



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Área Biología Celular y Molecular

ASOCIACIÓN DE SALL2 Y VÍA WNT/ β -CATENINA EN CÁNCER DE COLON.

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

ARACELLY SCARLET QUIROZ LAGOS

CONCEPCIÓN – CHILE

2023

Profesor Guía: Roxana Jacqueline Pincheira Barrera.

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular,

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Transduccion de Senales y Cáncer.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Roxana Pincheira Barrera
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Violeta Morín
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Viviana Torres
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Carmen Gloria Ili
Universidad La Frontera, Temuco

Dr. Ariel Castro
Director (S) Programa Doctorado
en Ciencias Biológicas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS:	7
ÍNDICE TABLAS:	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN:	12
ABSTRACT	14
1.- INTRODUCCIÓN:	15
1.1.- Cáncer colorrectal:	15
1.2.- Vía Wnt/ β -catenina en contexto normal y su asociación con el cáncer colorrectal	23
1.3.- Familia SALL y vía Wnt:	27
1.4.- SALL2:	29
1.4.1.- Factor de transcripción SALL2 y su asociación con cáncer	29
1.4.2.- Asociación de SALL2 y la vía Wnt en cáncer de colon	32
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	35
3.- HIPÓTESIS:	36
4.- OBJETIVO GENERAL:	36
5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	36
OBJETIVO ESPECÍFICO 1.	36
OBJETIVO ESPECÍFICO 2.	36
OBJETIVO ESPECÍFICO 3.	36
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1.- Reactivos:	37
6.2.- Análisis Bioinformáticos:	37
6.2.1.- MI PANDA.....	37
6.2.2.- UALCAN.....	37
6.2.3.- GEPIA	37
6.2.4.- DeapMap.....	38
6.2.5.- cBioPortal.....	38
6.2.6.- TIMER 2.0.....	38
6.2.7.- SURV EXPRESS.....	38
6.3.- Análisis de expresión diferencial en R Studio:.....	39
6.4.- Inmunohistoquímica en biopsias de pacientes:	39
6.4.1.- Selección de pacientes:.....	39

6.4.2.- Inmunohistoquímica (IHQ):.....	39
6.5.- Interpretación de datos de Inmunohistoquímica:.....	40
6.5.1.- SALL2	40
6.5.2.- β -Catenina	40
6.5.3.- Ki-67.....	41
6.6.- Inmunohistoquímica multiplex:.....	41
6.6.1.- Análisis Inmunohistoquímica multiplex:	42
6.7.- Cultivo Celular	42
6.8.- Generación modelo CRISPR-Cas9.....	43
6.9.- Medio condicionado (L-WRN):.....	43
6.10.- Generación de pellets citológicos desde líneas celulares:.....	44
6.11.- Inmunocitoquímica	44
6.11.1.- Análisis de imágenes de inmunocitoquímica:	44
6.12.- Inmunoblot:.....	45
6.13.- Fraccionamiento subcelular (núcleo-citoplasma).	45
6.14.- Extracción de ARN y generación de ADNc.	46
6.15.- PCR cuantitativa en tiempo real.....	46
6.15.1.- Diseño de partidores:.....	46
6.15.2.-PCR cuantitativo:	47
6.16.- Ensayo de reportero.....	47
6.17.- Inmunoprecipitación de cromatina:	48
6.18.- Ensayo de Proliferación	49
6.19.- Estandarización esquema de tratamientos 5-FU y XAV939:	49
6.19.1.- Calceína.....	49
6.19.2.- XTT	49
6.20.- Transformación bacteriana.....	50
6.21.- Purificación de plásmidos Midi-Prep.....	50
6.22.- Electroforesis de ADN	50
6.23.- Transfección transiente	51
6.23.1.- Fosfato de calcio:.....	51
6.23.2.- Electroporación:.....	51
6.24.- Análisis estadísticos:	52
7.-RESULTADOS:	57
7.1 OBJETIVO I: Determinar la expresión espacio-temporal de SALL2 en la progresión del cáncer de colon.....	57

7.1.1.- Análisis masivos de datos de expresión génica muestran que SALL2 presenta baja expresión en cáncer de colon.	57
7.1.2- Expresión de SALL2 en tejidos de colon normal, adenoma y cáncer.	60
7.1.3- Asociación de expresión de SALL2 entre factores pronósticos y características clínicas de la cohorte de estudio.	66
7.1.3- Expresión de SALL2 en el nicho de células madre en la cripta del colon.	77
7.1.4- Expresión de SALL2 en el estroma de tejido de colon humano.	79
7.1.5- Expresión de SALL2 en líneas celulares de colon normal y cáncer.	83
7.2.- OBJETIVO II: Definir la relación funcional entre SALL2 y la vía Wnt.	85
7.2.1.- Definir la relación entre SALL2 y Vía Wnt/ β -catenina.	85
7.2.2.- Modulación de la expresión de SALL2 por la vía Wnt/ β -catenina.	97
7.3.- OBJETIVO III: Definir blancos transcripcionales de SALL2 con impacto en la vía Wnt/ β -catenina.	106
7.3.1.- AXIN2, un nuevo blanco transcripcional de SALL2.	106
7.3.2.- Relación funcional entre SALL2-AXIN2.	120
8.- DISCUSIÓN:	125
8.1.- OBJETIVO I: Determinar la expresión espacio-temporal de SALL2 en la progresión del cáncer de colon.	125
8.2.- OBJETIVO II: Definir la relación funcional entre SALL2 y la vía Wnt.	129
8.3.- OBJETIVO III: Definir blancos transcripcionales de SALL2 con impacto en la vía Wnt/ β -catenina.	10629
9.-CONCLUSIONES:	
OBJETIVO 1:	134
OBJETIVO 2:	134
OBJETIVO 3:	134
10.-AGRADECIMIENTOS:	136
11.-REFERENCIAS:	137
12.-ANEXOS	149
Anexo 1: SALL2 se encuentra mutado en un 1,5% de muestras de CCR (Cbioportal).	149
Anexo 2: Análisis de frecuencias de mutaciones de SALL2 en diferentes cánceres (TIMER 2.0).....	150
Anexo 3: Acta de aprobación de estudio otorgado por el Comité Ético-Científico del Servicio de Salud Concepción.....	151
Anexo 4: Acta de aprobación de estudio, comité de Bioética y Bioseguridad. Facultad Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.	152

Anexo 5: Células SALL2 -/- presentan mayores niveles de β -catenina nuclear en comparación con SALL2+/+ (video).	153
Anexo 6: Diseño y estandarización de los partidores para CHIP-qPCR de AXIN2.....	154
Anexo 7: Estandarización de tiempo y concentración de 5-FU y XAV939 en células de CCR.....	156
Anexo 8: La expresión de SALL2 E1A disminuye la proliferación frente al tratamiento con XAV939 y 5-FU.	157

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Composición de la mucosa del intestino grueso (o colon).....	16
Figura 2: Estructura celular básica entre la cripta del intestino y el estroma.....	18
Figura 3: Progresión del adenocarcinoma de colon	22
Figura 4: Vía Wnt/ β -catenina o Vía Wnt canónica.....	26
Figura 5: gen de SALL2 y blancos transcripcionales	31
Figura 6: Modelo de estudio propuesto. Se postula que	35
Figura 7: La expresión de ARNm de <i>SALL2</i> se encuentra disminuida en cáncer de colon, comparando con tejido normal.....	59
Figura 8: Estandarización de condiciones para IHQ de SALL2.	62
Figura 9: Expresión proteica de SALL2 en tejidos humanos de una cohorte chilena de estudio	65
Figura 10: Controles positivos para la tinción de Inmunohistoquímica de β -catenina, Ki67, SALL4 y Vimentina.	67
Figura 11: Relación negativa entre la expresión de SALL2, permeación linfovascular, y β -catenina nuclear.	70
Figura 12: Expresión de SALL4 en tejido de colon.	71
Figura 13: Expresión de Ki67 en muestras positivas y negativas para SALL2.	72
Figura 14: Pacientes con expresión disminuida de SALL2 muestran menor sobrevida general en CCR.....	74
Figura 15: Pacientes con expresión disminuida de SALL2 muestran menor sobrevida general en CCR.....	75
Figura 16: SALL2 nuclear se localiza en el nicho de células madre en tejido normal de colon.	78
Figura 17: Localización de SALL2 en el estroma del tejido de colon normal y el microambiente tumoral de tejidos de CCR.	82
Figura 18: Pérdida de la expresión de SALL2 en líneas celulares de CCR.	84
Figura 19. Modelo generado de pérdida de función de SALL2.....	85
Figura 20: La pérdida de función de SALL2, incrementa los niveles de β -catenina nuclear.	86
Figura 21: La pérdida de función de SALL2, incrementa los niveles de β -catenina nuclear y la ganancia de función, revierte el fenotipo.	88
Figura 22: SALL2 regula genes asociados a la vía Wnt canónica.....	90
Figura 23: La pérdida de SALL2 disminuye la expresión de reguladores negativos y aumenta la expresión de reguladores positivos de la vía en células de epitelio de colon no tumorogénico	91

Figura 24: SALL2 correlaciona positivamente con reguladores negativos de la vía Wnt en células SW480.....	94
Figura 25: La inducción de SALL2 con doxiciclina correlaciona positivamente con reguladores negativos de la vía Wnt en células HT-29.....	95
Figura 26: El déficit de SALL2, disminuye la expresión de reguladores negativos de la vía.	96
Figura 27: Estandarización de activadores de la vía Wnt canónica.....	98
Figura 28: Los niveles proteicos de SALL2 son regulados por la activación de la vía Wnt en células CCD-841-CoN.....	99
Figura 29: Los niveles proteicos de SALL2 son regulados por la activación de la vía Wnt en células de epitelio de colon normal, y en células SW480.	99
Figura 30: SALL2 incrementa sus niveles nucleares a las 4 horas de activación de la vía Wnt canónica.....	100
Figura 31: La activación por ligandos de la vía Wnt canónica aumenta los niveles proteicos de SALL2.....	102
Figura 32: La expresión proteica de SALL2 es modulada por la vía Wnt en células SW480.	104
Figura 33: La expresión proteica de SALL2 es modulada por la vía Wnt.....	105
Figura 34: SALL2 mutado genera cambios en la expresión diferencial de AXIN2 en CCR (COAD).	107
Figura 35: Correlaciones bioinformáticas positivas entre expresión de SALL2 y AXIN2.	108
Figura 36: El aumento de AXIN2 por activación de la vía (CHIR99021 o LiCl) depende de la expresión de SALL2.....	110
Figura 37: Células SALL2+/+ expresan mayores niveles de AXIN2 en presencia de CHIR99021 o LiCl.....	111
Figura 38: La actividad transcripcional del promotor de AXIN2 aumenta al inducir SALL2.....	112
Figura 39: SALL2 E1A se une al promotor de AXIN2 humano.....	114
Figura 40: La expresión de SALL2, incrementa los niveles proteicos y de ARNm de AXIN2 en células normales de colon y de cáncer de colon.....	116
Figura 41: La inducción de SALL2 incrementa los niveles de AXIN2.....	119
Figura 42: El aumento de AXIN2 por inhibición de tankyrasa (XAV939) depende de la expresión de SALL2.....	121
Figura 43: La proliferación disminuye por el inhibidor XAV939, dependiente de SALL2.	123
Figura 44: El tratamiento con XAV939 incrementa la expresión de proteínas apoptóticas en células SALL2+/+.....	124
Figura 45: Proyección del estudio:.....	133
Figura 46: Modelo Final: SALL2 induce la expresión del regulador negativo de la vía AXIN2, disminuyendo los niveles nucleares del activador de la vía Wnt, β -catenina.....	135

