la activación de vías de señalización que promueven la liberación de calcio intracelular como se ha reportado para varios tipos de células epiteliales por acción de compuestos como los polifenoles o por radiación [55, 56].

Adicionalmente, tampoco es posible evidenciar cambios significativos en la proliferación celular al realizar la comparación de las mismas condiciones de estímulo entre la línea triple silenciada (MCF-7-CELSR) y las líneas celulares de control (MCF-7 y MCF-7-SC). Es importante mencionar que la línea celular, en las condiciones de cultivo en las cuales se realizaron los ensayos, tiene un tiempo de duplicación de 48 horas. Por lo tanto, es de esperarse que Wnt5a no induzca cambios en la tasa de proliferación, al ser un activador de la vía de señalización Wnt no canónica cuyo papel se encuentra asociado principalmente a fenómenos de polaridad celular planar como motilidad, migración e invasión [17].

Estos resultados también indican que los fenómenos de migración evidenciados en los ensayos realizados en cámara de Boyden, los cuales se realizaron bajo las mismas condiciones de estímulo, no se están viendo afectados por aumento en la población celular sino por la activación de mecanismos de polaridad inducidos por Wnt5a.

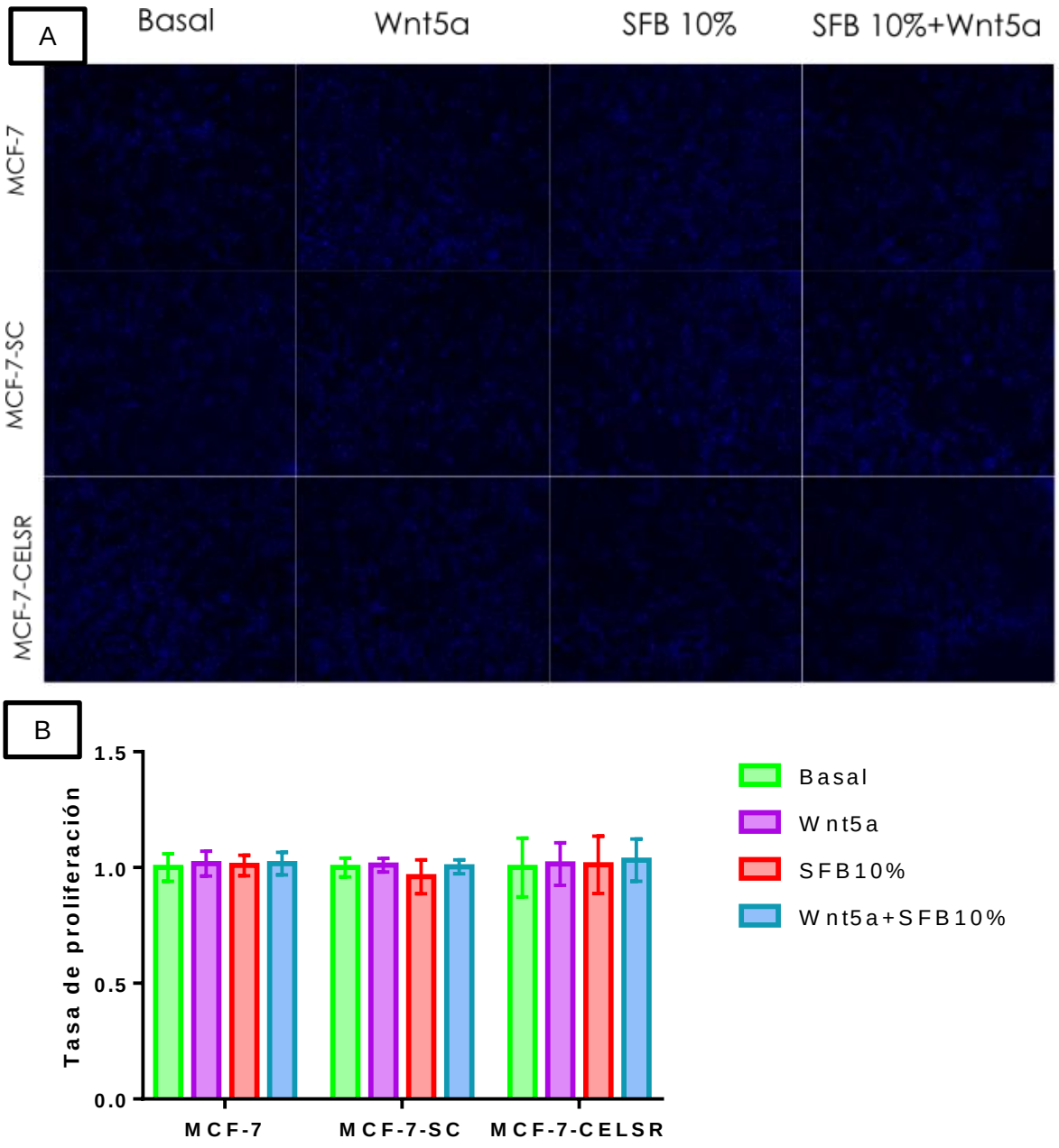

Figura 4-5 Efecto del silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3 en la proliferación de MCF-7
A.Imagen representativa de los campos utilizados para el conteo de núcleos en el ensayo de migración en cámara de Boyden. **B.** Tasa de proliferación de la línea celular al estimular durante 24 horas **MCF-7:** Línea celular sin tratamiento. **MCF-7-SC:** Línea celular control con shRNA aleatorio. **MCF-7-CELSR:** Línea celular con silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3.

4.3.4Cuantificación de diacilglicerol

El diacilglicerol es un lípido simple, que se ha descrito como intermediario del metabolismo, como componente de algunas membranas biológicas y como segundo mensajero [60]. Los niveles de DAG son regulados principalmente por la acción de la fosfolipasa C (PLC), la cual puede ser activada por señales asociadas a proteínas G y la acción de la insulina [57-59]. La vía de señalización Wnt no canónica, puede activar la PLC permitiendo la liberación de DAG para que actúe como segundo mensajero [17], generando así respuestas fisiológicas asociadas con polaridad celular.

Con el fin de identificar si los niveles de DAG en la línea celular MCF-7, se ven afectados como consecuencia del silenciamiento de las CELSR al realizar los estímulos con Wnt5a y poder correlacionar el comportamiento de los ensayos funcionales con una eventual activación de la vía de señalización Wnt no canónica mediada por DAG, se realizó la medición por un ensayo de ELISA tanto para el sobrenadante como para el lisado de las células en cultivo.

En el sobrenadante del cultivo celular se evidencia que los estímulos con SFB 10% generan un aumento en la cantidad de diacilglicerol al compararse con las condiciones en ausencia de este estímulo como se muestra en la figura 4-6. Adicionalmente, no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos con SFB 10% y la combinación de SFB 10% y Wnt5a. De igual manera, no se presentan diferencias significativas entre la línea celular con el medio RPMI y la línea estimulada con Wnt5a. Estos resultados sugieren que la presencia de los componentes del suero estaría activando vías de señalización mediadas principalmente por proteínas G, responsables del aumento en la cantidad de DAG.

En el lisado celular se observa que en general, la cantidad de diacilglicerol es mayor que en los sobrenadantes para todos los tratamientos. Esto es debido a que el DAG es un segundo mensajero intracelular y al tiempo de estímulo en el cual se realizan los ensayos, la cantidad de DAG que se podría recuperar del sobrenadante por una eventual secreción sería inferior a la que se encuentra presente a nivel intracelular.

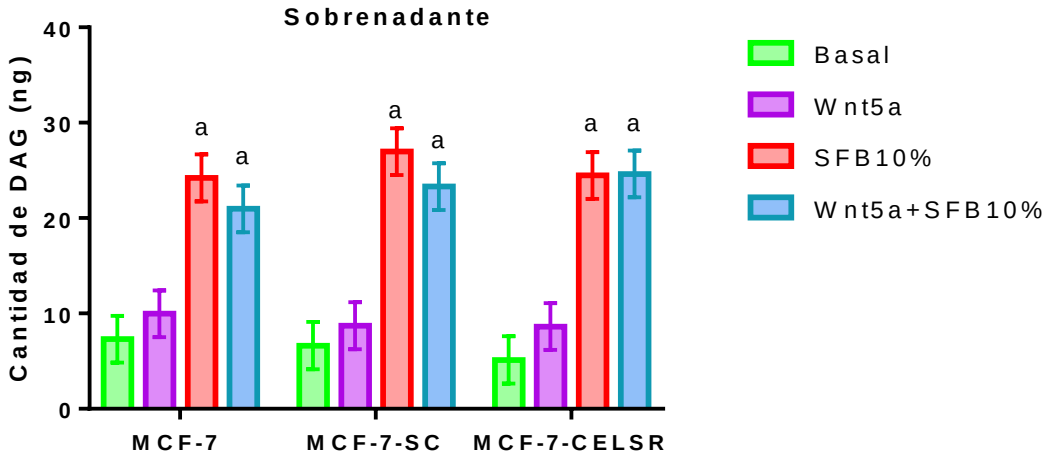

Figura 4-6 Efecto del silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3 en la cantidad de diacilglicerol en el sobrenadante de la línea MCF-7

MCF-7: Línea celular sin tratamiento. **MCF-7-SC:** Línea celular control con shRNA aleatorio. **MCF-7-CELSR:** Línea celular con silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3. Las letras en el gráfico indican las diferencias significativas a p<0.001: **a.** Diferencia significativa con la condición basal