ÍNDICE TABLAS:

Tabla 1: Plásmidos utilizados en el proyecto.....	53
Tabla 2: Partidores utilizados en el proyecto.....	54
Tabla 3: Anticuerpos primarios usados en el proyecto.....	55
Tabla 4: Anticuerpos secundarios.....	56
Tabla 5: Resultados de análisis de expresión diferencial de SALL2 en diferentes estudios de colon, recto y colorrectal.	58
Tabla 6: Inmunohistoquímica de SALL2 en tejidos humanos.	60
Tabla 7: Características demográficas de la cohorte de estudio.	63
Tabla 8: Características clínicas de la cohorte de estudio.	76
Tabla 9: Genética de líneas celulares usadas.....	83

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARN-seq: secuenciación de ácido ribonucleico

BSA: "Bovine serum albumin"

ChIP: "Chromatin Immunoprecipitation"

CRISPR: "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats"

c-Myc: "V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog"

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle Medium"

DMSO: Dimetilsulfóxido

ESC: "Embryonic Stem Cell"

FBS: "Fetal Bovine Serum"

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa.

GBM: Glioblastoma.

GSK-3: Glycogen Synthase Kinase 3 (Glucógeno Sintasa Quinasa 3).

HA: Epítotope de Hemaglutinina, derivado de virus de la influenza humana.

HBS: Tampón HEPES Salino.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

KO: "Knockout"

LB: Luria-Bertani

LiCl: "Lithium chloride"

mARN: Ácido ribonucleico mensajero

NaCl: "Sodium Chloride"

NP-40: "Nonyl phenoxy polyethoxy ethanol"

PBS: "Phosphate-Buffered Saline"

PCR: "Polymerase Chain Reaction"

SDS: "Sodium Dodecyl Sulfate"

SDS-PAGE: "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis"

SNP: "Single Nucleotide Polymorphism"

TAE: "Tris base, Acetic acid and EDTA"

TE: "Tris + EDTA"

TBS: Townes- Brock Syndrome.

TEMED: N, N,N',N'-tetramethylethylenediamine.

Tris-HCl: "Tris base + hydrochloric acid"

TBS: "Tris-buffered saline"

WT: "Wild Type"

RESUMEN:

SALL2 es un factor de transcripción implicado en el desarrollo embrionario, y funcionalmente se relaciona con la regulación de la proliferación, migración y supervivencia celular. Análisis de datos masivos de cáncer versus tejidos normales indican que el ARNm de *SALL2* se encuentra significativamente disminuido en el cáncer colorrectal (CCR), un tipo de cáncer caracterizado por la hiperactivación de la vía Wnt/ β -catenina. De manera interesante, análisis previos de Inmunoprecipitación de cromatina-secuenciación (ChIP-seq) del laboratorio sugirien que *SALL2* regula genes asociados con la vía Wnt. Sin embargo, a la fecha no se ha caracterizado la expresión proteica de *SALL2* en tejidos de colon normal o CCR. Por otra parte, se desconoce el rol de *SALL2* en CCR y su relación con la vía Wnt.

Para caracterizar la expresión de *SALL2* en tejidos de colon, se construyó un *tissue microarray* usando 130 biopsias de archivo del Hospital Guillermo Gantt Benavente incluyendo colon normal, adenoma y CCR, y se evaluó la expresión y localización de *SALL2* mediante inmunohistoquímica. Encontramos que *SALL2* se expresa en el núcleo y el citoplasma del epitelio, y en el estroma del colon normal se expresa en fibroblastos. Sin embargo, su expresión está disminuida en el adenoma y ausente en el CCR, coincidiendo con los resultados bioinformáticos previos. En biopsias de CCR observamos una correlación negativa entre la expresión de *SALL2* y la expresión de β -catenina nuclear en el frente migratorio, un marcador pronóstico. Esta correlación se confirmó en células CCR con ganancia y pérdida de función de *SALL2* a través de inmunofluorescencia y fraccionamiento subcelular. Además, evaluamos la dependencia de *SALL2* en la expresión de blancos de la vía Wnt por Western blot y qRT-PCR, encontrando una correlación positiva entre *SALL2* y *AXIN2*, un importante regulador negativo de la vía Wnt.

El análisis del promotor de *AXIN2* identificó varios sitios de unión putativos de *SALL2*. A nivel mecanístico demostramos que la inducción de *SALL2* en modelos celulares doxiciclina inducible, aumenta la actividad del promotor de *AXIN2*. A través de ChIP-PCR demostramos que *SALL2* se une a la porción proximal del promotor de *AXIN2*, lo que confirma una regulación transcripcional dependiente de *SALL2*. Finalmente, mostramos que el eje *SALL2*-*AXIN2* es necesario para la respuesta de supervivencia a XAV939, un inhibidor de la vía Wnt.

En conclusión, nuestro estudio confirma que SALL2 regula positivamente la transcripción de *AXIN2*. Se propone que la pérdida de la expresión de SALL2 durante la progresión del CCR contribuye a la disminución de los niveles de AXIN2, lo que contribuye a la hiperactivación de la vía Wnt.

ABSTRACT

SALL2 is a developmental transcription factor involved in the regulation of cell proliferation, migration, and survival. Massive data analyses of cancer versus normal tissues indicated that *SALL2* mRNA significantly decreases in colorectal cancer (CRC), a cancer type characterized by Wnt pathway hyperactivation. Interestingly, our unpublished ChIP-seq data analyses suggested that SALL2 regulates genes associated with the Wnt pathway, involved in the development and progression of solid tumors, including CRC. However, the role of SALL2 in CRC and its relationship with the Wnt pathway are yet unknown.

We constructed a *tissue microarray* of 130 samples from Guillermo Gantt Benavente's Hospital comprising normal colon, adenoma, and CRC to evaluate the expression and cellular location of SALL2 in normal tissues and during CRC progression by immunohistochemistry. We found that SALL2 expresses in the nucleus and cytoplasm of the normal colon epithelium and the stroma. However, its expression decreases in adenoma and is absent in CRC. We noted a negative correlation between SALL2 expression and the expression of nuclear β -catenin, a marker of progression and activation of the Wnt pathway, at the migratory front. Subcellular fractionation and immunofluorescence experiments in CRC cells with gain and loss of SALL2 function support the negative correlation between SALL2 expression and nuclear β -catenin. Additionally, we evaluated the expression of Wnt targets by Western blot and qRT-PCR, finding a positive correlation between SALL2 and AXIN2, a negative regulator of the Wnt pathway.

Analysis of *AXIN2* promoter identified several putative SALL2 binding sites, and the induction of SALL2 increases *AXIN2* promoter activity in SALL2 knockout models. In addition, using ChIP-PCR we found that SALL2 binds to the proximal region in *AXIN2* promoter, confirming a SALL2- dependent transcriptional regulation. Finally, we show that the SALL2-AXIN2 axis is required for the antiproliferative, and apoptotic response to XAV939, an inhibitor of the Wnt pathway.

In conclusion our study confirms that SALL2 positively regulates the transcription of *AXIN2*. We proposed that the loss of *SALL2* expression during CRC progression contributes to the decrease of *AXIN2* levels, and the hyperactivation of the Wnt pathway.

1.- INTRODUCCIÓN:

1.1.- Cáncer colorrectal:

El cáncer es definido como una neoplasia maligna o un proceso de crecimiento anormal y de expansión de células que producen un tumor, el cual suele invadir tejidos adyacentes, llegando a provocar la metástasis a distancia. En el año 2019, la patología de cáncer se constituye como la primera causa de muerte en nuestro país, quedando por sobre los accidentes cardiovasculares. Es relevante mencionar que la sobrevida de los pacientes sigue siendo baja con un 64,7% a los 5 años (Fabregas et al., 2022).

Entre los distintos tipos de cáncer sólidos existentes, al año 2020 el cáncer colorrectal (CCR) constituye el tercer cáncer con mayor incidencia (10%) y el segundo en mortalidad (9.4%) a nivel mundial. A nivel nacional, el CCR es el tercer cáncer con mayor incidencia, ocasionando aproximadamente 3.000 muertes por año (GLOBOCAN, 2020).

El cáncer colorrectal (CCR) se desarrolla en el intestino grueso, el cual anatómicamente se subdivide en colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoideo.

La función fisiológica del colon es la de reabsorción de agua y electrolitos, acorde con esta función histológicamente la mucosa colónica es plana, no posee vellosidades y está formada por glándulas tubulares profundas o también conocidas como criptas de Lieberkühn (**Figura 1**). La mucosa de colon se compone de un epitelio cilíndrico simple, luego un tejido conectivo laxo llamado lámina propia, y la muscular de la mucosa. Adyacente a la mucosa del colon, se tiene la submucosa, las capas musculares y finalmente una serosa.