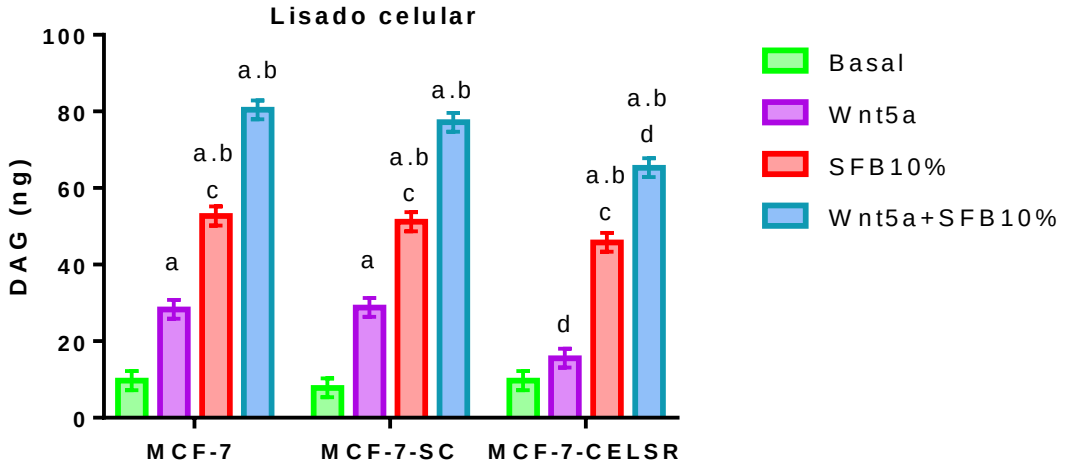

Figura 4-7 Efecto del silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3 en la cantidad de diacilglicerol en el lisado de la línea MCF-7.

MCF-7: Línea celular sin tratamiento. **MCF-7-SC:** Línea celular control con shRNA aleatorio. **MCF-7-CELSR:** Línea celular con silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3. Los cultivos se estimularon durante 24 h. Las letras en el gráfico indican las diferencias significativas a p<0.001 con: **a.** La condición basal, **b.** El estímulo Wnt5a, **c.** El estímulo Wnt5a+SFB10%, **d.** La misma condición de estímulo en la línea control MCF-7.

Al analizar la figura se observa que, en los lisados celulares al igual que en el sobrenadante, hay un aumento en la cantidad de DAG al comparar el estímulo con SFB 10% y la condición basal para todos los tratamientos.

A diferencia del análisis en el sobrenadante, en el lisado celular sí se presentan diferencias significativas entre la condición de estímulo del suero fetal bovino al 10% y la de suero fetal bovino al 10% con Wnt5a para todos los tratamientos. Dicho aumento en los niveles de DAG también se presenta en la línea celular estimulada con Wnt5a en ausencia de suero fetal bovino, que resulta diferencial para la línea en condiciones normales (MCF-7) y la línea tratada con la secuencia aleatoria (MCF-7-SC) pero no resulta significativamente diferente para la línea celular silenciada (MCF-7-CELSR).

Es importante resaltar que los niveles de DAG que se aumentan con los estímulos Wnt5a, SFB 10% y la combinación de ellos, se ven afectados por el silenciamiento de CELSR 1-3. Esto se evidencia en las diferencias significativas ($P<0.001$) que presenta la línea silenciada (MCF-7-CELSR) al compararse con la condición normal (MCF-7). Esta diferencia, puede presentarse debido a que CELSR se ha visto estabilizando la vía de señalización Wnt no canónica en otros modelos biológicos [26, 60] y al disminuirse su expresión, se evidencia una alteración de la activación de esta vía de señalización, en dónde DAG actúa como segundo mensajero y se aumenta en respuesta al estímulo [61, 62].

Es importante resaltar que los aumentos en los niveles de DAG mostrados en el presente estudio, no corresponden a cantidades adicionadas con los estímulos, ya que se realizó la normalización por cantidad de proteína por dilución previo al ensayo y se comparó con un control de estímulos que no tuvieron contacto con las células para los sobrenadantes y un control de células sin estímulo para los lisados. En el Anexo B se evidencia que no se encuentran diferencias en las absorbancias registradas al comparar los controles con las condiciones basales de los sobrenadantes y los lisados.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se identificaron los transcritos de CELSR 1, 2 y 3 en las líneas celulares de cáncer MCF-7, Jurkat y CCRF-CEM, con una expresión más alta en la línea celular de cáncer de seno.

La migración de la línea celular MCF-7 mediada por Wnt5a responde a la disminución de la expresión de CELSR, sugiriendo que este proceso fisiológico es dependiente de esta cadherina.

Los CELSR no contribuyen significativamente a la alteración de la actividad metabólica ni de la proliferación celular en la línea celular MCF-7.

La presencia de CELSR es necesaria para generar un aumento en la cantidad de DAG en respuesta a Wnt5a en la línea celular MCF-7.

5.2 Recomendaciones

A pesar que los receptores CELSR se expresan en una proporción más baja en las células de leucemia en comparación con MCF-7, sería interesante indagar sobre el papel de estos receptores en este tipo de linaje celular. Adicionalmente, sería interesante indagar en el papel que pudieran presentarse en líneas celulares que no expresaran algunas de las isoformas, o generar modelos de supresión completa de los receptores por estrategias como CRISPR. Debido a que la línea celular MCF-7 es una línea celular de cáncer de seno que presenta un fenotipo migratorio, pero con muy poco potencial invasivo [66], resultaría interesante realizar estudios en una línea celular invasiva, con el fin de identificar si estas cadherinas participan de manera relevante en procesos asociados a metástasis.