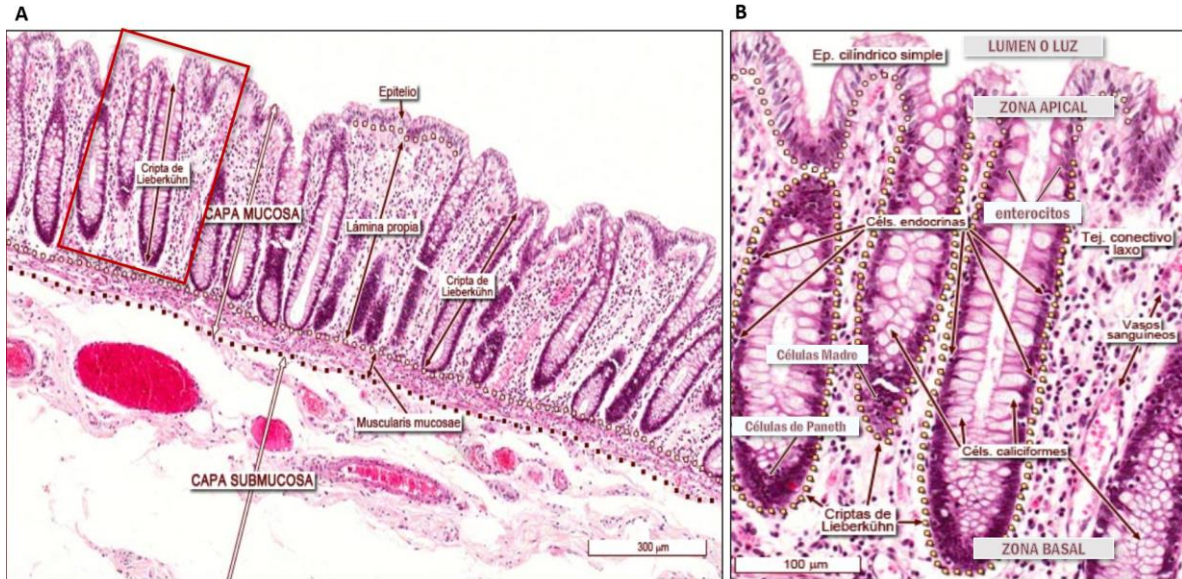


Figura 1: Composición de la mucosa del intestino grueso (o colon). **A)** La mucosa de colon contiene glándulas tubulares simples rectas no ramificadas denominadas criptas de Lieberkühn, que se extienden hasta la muscular de la mucosa (*muscularis mucosae*). La mucosa se compone del epitelio, el cual corresponde a un epitelio cilíndrico simple, de tejido conectivo llamado “lámina propia” y una capa muscular lisa, conocida como la muscular de la mucosa. **B)** Zoom digital de la zona encerrada en rojo en A, se observan tres criptas de Lieberkühn. En la zona basal de la cripta se encuentran las células de Paneth y células madre. Hacia la luz del colon o zona apical, se encuentran los enterocitos, células caliciformes y células endocrinas aisladas. Fuente: Modificado de <http://wzar.unizar.es/acad/histologia/> (Ross, 2008).

La cripta de Lieberkühn se encuentra tapizada de un epitelio columnar simple, compuesta de **enterocitos** (o células absortivas) y células **caliciformes**. Los enterocitos se encargan de la función absortiva del colon y las células caliciformes corresponden a glándulas mucosas unicelulares, que se encargan de lubricar la luz del órgano y tapizan el 80-90% del epitelio de la mucosa del colon. Las **células de Paneth** localizadas en la base de la cripta mantienen la flora intestinal en equilibrio a través de la secreción de proteínas y péptidos antimicrobianos. En la cripta del colon, histológicamente no existen células de Paneth con gránulos acidófilos en su citoplasma como en la cripta del intestino delgado. Sin embargo, tienen funciones análogas y reciben el nombre de “células de Paneth-like” (Peduto et al., 2018). Adicionalmente, existen células endocrinas cuya función es la motilidad y secreción local de enzimas. A partir del epitelio que cubre la cripta colónica es que se origina el CCR, específicamente en los enterocitos (Pawlina, 2015). En la lámina propia o estroma, es decir, el tejido conectivo que rodea a las glándulas del colon existe células estromales como fibroblastos, macrófagos o linfocitos que se encargan de secretar ligandos que impactan a la cripta respecto a proliferación celular y respuesta inmune.

La regulación de la homeostasis colónica se desenvuelve en las criptas del colon, que se divide en tres zonas: Zona proliferativa o “nicho de células madre”, zona de amplificación transitoria y zona de diferenciación. La zona proliferativa mantiene la regeneración homeostática del epitelio por acción de la vía *Wnt/β*-catenina, promoviendo el estado proliferativo indiferenciado de las **células madres** (CM), conocidas como “células LGR5+”. Una vez que migran de la base de la cripta, las CM proliferan e ingresan a la zona de amplificación transitoria, región intermedia entre la zona proliferativa y la zona de diferenciación. En la zona de diferenciación, ocurre la diferenciación final de todas las estirpes celulares que cumplen diversas funciones homeostáticas intestinales, incluyendo enterocitos, células caliciformes y células endocrinas (Zhu et al., 2021). Este proceso, a su vez, es regulado a través de la secreción de ligandos provenientes de las células de Paneth-like y de fibroblastos estromales, estirpes pertenecientes al nicho de células madre de la cripta del colon (Barker et al., 2013).

Entre la cripta y el estroma existe una constante comunicación entre sus componentes celulares e interacciones de señales relacionados con los gradientes de concentración de los ligandos. En la base de la cripta junto con el estroma que lo rodea existe una gran concentración de ligandos *Wnt* (secretados por las células de Paneth-like y fibroblastos) que son los mediadores de la homeostasis y reparación tisular, promoviendo

la expansión y crecimiento del nicho de células madre. Hacia la zona apical del eje de la cripta, la concentración de ligandos Wnt, va disminuyendo. Así es como se genera un gradiente de ligandos (**Figura 2**). Contrario al gradiente de ligandos Wnt, está el gradiente de BMP (*Bone morphonetics proteins*), ligandos que permiten la diferenciación de las células que componen las cripta, como por ejemplo los enterocitos y las células caliciformes (Beumer et al., 2022; Suwinska & Ciemerych, 2011). Por este motivo es que el desbalance en la concentración de ligandos Wnt y BMP provenientes del nicho de células madre, llevaría a la generación de células madre cancerosas (CSC). Una hiperactivación de la vía Wnt/ β -catenina en la base de la cripta, afecta directamente a las CM (LGR5+) que progresan a CSC, transformándose en un impulsor del CCR (Osawa et al., 2016).

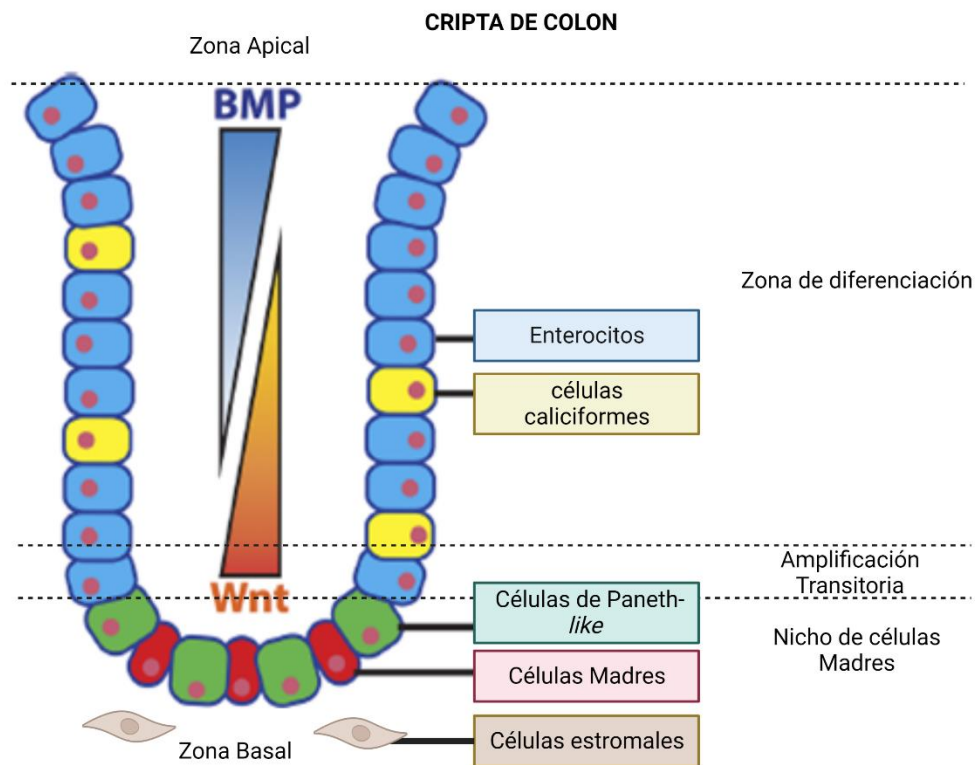


Figura 2: Estructura celular básica entre la cripta del intestino y el estroma. Las células madre o "stem cells" de la base regulan la homeostasis intestinal. A medida que las células progenitoras ascienden por la cripta la señalización de BMP derivada de la mesénquima promueve la diferenciación hacia enterocitos absorbentes o hacia células caliciformes. La proliferación de las "stem cells" y las células de Paneth-*like* se va a mantener mediante la

señalización de Wnt canónica (Clevers & Bevins, 2013; Osawa et al., 2016; Ross, 2008; Sato et al., 2009).

A la fecha, se han identificado varios tipos histológicos de carcinomas colorrectales, estos incluyen: tipo mucinoso, de células en anillo de sello, medular, micropapilar, aserrado, tipo comedón cribiforme, adenoescamoso, de células fusiformes y el indiferenciado. Sin embargo, el 98% de estos tipos histológicos corresponde a adenocarcinoma, que se caracteriza por la formación glandular anormal en la mucosa y precedido generalmente por pólipos adenomatosos (Cotran., Robbins., Kumar, 2010; Ross, 2008).

Para estadificar el CCR se utiliza actualmente la etapificación TNM. Esta es una clasificación utilizada en donde la T, se refiere al tamaño tumoral en cm, pudiendo tomar valores entre 1 y 4. La N, se refiere al número de metástasis a ganglios linfáticos y la M, hace referencia a metástasis a distancia, siendo posible tomar valores entre 0 y 2, dependiendo el número de órganos afectados (Li et al., 2014). La clasificación TNM del CCR es la base para clasificar los estadios de la enfermedad y se relaciona directamente con la respuesta a la terapia y el pronóstico. El estadio 0 o carcinoma *in situ* es la fase inicial del CCR en donde las células tumorales solamente se encuentran localizadas en la región más superficial de la mucosa (epitelio). En el estadio 1 el tumor afecta a la pared del colon o recto sin traspasar la capa muscular. En el estadio 2 el tumor ha infiltrado todas las capas de la pared del colon o recto. Puede invadir los órganos de alrededor pero no se aprecia afectación ganglionar. En el estadio 3 el tumor ha invadido los órganos más próximos y afecta los ganglios linfáticos. Finalmente, en el estadio 4 el cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon o recto como hígado, pulmón o huesos, indicando mal pronóstico (Cotran., Robbins., Kumar, 2010; Tapia et al., 2010).

El CCR tiene 3 formas de presentación, puede ser esporádico, hereditario o familiar. El 90% de los casos de CCR suelen ser esporádicos, sin ningún antecedente familiar ni personal conocido y se producen por la inestabilidad cromosómica. Existe una pequeña población del 10-15% de los casos con un componente hereditario donde encontramos fundamentalmente poliposis colorrectales y el síndrome de Lynch. El componente familiar se ve limitado a tener dos o más parientes de primer grado afectados por el CCR triplicando el riesgo a desarrollar la neoplasia (Pastor & Schlom, 2021).

El origen del CCR en un 60-80% de los casos viene determinado por la progresión de una lesión tipo pólipo adenomatoso con crecimiento progresivo hasta constituir un

cáncer. Un pólipo nace por la desregulación de la renovación epitelial por mutación en el gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), involucrada en la regulación negativa de la vía Wnt canónica. Estos adenomas van a terminar formando una acumulación de células de crecimiento exofítico de la mucosa con tendencia ordenada y circular invadiendo las diferentes capas de la pared colónica en el caso del CCR (1998-2020 Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2020). Otra alteración genómica involucrada en el CCR es la hiperactivación constitutiva de la GTPasa *KRAS*, proteína involucrada en el control de proliferación celular, diferenciación, apoptosis, organización del citoesqueleto y la motilidad. Actualmente en CCR se ha reportado que la mutación de mayor incidencia en *KRAS* es G12D, estando presente en el 28% de los casos y la G12C en el 7%. La determinación de mutaciones en *KRAS* califica a los pacientes como un caso de CCR “*undruggable*”, es decir, no aptos para la terapia con inhibidores de EGFR como Panitumab o Cetuximab. Esto evidencia la necesidad de buscar terapias alternativas que actúen río abajo de la proteína *KRAS*. Actualmente se encuentran en desarrollo ensayos clínicos para identificar terapias óptimas en pacientes con mutaciones en *KRAS*, siendo una de ellas el fármaco Adagrasib, que inhibe la actividad de *KRAS* G12C. Este fármaco fue aprobado por la FDA en diciembre del año 2022 para ser utilizado como terapia en cáncer de pulmón. Recientemente existe un ensayo clínico NCT05722327 se encuentra en fase I, es decir, reclutando pacientes con cáncer de colon para utilizar Adagrasib y Cetuximab como terapia combinada, con el objetivo de disminuir la progresión de la enfermedad metastásica (ESMO, 2022; Parslow et al., 2017)

Durante la tumorigénesis, en la transición adenoma-carcinoma, mutaciones en el gen *TP53* también desempeñan un papel fundamental. Dentro de los mecanismos genéticos se incluyen el cambio en el marco de lectura causadas por *indels* (inserciones y deleciones) y/o mutaciones sin sentido. En ambos casos, el resultado es la inactivación de la actividad supresora de tumores de P53 debido a pérdida o ganancia de función, promoviendo el desarrollo y crecimiento tumoral (Michel et al., 2021). La pérdida de función del gen *P53* ocurre por una mutación que se encuentra presente entre el 50 al 75% de los CCR. Actualmente la determinación inmunohistoquímica de P53 se usa en diagnóstico como factor pronóstico en diferentes contextos tumorales (Olivares-Hernández et al., 2022).

Otra causa genética del CCR es la inestabilidad de los microsatélites (MSI o short tandem repeats) que se caracteriza por la existencia de múltiples mutaciones somáticas que afectan de manera preferente a fragmentos repetitivos de ADN distribuidos a lo largo

del genoma. Esto se traduce en la acumulación de errores en la replicación como consecuencia de la mutación en los genes responsables de la reparación del ADN, específicamente a MLH1, MSH2, MSH6 Y PMS2 (proteínas de la reparación, conocidas como: “DNA mismatch repair” o MMR). La MSI es una característica de los tumores asociados al síndrome de Lynch, pero también se encuentra en el 15-20% de los CCR esporádicos (Diao et al., 2021). Hoy en día la determinación de MSI en biopsias de CCR es usado como marcador para descartar síndrome de Lynch (Dedeurwaerdere et al., 2021; Kullmann et al., 2023; Ukkola et al., 2021).

El CCR es muy heterogéneo a nivel genómico y transcriptómico. Con el objetivo de relacionar el fenotipo de las células cancerosas con el comportamiento clínico, y guiar el tratamiento con terapias dirigidas, el “*CCR Subtyping Consortium*” en el año 2015 unificó la clasificación en cuatro grupos independientes, conocidos como los **subtipos moleculares consenso** de cáncer colorrectal (CMS) (Menter et al., 2019; Mouradov et al., 2014; Sonesson et al., 2015; Thanki et al., 2017).

El primer subtipo molecular (CMS1), llamado “Inmunogénico e inestabilidad de microsatélites”, se caracteriza por la hipermutación microsatelital en el cáncer de colon y representa el 14% de estos. El segundo subtipo (CMS2), es “Molecular canónico” que representa el 37% de los casos de este cáncer. En este subtipo se presentan mutaciones cromosómicas que afectan a la vía Wnt/ β -Catenina y provocan un aumento del oncogén C-MYC (Singh et al., 2021). El tercer subtipo (CMS3), es llamado “Metabólico”, donde la desregulación epitelial y metabólica es evidente, con un patrón genómico y epigenético global de características mixtas, presente en un 13% de la población afectada (Singh et al., 2021). Por último, tenemos el cuarto subtipo (CMS4), llamado “Mesenquimal”, caracterizado por una activación de la vía TGF- β , lo que lleva a una mayor invasión del estroma colónico junto con el proceso angiogénico, por lo tanto, es el subtipo molecular de peor pronóstico. (Thanki et al., 2017).

De esta clasificación, el CMS2 es el de mayor incidencia (37%) en los CCR esporádicos y explica uno de los mecanismos bajo el cual el CCR puede ser desarrollado, que corresponde a la “secuencia adenoma-carcinoma” fundamentado por alteraciones en la vía Wnt canónica al inicio de la carcinogénesis. En este modelo de formación de CCR, se describe que en primer lugar se desarrolla un pólipo, el que puede o no tener displasia. Cuando el pólipo posee displasia es conocido como adenoma, que corresponde a una lesión exofítica de la mucosa e histológicamente puede ser vellosa o tubular. El adenoma

es considerado una neoplasia benigna y puede progresar hacia malignidad a través de estadios histopatológicos que incluyen el adenoma (con displasia de bajo a alto grado), adenocarcinoma *in situ* y el adenocarcinoma invasivo (**Figura 3**) (Hong et al., 2021).

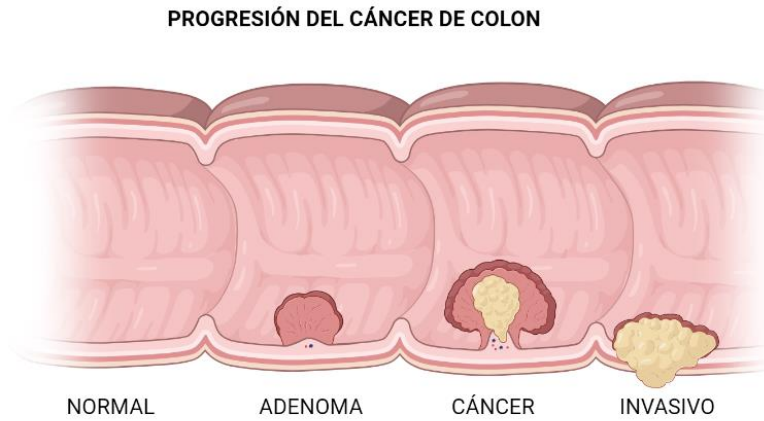


Figura 3: Progresión del adenocarcinoma de colon. Durante la generación del carcinoma de colon, suelen existir mutaciones clásicas como las que ocurren en el gen *APC*, que llevarían a la aparición de un adenoma tubular o vellosito, que puede progresar, por a otras mutaciones como las del gen *KRAS* o *TP53*, a un carcinoma *in situ* y finalmente a invasor. Modificado de: (Cotran., Robbins., Kumar, 2010).

Los tratamientos para el CCR se suministran según los estadios del cáncer y se agrupan en tratamientos de tipo esporádico y de tipo sistémicos. El tratamiento esporádico se suministra en estadios tempranos (Estadio 0 y I), e incluye las cirugías, radioterapias, ablación y embolización. El tratamiento sistémico suministra sustancias farmacológicas para estadios avanzados (Estadios II, III y IV), dentro de los cuales encontramos las quimioterapias, inmunoterapias y terapias dirigidas. En Chile la quimioterapia es el tratamiento más comúnmente suministrado. Los fármacos suministrados para las terapias quimioterapéuticas en Chile se encuentran oxaliplatino, irinotecan, 5-fluorouracilo (5 FU) asociado con levamisol o leucovorina (DIPRECE et al., 2019).

La mayoría de las terapias se aplican de manera combinada, siendo la terapia con FOLFOXIRI (5- FU, oxaliplatino, irinotecan y leucovorina) una terapia efectiva de primera línea para el CCR metastásico el cual genera mejores resultados en la respuesta general, libre de progresión y con una mayor supervivencia en relación con terapias dobles. La función principal de estos fármacos dentro de la célula es poder destruirla mediante la activación de la cascada de apoptosis (Alfaro et al., 2022).

Sin embargo, a pesar de que las tasas de respuesta a las quimioterapias actuales puedan alcanzar hasta el 50%, la mayoría de los pacientes con CCR desarrollan resistencia al medicamento lo que finalmente conduce al fracaso de la quimioterapia. Hoy en día existen terapias alternativas que se encuentran en ensayos clínicos y utilizan inhibidores de distintas vías de señalizaciones, dentro de ellas los inhibidores de la vía Wnt. La vía Wnt suele estar hiperactiva en cáncer de colon en al menos el 50% de los casos y se corresponde con el CMS2 que posee la mayor incidencia dentro de la población. Dentro de los inhibidores de la vía Wnt, están los que afectan la secreción del ligando, la unión ligando-receptor, la estabilización de β -catenina o la actividad transcripcional de β -catenina (DeVito et al., 2021; Neiheisel et al., 2022; Y. Zhang & Wang, 2020).

1.2.- Vía Wnt/ β -catenina en contexto normal y su asociación con el cáncer colorrectal

La notable conservación de la vía de señalización Wnt en formas de vida multicelulares refleja su papel indispensable en el desarrollo embrionario y la homeostasis en tejidos adultos. La señalización de Wnt regula eventos del desarrollo como el establecimiento del eje corporal, la generación y migración de diversos tipos de células. Su pérdida conduce a la letalidad temprana de los embriones. En el organismo adulto, la actividad de la vía Wnt es importante para el mantenimiento de las células madre en varios contextos fisiológicos. Con la capacidad de autorrenovarse y generar progenie de carácter diferenciado, las células madre deben mantener el tejido durante el recambio homeostático normal y repararlo después de una lesión (Ring et al., 2014). La función de Wnt es regular la supervivencia y la propagación de las células madre en una variedad de tejidos, incluidos el intestino, el estómago, la piel y la glándula mamaria. La activación aberrante de la vía Wnt, por el contrario, se ha implicado en múltiples tipos de cáncer (Rim et al., 2022).