A. Anexo: Condiciones para determinar la expresión de CELSR 1-3 por qPCR

Gen	Secuencia de primers (5'-> 3')	Temperatura de anillamiento (°C)	Eficiencia
CELSR1	Forward primer ATTTGTACTTCTGCGGTGCT	61.0	1.70 (70%)
	Reverse primer GTCCGTAAACCGTCCCTTC		
CELSR2	Forward primer CCCTTAGGCTACCTGGTTCT	57.0	1.98 (98%)
	Reverse primer TGTGCCATTGTTGATGGTGA		
CELSR3	Forward primer GGACTACAAGCAGGAACGCT	58.0	2.06 (106%)
	Reverse primer TTTGAAAGACCGGCCGATGA		

Tabla A-1 Condiciones de amplificación para los genes de CELSR.

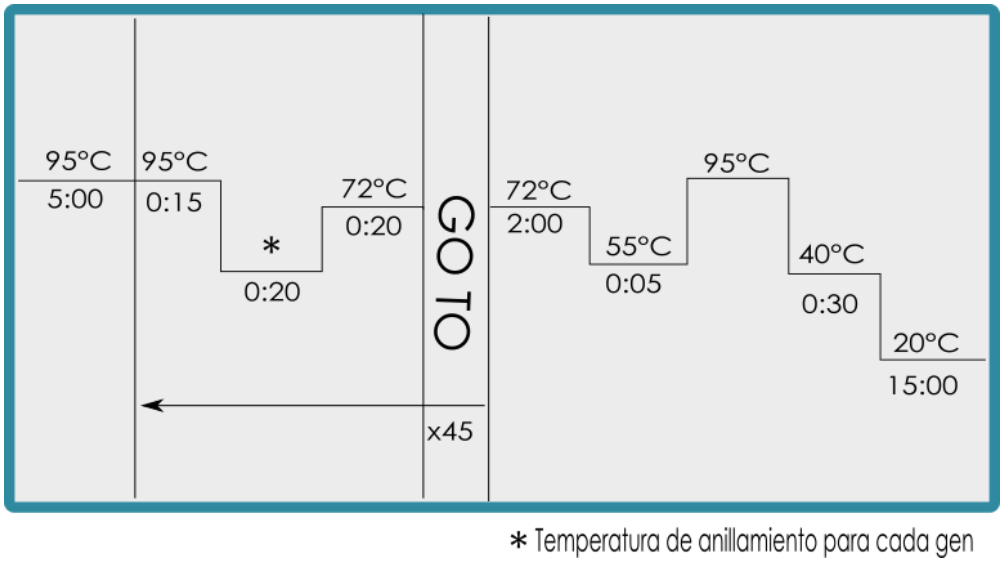

Figura A-1 Programa de amplificación por qPCR

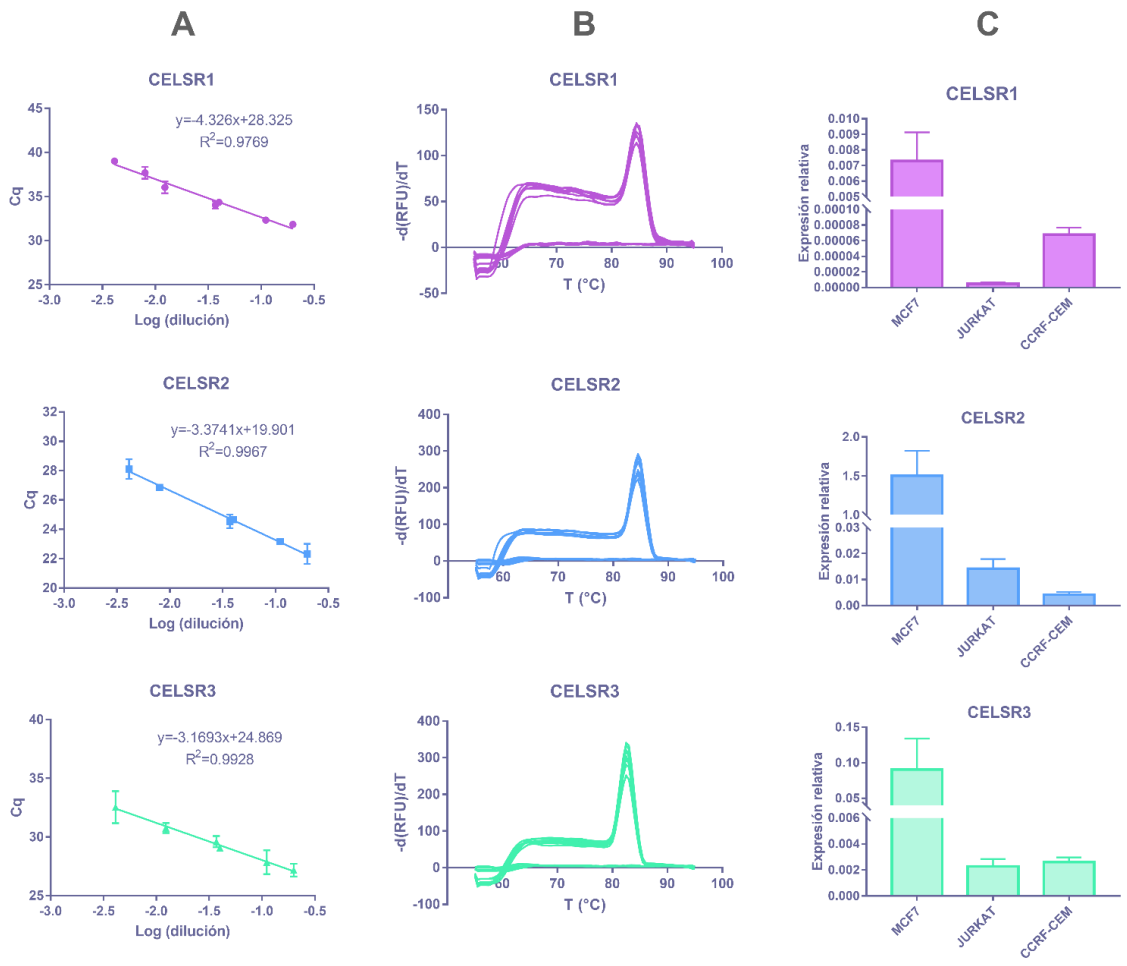

Figura A-2 – Expresión génica de CELSR 1,2 y 3. **A**-Curva de eficiencia con los 3 genes objetivo. **B**-Curva de melting. **C**- Expresión de los transcritos de cada una de las isoformas de CELSR relativa a los genes de referencia 18S y actina en la línea celular epitelial de cáncer de seno MCF7 y en las líneas celulares de leucemia linfoide aguda Jurkat y CCRF-CEM

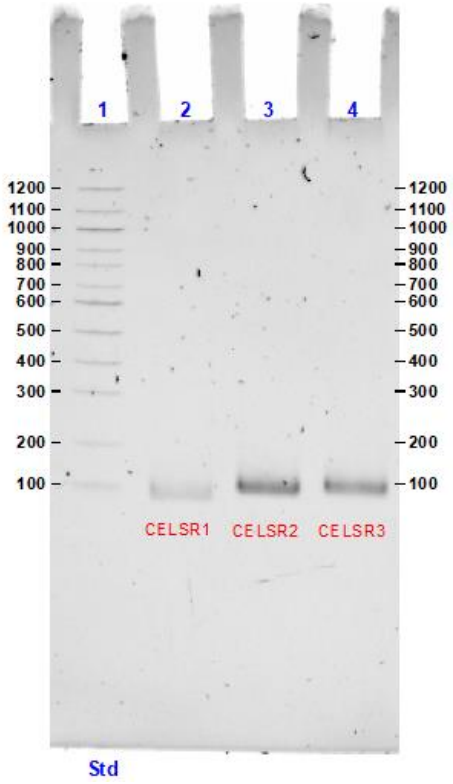

Figura A-3 - Amplicones de CELSR 1, 2 y 3 (de izquierda a derecha) corridos en un gel de agarosa al 2% en donde se evidencia un solo producto de amplificación

B. Anexo: Resultados de la cuantificación de diacilglicerol

Estímulo	Tratamiento	Cantidad de DAG (ng)	Desviación estándar
RPMI	MCF-7	9,70	2,46
	MCF-7-SC	7,83	2,47
	MCF-7-CELSR	9,70	2,47
Wnt5a	MCF-7	28,33	2,45
	MCF-7-SC	28,83	2,45
	MCF-7-CELSR	15,58	2,46
SFB	MCF-7	52,70	2,46
	MCF-7-SC	51,20	2,46
	MCF-7-CELSR	45,83	2,45
SFB + Wnt5a	MCF-7	80,45	2,51
	MCF-7-SC	77,20	2,50
	MCF-7-CELSR	65,33	2,48

Tabla B1- Cuantificación de diacilglicerol en el lisado de las células silenciadas de CELSR 1, 2 y 3 a 1 hora de estímulo.

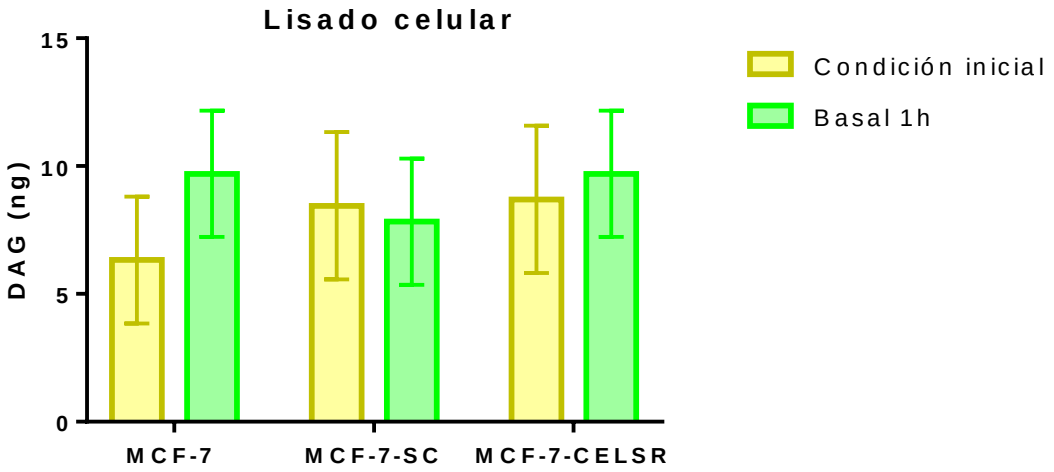

Figura B-1 Cuantificación de diacilglicerol en el lisado de las células silenciadas de CELSR 1, 2 y 3