La vía Wnt contempla dos estados: activo e inactivo. En el estado inactivo, β -catenina citoplasmática es constitutivamente enviada a degradación por un complejo de destrucción. En este complejo participan AXIN y APC, las cuales son proteínas de andamiaje que facilitan la fosforilación de β -catenina por las kinasas GSK3- β y CK1 α . La fosforilación de β -catenina es reconocida por la ubiquitina ligasa β -TrcP (codificado por el

gen *FBXW*), luego β -catenina es ubiquitinada para ser degradada por el proteasoma. Así se mantienen bajos niveles de β -catenina en el citoplasma y en el núcleo (Hu et al., 2021).

Para que la vía se encuentre inactiva (**Figura 4, izquierda**), además del complejo de degradación de β -catenina, existen otros reguladores negativos importantes, como lo es el gen *RNF43*, el que codifica para una E3 ubiquitin-proteína ligasa que se encarga de la ubiquitinación de los receptores frizzled, y conduce a una alteración en su distribución subcelular, resultando en niveles reducidos de estos receptores en la superficie de la célula. Este último mecanismo es usado para disminuir la disponibilidad del receptor hacia los ligandos Wnt una vez que la vía ya fue activada, a modo de retroalimentación negativa (Giannakis et al., 2014).

Por otro lado, existen ligandos que cumplen una función antagónica como lo son DKK1-2 que se unen al receptor Kremen-LRP5/6, generando una señal inhibitoria de la vía Wnt. Respecto a otros inhibidores de la vía, se tienen los ligandos “Secreted Frizzled-Related Protein” (SFRP1-5), que se unen al receptor Frizzled y en altas concentraciones logran modular extracelularmente de manera negativa la vía (Liang et al., 2019).

Otra proteína limitante para que la vía Wnt logre mantenerse en un estado inactivo es AXIN. AXIN es una proteína de andamiaje que en la célula estaría presente como AXIN1 y AXIN2. Sus genes provienen de locus diferentes, pero ambas proteínas cumplen funciones inhibitorias para β -catenina (Mazzoni & Eric, 2014). La regulación transcripcional de AXIN1 y AXIN2 difiere significativamente: en contraste con AXIN1, que se expresa constitutivamente en niveles muy bajos, la transcripción de AXIN2 está regulada por la actividad de señalización de Wnt (Mazzoni & Eric, 2014).

Un mecanismo importante de regulación de AXIN1-2 corresponde a las poli-ADP-ribosiltransferasas tankyrasa-1 y -2 (codificadas por *TNKS1/TNKS2*). *TNKS1-2* se asocian con AXIN dando como resultado su PARsilación y posterior ubiquitinación y degradación proteosomal, limitando así la actividad del complejo de destrucción de β -catenina. Por este motivo es que la tankyrasa se ha convertido en un atractivo blanco inhibitorio de la vía Wnt en el contexto de cáncer. Actualmente se encuentra en desarrollo el ensayo clínico NCT05257993, que tiene por objetivo utilizar la terapia combinada FOLFIRINOX (5-Fluoracilo, leucovorina, oxaliplatino e irinotecan) y el inhibidor de tankyrasa JPI-547 para incrementar la sobrevivencia de pacientes con cáncer de páncreas (W. Wang et al., 2021b; Yu et al., 2019; R. Zhang et al., 2021).

En el estado “activo” (**Figura 4, derecha**) la cascada de señalización de Wnt comienza con la síntesis del ligando de Wnt en la célula secretora. En el genoma humano se albergan 19 genes *WNT* que codifican glicoproteínas, las que se dividen en 12 subfamilias de ligandos Wnts que participan en la vía canónica (dependiente de β -catenina) y la no canónica (independientes de β -catenina) (Nie et al., 2020). Estos ligandos interactúan con un grupo de proteínas integrales de membrana plasmática, denominados receptores Frizzled (Fz) codificados por 10 genes Frizzled. La estructura de estos receptores Fz incluye siete dominios hidrófobos y un dominio de unión rico en cisteína necesario para la interacción con los ligandos Wnts. Esta interacción es de tipo promiscua, ya que varias proteínas Wnts se pueden unir a un mismo receptor Fz por la semejanza estructural que poseen entre sí. Para la correcta secreción de los ligandos Wnt y posterior unión con el receptor, se necesita la acyltransferasa PORCN o Porcupina, que modifica a los ligandos Wnt con un ácido palmítico en el retículo endoplásmico. Esta modificación es necesaria para la interacción del ligando Wnt en el bolsillo hidrofóbico Frizzled con el co-receptor LRP5/6. La llegada del ligando desencadena que el complejo de destrucción quede inactivo. Esta inactivación de APC, AXIN, CK1 y GSK3- β está relacionada con la proteína Dishevelled (DVL) que se une a AXIN, secuestrando al complejo hacia la membrana, específicamente en la región intracelular del receptor Fz.

La presencia del ligando Wnt provoca que se detenga la constante degradación de β -catenina, la cual comienza a acumularse en el citoplasma. Luego, β -catenina trasloca al núcleo donde se une a factores de transcripción TCF/LEF, generando el desplazamiento de GROUCHO/HDACs y la transcripción de genes blancos de la vía, los cuales están involucrados en mantener el estado proliferativo de la cripta. Respecto a los factores de transcripción de la vía Wnt, se tiene que TCF3 y TCF4 tienen un rol de factores represores de la vía, mientras que LEF1 y TCF1 son factores activadores de esta. Dentro de los clásicos blancos descritos para la vía Wnt, se encuentran *AXIN2*, *CCDN1*, *C-MYC*, *SALL4*, etc.

Por otra parte, para activar la vía, independiente de ligandos Wnt, existen otros agonistas como la R-spondina, que se une al receptor LGR5, receptor clásicamente expresado en células madre y que genera un efecto sinérgico en la activación de la vía al evitar la degradación de receptor FZD-LRP5/6 (Gautam et al., 2015; Osawa et al., 2016).

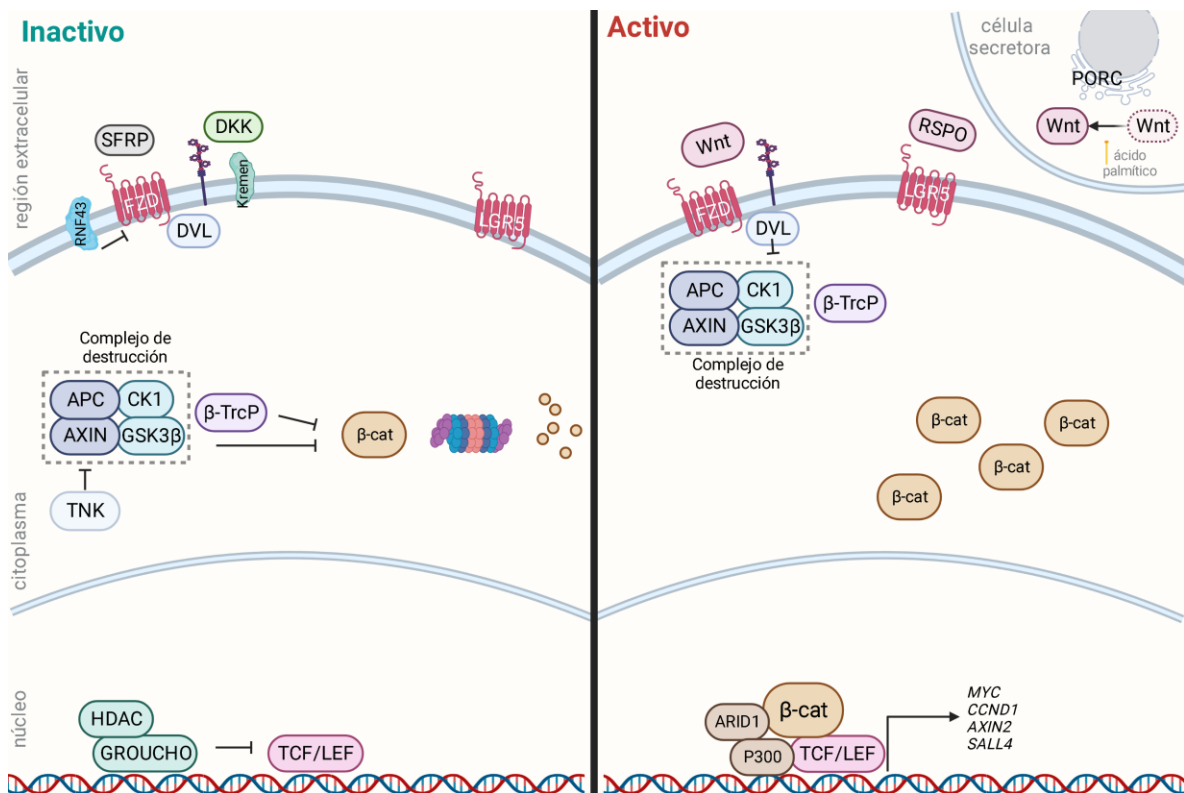


Figura 4: Vía Wnt/β-catenina o Vía Wnt canónica. A la izquierda vía Wnt canónica en ausencia de ligando, existe degradación de β-catenina y no hay transcripción de genes blancos. A la derecha, en presencia de ligando Wnt, hay traslocación al núcleo de β-catenina y transcripción de genes blancos. Fuente Propia.

La vía Wnt canónica suele estar hiperactiva en cáncer, dado por mutaciones genéticas. Dentro de estas, la que ocupa la mayor incidencia es la del gen *APC* con más del 80%, luego *CTNNB1* (β-catenina) con más del 50%, *TCFL2* y *TCF4* con más del 10%, y *AXIN2*, *RNF43* y *DKK4* con una incidencia mayor al 1% (Hu et al., 2021). Como consecuencia, se tienen proteínas con ganancia y pérdida de función. Por ejemplo, mutaciones en *CTNNB1*, que generan ganancia de función, se correlacionan con múltiples cánceres, incluidos hepatocarcinoma, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal (CCR), carcinomas de la unión gastroesofágica y cáncer gástrico (Mantilla et al., 2015). En el CCR, las mutaciones somáticas más frecuentes se observan en D32, S33, G34, S37, T41 y S45 en el exón 3 del ARNm de *CTNNB1*. Se ha demostrado que estas mutaciones estabilizan a β-catenina al alterar el proceso de ubiquitinación dependiente de la fosforilación, lo que lleva a la tumorigénesis (S. Kim & Jeong, 2019).