Condición inicial: Medio RPMI a tiempo cero. **Basal 1h:** Medio RPMI luego de 1 hora de estímulo **MCF-7:** Línea celular sin tratamiento. **MCF-7-SC:** Línea celular con transducción de secuencia aleatoria. **MCF-7-CELSR:** Línea celular con silenciamiento de CELSR 1, 2 y 3.

Bibliografía

[1] K. Ebnet, D. Kummer, T. Steinbacher, A. Singh, M. Nakayama, and M. Matis, “Regulation of cell polarity by cell adhesion receptors,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 81, pp. 2–12, 2018, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.032.

[2] A. C. Humphries and M. Mlodzik, “From instruction to output: Wnt/PCP signaling in development and cancer,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 51, pp. 110–116, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.ceb.2017.12.005.

[3] A. M. Goffinet and F. Tissir, “Seven pass cadherins CELSR1-3,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 69, pp. 102–110, 2017, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.07.014.

[4] Y. Saito, R. R. Desai, and S. K. Muthuswamy, “Reinterpreting polarity and cancer: The changing landscape from tumor suppression to tumor promotion,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1869, no. 2, pp. 103–116, 2018, doi: 10.1016/j.bbcan.2017.12.001.

[5] GLOBOCAN 2018, “Cancer Today. Global Cancer Observatory,” 2019. https://gco.iarc.fr/today/home (accessed Aug. 10, 2020).

[6] K. Barzaman *et al.*, “Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 84, no. April, p. 106535, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.intimp.2020.106535.

[7] C. Rejon, M. Al-Masri, and L. McCaffrey, “Cell Polarity Proteins in Breast Cancer Progression,” *J. Cell. Biochem.*, no. March, pp. 2215–2223, 2016, doi: 10.1002/jcb.25553.

[8] S. J. Chatterjee and L. McCaffrey, “Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis,” *Breast Cancer Targets Ther.*, vol. 6, no. 0, pp. 15–27, 2014, doi: 10.2147/BCTT.S43764.

[9] A. H. Allam, M. Charnley, and S. M. Russell, “Context-Specific Mechanisms of Cell Polarity Regulation,” *J. Mol. Biol.*, vol. 430, no. 19, pp. 3457–3471,

2018, doi: 10.1016/j.jmb.2018.06.003.

[10] M. T. Butler and J. B. Wallingford, “Planar cell polarity in development and disease,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 6, pp. 375–388, 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.11.

[11] L. M. McCaffrey and I. G. Macara, “Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis,” *Trends Cell Biol.*, vol. 21, no. 12, pp. 727–735, 2011, doi: 10.1016/j.tcb.2011.06.005.

[12] C. F. Davey and C. B. Moens, “Planar cell polarity in moving cells: think globally, act locally,” *Development*, vol. 144, no. 2, pp. 187–200, 2017, doi: 10.1242/dev.122804.

[13] L. Huang and S. K. Muthuswamy, “Polarity protein alterations in carcinoma: a focus on emerging roles for polarity regulators,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 20, no. 1, pp. 41–50, 2010, doi: 10.1016/j.gde.2009.12.001.

[14] Y. Yang, “Wnt signaling in development and disease,” *Cell Biosci.*, vol. 2, no. 1, p. 14, 2012, doi: 10.1186/2045-3701-2-14.

[15] C. Y. Logan and R. Nusse, “The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 781–810, 2004, doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.

[16] R. Nusse and H. Clevers, “Wnt/β-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities,” *Cell*, vol. 169, no. 6, pp. 985–999, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016.

[17] E. Gómez-Orte, B. Sáenz-Narciso, S. Moreno, and J. Cabello, “Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway,” *Trends Genet.*, vol. 29, no. 9, pp. 545–553, 2013, doi: 10.1016/j.tig.2013.06.003.

[18] J. Brasch, O. J. Harrison, B. Honig, and L. Shapiro, “Thinking outside the cell: How cadherins drive adhesion,” *Trends Cell Biol.*, vol. 22, no. 6, pp. 299–310, 2012, doi: 10.1016/j.tcb.2012.03.004.

[19] I. S. Gul, P. Hulpiau, Y. Saeys, and F. van Roy, “Evolution and diversity of cadherins and catenins,” *Exp. Cell Res.*, vol. 358, no. 1, pp. 3–9, 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.001.

[20] P. Hulpiau and F. van Roy, “Molecular evolution of the cadherin

superfamily," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 2, pp. 349–369, 2009, doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.027.

[21] A. Kourtidis, R. Lu, L. J. Pence, and P. Z. Anastasiadis, "A central role for cadherin signaling in cancer," *Exp. Cell Res.*, vol. 358, no. 1, pp. 78–85, 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.04.006.

[22] A. V. Priest, O. Shafraz, and S. Sivasankar, "Biophysical basis of cadherin mediated cell-cell adhesion," *Exp. Cell Res.*, vol. 358, no. 1, pp. 10–13, 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.015.

[23] F. van Roy, "Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 2, pp. 121–134, 2014, doi: 10.1038/nrc3647.

[24] M. Sotomayor, R. Gaudet, and D. P. Corey, "Sorting out a promiscuous superfamily: Towards cadherin connectomics," *Trends Cell Biol.*, vol. 24, no. 9, pp. 524–536, 2014, doi: 10.1016/j.tcb.2014.03.007.

[25] C. J. Formstone, "7TM-Cadherins: Developmental Roles and Future Challenges," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 706, 2010, pp. 14–36.

[26] W. S. Chen *et al.*, "Asymmetric Homotypic Interactions of the Atypical Cadherin Flamingo Mediate Intercellular Polarity Signaling," *Cell*, vol. 133, no. 6, pp. 1093–1105, 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.04.048.

[27] C. J. Formstone and P. F. R. Little, "The flamingo-related mouse Celsr family (Celsr1-3) genes exhibit distinct patterns of expression during embryonic development," *Mech. Dev.*, vol. 109, no. 1, pp. 91–94, 2001, doi: 10.1016/S0925-4773(01)00515-9.

[28] P. Arvind, J. Nair, S. Jambunathan, K. Vijay, and J. Shanker, "CELSR2-PSRC1-SORT1 gene expression and association with coronary artery disease and plasma lipid levels in an Asian Indian cohort," *J. Cardiol.*, vol. 64, no. 5, pp. 339–346, 2014, doi: 10.1016/j.jjcc.2014.02.012.

[29] T. Vilboux *et al.*, "CELSR2, encoding a planar cell polarity protein, is a putative gene in Joubert syndrome with cortical heterotopia,

microophthalmia, and growth hormone deficiency," *Am. J. Med. Genet. Part A*, vol. 173, no. 3, pp. 661–666, 2017, doi: 10.1002/ajmg.a.38005.

[30] E. Einarsdottir *et al.*, "CELSR2 is a candidate susceptibility gene in idiopathic scoliosis," *PLoS One*, vol. 12, no. 12, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0189591.

[31] X. J. Wang *et al.*, "Understanding cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptors," *J. Neurochem.*, vol. 131, no. 6, pp. 699–711, 2015, doi: 10.1111/jnc.12955.

[32] M. Kaucká *et al.*, "The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of b-lymphocyte migration," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 5, pp. 1491–1501, 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1752.

[33] K. VanderVorst, J. Hatakeyama, A. Berg, H. Lee, and K. L. Carraway, "Cellular and molecular mechanisms underlying planar cell polarity pathway contributions to cancer malignancy," *Semin. Cell Dev. Biol.*, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.026.

[34] D. Nagarajan and S. E. B. McArdle, "Immune Landscape of Breast Cancers," *Biomedicines*, vol. 6, no. 1, p. 20, Feb. 2018, doi: 10.3390/biomedicines6010020.

[35] M. K. Hasan *et al.*, "Wnt5a induces ROR1 to recruit cortactin to promote breast-cancer migration and metastasis," *npj Breast Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1038/s41523-019-0131-9.

[36] K. VanderVorst, C. A. Dreyer, S. E. Konopelski, H. Lee, H. Y. H. Ho, and K. L. Carraway, "Wnt/PCP signaling contribution to carcinoma collective cell migration and metastasis," *Cancer Res.*, vol. 79, no. 8, pp. 1719–1729, 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2757.

[37] R. Zeng *et al.*, "Multiple roles of WNT5A in breast cancer," *Med. Sci. Monit.*, vol. 22, pp. 5058–5067, 2016, doi: 10.12659/MSM.902022.

[38] Y. Zhu *et al.*, "Rab35 is required for Wnt5a/Dvl2-induced Rac1 activation and cell migration in MCF-7 breast cancer cells," *Cell. Signal.*, vol. 25, no. 5, pp. 1075–1085, 2013, doi: 10.1016/j.cellsig.2013.01.015.

[39] Y. Zhu *et al.*, “Dvl2-Dependent Activation of Daam1 and RhoA Regulates Wnt5a-Induced Breast Cancer Cell Migration,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e37823, May 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037823.

[40] W. Strober, “Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 111, no. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015, doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.

[41] Y. Jian, C. George, Z. Irena, C. Ioana, R. Steve, and L. Madden Thomas, “Primer- BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction,” *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, p. 134, 2012.

[42] P. Stothard, “The Sequence Manipulation Suite,” *Biotechniques*, vol. 28, no. 6, 2000, doi: 10.2144/00286ir01.