RNF43 es un regulador negativo de la señalización Wnt y las mutaciones en el gen conllevan a pérdida de función de la proteína. En el cáncer de colon, mutaciones en *RNF43* generan proteínas truncas, estas son más frecuentes en los tumores inestables de microsatélites y muestran una mutua exclusividad con las mutaciones inactivantes de *APC*. Las mutaciones de *RNF43* son frecuentes en CCR, cánceres de endometrio y cáncer gástrico (Giannakis et al., 2014).

Por otro lado, se demostró que el polimorfismo rs2240308 en *AXIN2* encontrado en pacientes con CCR era más frecuente en estadios más tempranos del tumor y los pacientes que portan este polimorfismo en *AXIN2* tienen un peor pronóstico (X. Li et al., 2021; Otero et al., 2019).

De manera interesante, se ha descrito que la vía Wnt a pesar de las mutaciones en los diferentes genes mencionados (*APC*, *RNF43*, *AXIN2*, etc) puede ser modulada por diferentes proteínas o fármacos. Por ejemplo, cuando células de cáncer de colon que poseen mutaciones en *APC* como SW620 o SW480, son tratadas con 5-FU/cisplatino (DDP), o en combinación con XAV939 (inhibidor de Tankyrasa), se genera un efecto sinérgico sobre la apoptosis inducida por 5-FU/DDP. Esto sugiere que XAV939 puede mejorar significativamente la apoptosis inducida por 5-FU/DDP, y que proteínas que involucren el mecanismo de XAV939 como AXIN/Tankyrasa pueden servir como un blanco molecular para revertir la resistencia a múltiples fármacos en el cáncer de colon (D. Kim et al., 2019; X. Wu et al., 2016).

A pesar de la importancia de las mutaciones descritas de la vía en la patogénesis del cáncer y de la innumerable evidencia que demuestra su relevancia como blanco potencial, actualmente no existen fármacos dirigidos a la vía Wnt aprobados por la FDA en la práctica oncológica. Sin embargo, existen múltiples activadores e inhibidores de la vía que podrían dar paso a mejorar la sobrevida de pacientes al ser usados como terapias combinadas junto a la quimioterapia clásica (Z. Wang et al., 2021). En ese contexto es que es de suma importancia encontrar nuevas aproximaciones farmacológicas o biomarcadores genéticos que puedan tener un rol modulador en esta vía.

1.3.- Familia SALL y vía Wnt:

En los últimos años varias investigaciones se han centrado en el estudio de terapias que apunten a la vía Wnt canónica, y a posibles biomarcadores que aporten información pronóstica en CCR. Recientemente se ha vinculado a la vía Wnt/ β -catenina con una familia de factores de transcripción conocidos como proteínas SALL, los cuales son conservados desde *Drosophila* hasta vertebrados. En humanos, los genes *SALL* actúan en el desarrollo embrionario y también se han vinculado con la biología del cáncer, incluyendo el cáncer colorectal (CCR) (Álvarez & Quiroz et al., 2021).

Los miembros de la familia SALL son factores de transcripción que regulan procesos del desarrollo en vertebrados. Poseen varios motivos de dedo zinc (ZF) distribuidos en la proteína, que le permiten su unión al ADN. En humanos existen cuatro parálogos SALL1, SALL2, SALL3 y SALL4, los cuales pueden tener un rol como supresor tumoral u oncogén en diferentes contextos tumorales, siendo SALL1 y SALL4 las proteínas más estudiadas (Hermosilla et al., 2017).

Respecto a las diferencias funcionales, SALL1, SALL2 y SALL3 presentan un rol de supresor tumoral, en donde su expresión en general está disminuida en cáncer. Por otro lado, SALL4 se encontraría sobreexpresado en diferentes cánceres, teniendo un rol oncogénico como por ejemplo en cáncer hepatocelular, pulmón, gástrico, entre otros (Álvarez et al., 2021). En cuanto a diferencias estructurales, SALL2 es el miembro más disímil de la familia y esto está dado por diferencias a nivel del dominio C-terminal de la proteína. Recientemente se encontró que los dos últimos dedos de zinc en el C-terminal de SALL1, SALL3 y SALL4 existe un dominio conservado de unión al ADN, que une a una secuencia rica en AT, el cual no está presente en SALL2 (Ru et al., 2022). SALL2 se une a secuencias ricas en CG a través de sus dominios de unión al ADN ubicado en el tercer dedo de zinc. Los últimos dedos de zinc de SALL2 corresponderían a un dominio efector de transactivación (Ru et al., 2022, Hermosilla et al., 2017).

Existen estudios que vinculan a las proteínas SALL con la vía Wnt. En primer lugar, el rol de SALL1 es controversial ya que hay evidencias de que podría activar o reprimir la vía dependiendo del contexto celular. En contexto no canceroso, células HEK293 (células embrionarias de riñón) y NIH-3T3 (fibroblastos normales de ratón), la sobreexpresión de SALL1 en presencia de β -catenina, activa el reportero de luciferasa que contiene el elemento de respuesta de la vía Wnt (TOPflash), es decir, activa la vía Wnt/ β -catenina. Esta activación de la vía Wnt podría estar mediada por motivos de dedos de zinc como Zn5 y Zn3, los que interaccionan con β -catenina (Sato et al., 2004). Por el contrario, estudios en

contexto de glioma (Células U87-MG y U251) donde *SALL1* se expresa en bajos niveles comparado con células de tejido cerebral normal, la expresión ectópica de *SALL1* afecta negativamente la proliferación celular y la migración/invasión, disminuye los niveles de β -catenina y de genes diana de la vía Wnt como *c-MYC* y *CCND1*. Por lo tanto, en contexto de glioma cerebral se evidencia que *SALL1* actúa como un gen supresor de tumores e inhibe la vía Wnt/ β -catenina (Chi et al., 2019).

El gen *SALL4* se encarga de mantener el estado pluripotente de células madre. Su principal función es el desarrollo fetal, luego va disminuyendo gradualmente durante el desarrollo embrionario y es silenciado en varios de los tejidos adultos sanos. En cáncer, tiene una función oncogénica observándose un incremento en sus niveles en diferentes contextos tumorales (Álvarez & Quiroz et al., 2021, Sun et al., 2022). De manera interesante, en cáncer hepatocelular y carcinoma escamoso de esófago, se detectó una correlación positiva entre *SALL4*, *WNT3A* y β -catenina, que corresponden a reguladores positivos de la vía Wnt (He et al., 2016). (Ma Y et al., 2019). Mecanicamente se ha demostrado que *SALL4* se une directamente con el promotor e induce la transcripción de β -catenina (*CTNNB1*), manteniendo constitutivamente activa a la vía Wnt/ β -catenina (Chen et al., 2019). También, *SALL4* incrementa los niveles de *TRIB3*, un gen que codifica un regulador positivo de la vía, interactor de β -catenina y TCF4, incrementando la tumorigénesis y renovación de células madre. (Fujii et al., 2012; Hua et al., 2019; Y. Yang et al., 2021). Por otra parte, *SALL4* es regulado de manera positiva por la vía Wnt a través de la interacción directa de LEF1 (Factor potenciador linfocitario, perteneciente al complejo TCF/LEF) en el promotor de *SALL4*, activando su transcripción (Böhm et al., 2006).

Respecto a la relación entre *SALL2* y la vía Wnt, se encuentra publicado un estudio, en donde se postula que el promotor P2 de *SALL2* es regulado por la vía Wnt, ya que P2 contiene sitios de unión para el factor TCF/LEF (Kelberman et al., 2014). Este estudio sugiere que *SALL2*, al igual que *SALL4* es un blanco de la vía Wnt, sin embargo, no existen mayores evidencias que lo confirmen.

1.4.- SALL2:

1.4.1.- Factor de transcripción SALL2 y su asociación con cáncer

El gen *SALL2* en humanos se encuentra localizado en el cromosoma 14q11.1-q12.1. El transcrito maduro se compone del empalme de dos exones, siendo el segundo exón el

que codifica para todos los dedos de Zinc presentes en la proteína. En humanos el gen contiene dos promotores, P1 y P2, dando lugar a dos isoformas, E1 y E1A, respectivamente, las que difieren sólo en el primer exón (**Figura 5**). De esta forma, SALL2 codifica para proteínas que difieren en el número y composición de aminoácidos en el extremo amino terminal. Mientras que SALL2-E1 se expresa de manera tejido-específica (testículo, colon y timo), E1A se expresa de manera ubicua (Altmann et al., 2000). Recientemente nuestro grupo de investigación identificó que la isoforma E1A contribuiría de manera principal al control transcripcional mediado por SALL2 en contexto de cáncer (Farkas et al., 2021).

A la fecha se han identificado 10 blancos transcripcionales de SALL2. Actúa como represor transcripcional de oncogenes como *c-MYC*, *CCDN1* y *CCNE1* (Hermosilla et al., 2018; Sung et al., 2012), y como activador de la transcripción de *PTEN*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *BAX*, *PMAIP1*, *ESR1* e *ITG1* (Escobar et al., 2015; D. Li et al., 2004; Parroche et al., 2011; Riffo et al., 2022; Wu et al., 2015; Ye et al., 2019). SALL2 actúa como un freno en la fase G1-S del ciclo celular, evidenciado por su regulación positiva de inhibidores de complejos Ciclina-CDK p21-p16 (*CDKN1A*, *CDKN2A*) y su regulación negativa de ciclinas de fases G1-S ciclina D1 y ciclina E1 (*CCDN1* y *CCNE1*) (Hermosilla et al., 2018;). SALL2 también actúa como un regulador positivo de la apoptosis al inducir la expresión de genes que codifican para proteínas pro apoptóticas como *PMAIP1* (NOXA) y *BAX* y al reprimir la expresión del proto-oncogén *c-MYC* (Escobar et al., 2015; Sung et al., 2012; Z. Wu et al., 2015). La función de SALL2 asociada a sus blancos transcripcionales, permite por lo tanto sugerir que actuaría como supresor tumoral disminuyendo la proliferación celular e incrementando la apoptosis, procesos que comúnmente se encuentran desregulados en cáncer.