[43] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 9, pp. 45e – 45, May 2001, doi: 10.1093/nar/29.9.e45.

[44] J. Schindelin *et al.*, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.

[45] H. A. Safdari, S. Pandey, A. K. Shukla, and S. Dutta, “Illuminating GPCR Signaling by Cryo-EM,” *Trends Cell Biol.*, vol. 28, no. 8, pp. 591–594, 2018, doi: 10.1016/j.tcb.2018.06.002.

[46] D. Hilger, M. Masureel, and B. K. Kobilka, “Structure and dynamics of GPCR signaling complexes,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 25, no. 1, pp. 4–12, 2018, doi: 10.1038/s41594-017-0011-7.

[47] R. Petryszak *et al.*, “Expression Atlas update - An integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. D1, pp. D746–D752, 2016, doi: 10.1093/nar/gkv1045.

[48] N. Manjunath, H. Wu, S. Subramanya, and P. Shankar, “Lentiviral delivery of short hairpin RNAs,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 9, pp. 732–745, 2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.03.004.

[49] A. Alfranca, M. R. Campanero, and J. M. Redondo, “New Methods for

Disease Modeling Using Lentiviral Vectors," *Trends Mol. Med.*, vol. 24, no. 10, pp. 825–837, 2018, doi: 10.1016/j.molmed.2018.08.001.

[50] C. Borsotti, E. Borroni, and A. Follenzi, "Lentiviral vector interactions with the host cell," *Curr. Opin. Virol.*, vol. 21, pp. 102–108, 2016, doi: 10.1016/j.coviro.2016.08.016.

[51] S. Etienne-Manneville, "Polarity proteins in migration and invasion," *Oncogene*, vol. 27, no. 55, pp. 6970–6980, 2008, doi: 10.1038/onc.2008.347.

[52] N. Prieto-Dominguez, C. Parnell, and Y. Teng, "Drugging the Small GTPase Pathways in Cancer Treatment: Promises and Challenges," *Cells*, vol. 8, no. 3, p. 255, 2019, doi: 10.3390/cells8030255.

[53] P. Aspenström, "Integration of signalling pathways regulated by small GTPases and calcium," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1742, no. 1–3, pp. 51–58, 2004, doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.029.

[54] H. Wada, H. Tanaka, S. Nakayama, M. Iwasaki, and H. Okamoto, "Frizzled3a and Celsr2 function in the neuroepithelium to regulate migration of facial motor neurons in the developing zebrafish hindbrain," *Development*, vol. 133, no. 23, pp. 4749–4759, 2006, doi: 10.1242/dev.02665.

[55] Y. Qu *et al.*, "Atypical cadherins Celsr1-3 differentially regulate migration of facial branchiomotor neurons in mice," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 28, pp. 9392–9401, 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0124-10.2010.

[56] K. S. K. S. Louis and A. C. A. C. Siegel, "Mammalian Cell Viability," in *Methods in Molecular Biology*, vol. 740, no. 1, 2011, p. p.7-12.

[57] P. Kumar, A. Nagarajan, and P. D. Uchil, "Analysis of cell viability by the MTT assay," *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2018, no. 6, pp. 469–471, 2018, doi: 10.1101/pdb.prot095505.

[58] D. C. Wright, "Mechanisms of calcium-induced mitochondrial biogenesis and GLUT4 synthesis," *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, vol. 32, no. 5, pp. 840–845, 2007, doi: 10.1139/H07-062.

[59] Y. Rai *et al.*, "Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth

inhibition," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19930-w.

[60] S. Carrasco and I. Mérida, "Diacylglycerol, when simplicity becomes complex," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 27–36, 2007, doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.004.

[61] S. U. Jayasinghe, A. T. Tankeu, and F. Amati, "Reassessing the Role of Diacylglycerols in Insulin Resistance," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 30, no. 9, pp. 618–635, 2019, doi: 10.1016/j.tem.2019.06.005.

[62] J. C. Gómez-Fernández and S. Corbalán-García, "Diacylglycerols, multivalent membrane modulators," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 148, no. 1, pp. 1–25, 2007, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.04.003.

[63] T. Usui *et al.*, "Flamingo, a seven-pass transmembrane cadherin, regulates planar cell polarity under the control of Frizzled," *Cell*, vol. 98, no. 5, pp. 585–595, 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80046-X.

[64] D. Devenport, "The cell biology of planar cell polarity," *J. Cell Biol.*, vol. 207, no. 2, pp. 171–179, 2014, doi: 10.1083/jcb.201408039.

[65] L. B. Luna-Ulloa, J. G. Hernández-Maqueda, M. C. Castañeda-Patlán, and M. Robles-Flores, "Protein kinase C in Wnt signaling: Implications in cancer initiation and progression," *IUBMB Life*, vol. 63, no. 10, pp. 915–921, 2011, doi: 10.1002/iub.559.

[66] Ş. Comşa, A. M. Cîmpean, and M. Raica, "The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research.," *Anticancer Res.*, vol. 35, no. 6, pp. 3147–54, Jun. 2015, [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026074.