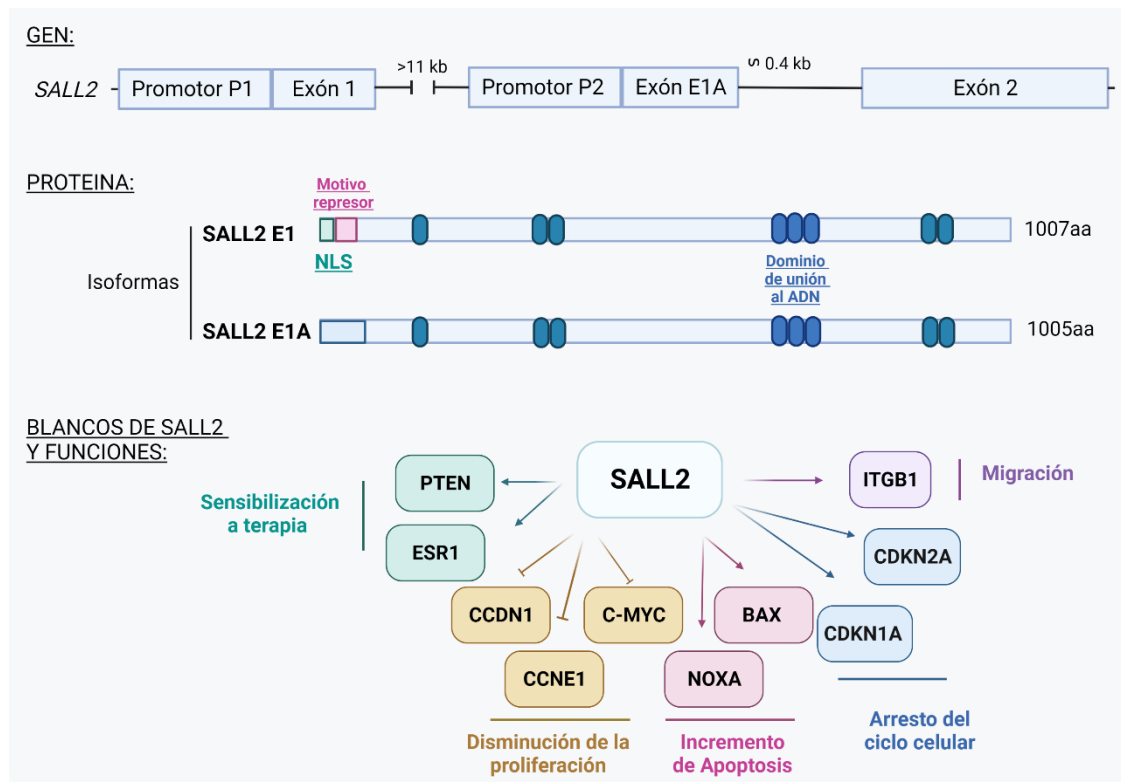


Figura 5: gen de SALL2 y blancos transcripcionales. Arriba, gen e isoformas de SALL2. Se han descrito dos promotores para SALL2, el P1 y P2. Originan transcritos que difieren en el primer exón, generando las isoformas E1 y E1A. Estos exones se empalman con el exón 2, el cuál codifica el resto de la proteína incluyendo los dedos de zinc que otorgan el dominio de unión al ADN. Las proteínas generadas de estos transcritos difieren en el extremo amino terminal. La isoforma E1 contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) y dominio represor de unión al complejo NuRD. **Abajo**, blancos transcripcionales de SALL2, que lo relacionan con la proliferación, apoptosis, arresto del ciclo celular, migración y sensibilización a terapias (Farkas et al., 2021; Hermosilla et al., 2017; Riffo et al., 2022; Ye et al., 2019).

Al igual que otros supresores tumorales, SALL2 es un blanco de oncoproteínas virales, destacando su unión al antígeno T largo del virus de polioma y a E6, un oncogén del virus papiloma humano, oncoproteínas que alterarían la función de SALL2, como sucede con la pérdida de su unión al promotor de P21 (*CDKN1A*) en el caso de la presencia de E6 (Parroche et al., 2011; Sung et al., 2012). También consecuente con un rol supresor tumoral, estudios en células de cáncer ovárico, que presentan baja o nula expresión de SALL2, y su xenoinjerto en ratones, indican que la expresión estable de SALL2 en estas

células disminuiría la tumorigenicidad *in vitro*, así como el volumen tumoral *in vivo* (D. Li et al., 2004). En este contexto, se identificó la hipermetilación del promotor P2 de *SALL2* como uno de los mecanismos responsables de la ausencia de su expresión en cáncer ovárico (Sung, Li, et al., 2012). De relevancia en cáncer es el descubrimiento de que el silenciamiento epigenético de *SALL2* en cáncer de mama confiere resistencia al tratamiento con Tamoxifeno. De esta forma, el tratamiento con agentes demetilantes del ADN provocaría que *SALL2* incrementase sus niveles, y los niveles de sus blancos transcripcionales *ESR1* (Receptor de estrógenos α) y *PTEN*, revirtiendo el fenotipo de resistencia a la terapia *in vivo* (Ye et al., 2019). Asociado a la regulación de *PTEN* por *SALL2*, estudios previos, también indican que *SALL2* tiene un rol negativo sobre la vía PI3K-AKT, ya que el silenciamiento de *SALL2* (sh-*SALL2*), aumenta los niveles de la fosforilación de la Ser473 de AKT, marcador de activación de la vía. Esto explicaría la ventaja proliferativa y migratoria de las células de cáncer de ovario A2780 sh-*SALL2* (Miao et al., 2017). De manera interesante nuestro laboratorio recientemente publicó la asociación de *SALL2* con el proceso de migración, en un contexto no patológico de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEF). En este estudio se validó a la *ITG1* (Integrina β 1) como nuevo blanco transcripcional de *SALL2*, y se demostró que la regulación positiva de Integrina β 1 por *SALL2* favorece el proceso de migración en el contexto del estudio (Riffo et al., 2022). Sin embargo, queda pendiente definir este rol de *SALL2* en contexto patológico, ya que estudios en células de cáncer ovárico sugieren que *SALL2* regula negativamente la migración (Miao et al., 2017).

1.4.2.- Asociación de *SALL2* y la vía Wnt en cáncer de colon

Se ha mencionado anteriormente que *SALL2* se relaciona con diferentes cánceres como esófago, ovario o mama, sin embargo, la asociación con CCR no ha sido estudiada. Análisis de datos públicos en cáncer utilizando MiPanda (<https://mipanda.path.med.umich.edu/>) sugieren que la expresión de *SALL2* en CCR se encuentra significativamente disminuida con respecto al tejido normal (Farkas et al., 2021). Adicionalmente análisis bioinformáticos publicados en GEO (Gene Omnibus: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), demuestran que los niveles de expresión de *SALL2* están disminuidos en cáncer de colon respecto a colon normal (GSE37182, GSE41258, GSE21815). Un estudio que podría explicar la disminución de ARNm de *SALL2*, es que se

observó pérdida de heterocigosidad (LOH) en el locus de SALL2 (14q12-13 cromosoma 14) en un 30% de los pacientes con CCR del estudio. En este locus se pierden genes supresores de tumores responsables del comportamiento metastásico de CCR, dentro de ellos SALL2 (Al-Mulla et al., 2006). Además, datos obtenidos desde Cbioportal (<https://www.cbioportal.org/>) indican que SALL2 se encuentra mutado en un 1,5% de 3853 muestras en 13 estudios de adenocarcinoma de colon, encontrando entre ellas deleciones, mutaciones sin sentido y de sentido erróneo (**Anexo 1**). Estas mutaciones hacen que de los cánceres donde SALL2 se encuentra mutado, el CCR ocupe el tercer lugar después de cáncer de endometrio o melanoma, según la base de datos TIMER 2.0 (<http://timer.cistrome.org/>) (**Anexo 2**). En su conjunto, estas evidencias sugieren que la pérdida de función de SALL2 está involucrada con la progresión del cáncer de colon, sin embargo, la posible función de SALL2 en contexto de colon normal y patológico aún no ha sido estudiado.

Recientemente SALL2 se relacionó con el estroma de CCR, específicamente se menciona que la expresión de SALL2 se encuentra disminuida en CCR en comparación con tejido normal. Sin embargo, existe una correlación positiva entre SALL2 y estroma en cáncer de colon y de recto, no así con otros tumores (Ma et al., 2021). Por lo que, en resumen, la expresión de ARNm de SALL2 se encontraría disminuida en CCR, sin embargo, en muestras de CCR en donde SALL2 si es expresado, aparentemente estaría expresado en células estromales, quedando pendiente responder: **¿En qué estirpe celular de colon normal o tumoral se expresa SALL2?**

Consistente con una posible relación entre SALL2 y la vía Wnt, análisis de un experimento CHIP-seq en células HEK293 realizado en nuestro laboratorio sugiere que genes de la vía Wnt son regulados transcripcionalmente por SALL2. Sin embargo, estos posibles blancos derivados del análisis de los datos del CHIP-seq no han sido validados y la relevancia funcional entre SALL2 y el eje Wnt en CCR, no ha sido dilucidado. Por otra parte, estudios en ortólogos de la familia SALL en Xenopus, demuestran que Xsalf (una proteína homóloga a SALL2) regula negativamente la vía Wnt/ β -catenina, a través de la activación transcripcional de reguladores negativos de la vía como es: tcf3 y gsk3- β , reprimiendo la actividad global de la vía (Onai et al., 2004). A partir de estos estudios, surgen las siguientes interrogantes: **¿Es SALL2 un regulador transcripcional directo/indirecto de blancos de la vía Wnt? ¿SALL2 cumplirá un rol inhibitorio de la vía Wnt, al igual que el ortólogo en Xenopus, Xsalf?**

A través de este estudio se espera demostrar una relación funcional entre SALL2 y la vía Wnt canónica en contexto de colon normal y patológico identificando así un nuevo mecanismo para la acción de SALL2, que incluiría la regulación directa de genes de la vía Wnt. Considerando que la expresión de SALL2 se encuentra disminuida o ausente en CCR se espera determinar si la pérdida de su función contribuye a la hiperactivación de la vía Wnt y/o a las propiedades tumorigénicas de células de CCR incluyendo su capacidad proliferativa o apoptótica. Por otra parte, estudios de la localización de SALL2 en la cripta del colon y la evaluación de su expresión en estadios de la progresión del CCR permitirá determinar su asociación con la vía Wnt y su rol como potencial marcador diagnóstico de CCR.

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Los antecedentes presentados anteriormente, se pueden resumir en los siguientes enunciados: **1.** SALL2 regula negativamente la proliferación celular y positivamente la apoptosis. **2.** Los niveles de ARNm de *SALL2* en CCR están disminuidos respecto a colon normal **3.** En CCR, el locus de *SALL2* presenta pérdida de heterociguidad, siendo factor de mal pronóstico. **4.** Genes de la familia SALL están asociados con la vía Wnt en desarrollo embrionario y en cáncer. **5.** XsalF, proteína de *Xenopus* homologa a *SALL2* en humanos, regula negativamente la vía Wnt **6.** CHIP-seq del laboratorio sugiere que genes de la vía Wnt pueden ser regulados por *SALL2*.

Se plantea la siguiente hipótesis: “**SALL2 regula transcripcionalmente un blanco de la vía Wnt, modulando negativamente la vía y la pérdida de su función en cáncer de colon favorece la activación de esta**”.

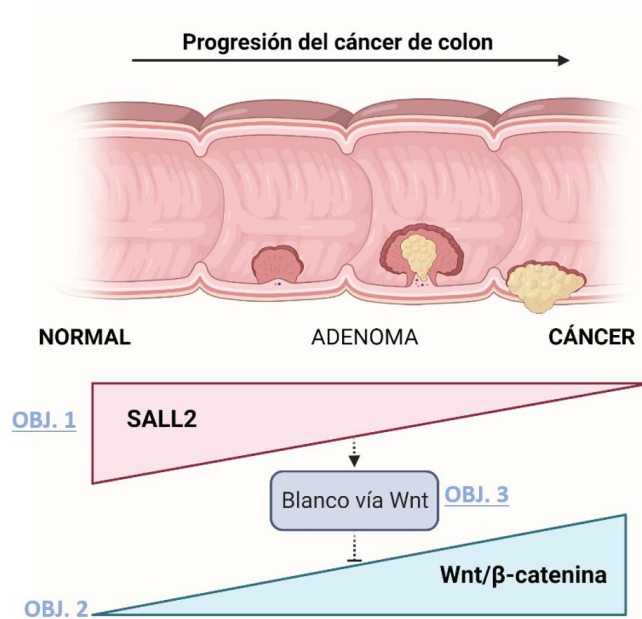


Figura 6: Modelo de estudio propuesto. Se postula que SALL2 regula un blanco transcripcional de la vía Wnt/β-catenina y sería el mecanismo por el cual SALL2 modula negativamente la vía. Sin embargo, en contexto de CCR con la pérdida de expresión de SALL2, se perdería este mecanismo inhibitorio de la vía Wnt.

3.- HIPÓTESIS:

“SALL2 regula transcripcionalmente un blanco de la vía Wnt, modulando negativamente la vía y la pérdida de su función en cáncer de colon favorece la activación de esta”.

4.- OBJETIVO GENERAL:

Determinar la asociación entre SALL2 y la vía Wnt en contextos normal y tumoral del colon.

5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

OBJETIVO ESPECÍFICO 1.

Determinar la expresión espacio-temporal de SALL2 en la progresión del cáncer de colon.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2.

Definir la relación funcional entre SALL2 y la vía Wnt.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3.

Definir blancos transcripcionales de SALL2 con impacto en la vía Wnt/ β -catenina.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Reactivos:

- CX-4549 (Silmitasertib): MedChem Express (No. Cat. # HY-50855).
- 5-Fluoracilo: Santa Cruz (sc-29060A).
- XAV939: Merck (No. Cat. #284028-89-3).
- CHIR99021 (CT99021): Tocris (No. Cat. #4423).
- DMSO: Tocris (No. #3176).

6.2.- Análisis Bioinformáticos:

En primer lugar, se utilizaron datos masivos de cáncer, trabajando con plataformas públicas de bases de datos, para análisis de expresión diferencial de *SALL2* en cáncer de colon vs tejido normal. En este contexto se utilizó: UALCAN, GEPIA, MiPanda y DeapMap. Luego para conocer mutaciones genéticas en el gen *SALL2* se trabajó en Cbioportal y TIMER 2.0. Además, se realizaron análisis de correlación entre *SALL2* y *AXIN2* en: R2, TIMER 2.0 y SurvExpress.

6.2.1.- MI PANDA (<https://mipanda.path.med.umich.edu/>): Es una herramienta que provee acceso a resultados de larga escala desde muestras de ARN-seq. MiPanda ocupa set de datos de TCGA para cáncer (n=9496) y tejido normal (n=730). Los criterios de inclusión para la búsqueda fueron: “Gen: *SALL2*”. Tipo de análisis: Expresión diferencial de *SALL2* en muestras de cáncer.

6.2.2.- UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>): Es un portal interactivo para llevar a cabo análisis en profundidad de datos de expresión de genes en 31 diferentes tipos de cáncer. Para esta búsqueda se utilizaron 327 muestras humanas de colon, de las cuales 41 son de tejido normal y 286 de tumor primario. Los criterios de inclusión para la búsqueda fueron: “Gen: *SALL2*”, “TCGA dataset: Colon adenocarcinoma”. Tipo de análisis: Expresión diferencial de *SALL2* en muestras de CCR.

6.2.3.- GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>): Es una herramienta que provee una rápida búsqueda en las base de datos de TCGA y GTEX, en los cuales se pueden hacer análisis de expresión diferencial, correlación de distintos genes, análisis de sobrevivencia en pacientes. Para los análisis en GEPIA se utilizaron un total de 9736 muestras de tumor y 8000 muestras de GTEX de tejido normal. Las condiciones de búsqueda para este estudio fueron. “Gen *SALL2*”. Tipo de análisis: Expresión diferencial de *SALL2* en muestras de CCR.

6.2.4.- DeapMap (<https://depmap.org/portal/interactive/>): Es una plataforma con información generada en el proyecto “The cancer dependency Map Project”. Tiene por objetivo realizar una enciclopedia *online* de líneas celulares de cáncer. Presenta información de “screening” genético y resistencia a drogas para generar modelos predictivos de respuesta a terapias. Se usó la herramienta: “cell line selector” para escoger las diferentes líneas celulares a trabajar y se buscó la expresión de “SALL2”. Tipo de análisis: Expresión diferencial de SALL2 en modelos de líneas celulares en CCR.

6.2.5.- cBioPortal (<https://www.cbioportal.org>): La base de datos cBioPortal para genómica del cáncer provee una herramienta para analizar la data genómica en forma de gráficos de múltiples plataformas y además de análisis de correlación. Para este análisis de correlaciones se usaron 13 estudios distintos con un total de 3.853 muestras de cáncer de colon. Las condiciones de búsqueda para este estudio fueron: “Gen: SALL2”. Estudios: “cáncer de colon”, “cáncer colorrectal” y “adenocarcinoma de colon”. Módulo: “mutations”. Tipo de análisis: Mutaciones en el gen SALL2.

6.2.6.- TIMER 2.0 (<http://cistrome.shinyapps.io/timer>): La base de datos Timer presenta un módulo de “cancer exploration” que permite realizar análisis de expresión diferencial entre tejido normal y tumoral entre diferentes genes en contexto de mutaciones somáticas. El nivel de significancia se basó en $p < 0,05$. Timer 2.0 se utilizó para conocer la relación entre SALL2 y AXIN2. Tipo de análisis: Expresión diferencial de AXIN2 en contexto de muestras de CCR con SALL2 mutado.

6.2.7.- SURV EXPRESS (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx/SurvExpress>): Es una base de datos con más de 20 000 muestras y 130 conjuntos de datos con información clínica en más de 20 tumores. Nos entrega datos de correlación clínica entre biomarcadores y parámetros como supervivencia libre tumoral. Tipo de análisis: Expresión diferencial de AXIN2 y SALL2 en contexto de pacientes con CCR con alto y bajo riesgo.

6.2.8.- R2 Genomics (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>): Los datos seleccionados en la plataforma R2 corresponden a 17382 muestras de tejidos normales secuenciadas por la octava versión del proyecto de expresión genotipo-tejido (GTEx), disponibles públicamente en el servidor, Release 3.3.4 (febrero 2023). Los datos se muestran normalizados en forma de transcritos por millón (TPM). Se utilizó la función: “correlacionar dos genes” en “tipo de análisis”. Tipo de análisis: correlación entre AXIN2 y SALL2.

6.3.- Análisis de expresión diferencial en R Studio:

Con el objetivo de explorar los niveles de expresión de *SALL2* en cáncer colorrectal, se seleccionó un conjunto de experimentos *microarrays* desde la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Se utilizaron las palabras claves “colorectal cancer” y “gene expression profiling” para buscar en GEO y se seleccionaron los experimentos en base a los siguientes criterios: (I) Organismo “Homo sapiens”, (II) tipo de experimento “Expression profiling by array”, (III) datos con ambas muestras control y tumoral, (IV) anotación de genes completa (*gene name*) y (V) número de muestras normales o control igual o superior a 5. Se obtuvieron un total de 7 *microarrays* que comprenden 335 muestras normales y 625 tumorales.

Respecto al análisis de expresión diferencial utilizamos la biblioteca “*limma Voom*” (Ritchie et al., 2015) para identificar los genes expresados diferencialmente entre muestras de tejido normal y cáncer. Como criterios de corte (*cut-off*) fueron: 1) el valor P ajustado utilizado fue de $p < 0,05$ y 2) $|\log \text{fold change (FC)}| > 0,5$. Los gráficos de volcano se realizaron con el paquete “*gplots*” en R 3.5.3.

6.4.- Inmunohistoquímica en biopsias de pacientes: La técnica de Inmunohistoquímica fue realizada en la Unidad de Anatomía Patológica, en las dependencias del edificio de Anatomía Patológica, Universidad de Concepción.

6.4.1.- Selección de pacientes: Como criterio de inclusión, las muestras de estudio corresponden a biopsias desde el año 2018 al 2021 con el diagnóstico de adenocarcinoma de colon, pacientes mayores a 18 años. Como criterio de exclusión las muestras correspondieron a biopsias con periodo de fijación superior a 48 horas y aquellos pacientes que al momento de la toma de biopsia se encuentren con radioterapia. La búsqueda de pacientes se realizó utilizando el software PATHIENT (<https://www.pathient.cl/>).

La cohorte del estudio corresponde a 130 muestras con adenocarcinoma de colon invasivo primario. Se trabajó con muestras de adenoma (n= 40), CCR (n= 48) y mucosa adyacente sana (n= 42). Las muestras de FFPE se obtuvieron siguiendo un protocolo aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Concepción y el comité ético-científico del Hospital Guillermo Grant Benavente (**Anexo 3 y 4**).

6.4.2.- Inmunohistoquímica (IHQ): Los análisis de IHQ se llevaron a cabo utilizando secciones de 4 μm de grosor en el EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizó el sistema PTLINK (Dako-Agilent) para el pretratamiento, lo que permitió la desparafinación, rehidratación y

recuperación de antígenos simultáneamente. La peroxidasa endógena se bloqueó con el Flex Peroxidase Block (Dako-Agilent) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo seleccionado SALL2, Ki-67 y β -Catenina durante 30 minutos a temperatura ambiente (**ver tabla 3**). Después de 3 lavados en buffer 1X TBS, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo conjugado a un polímero marcado con peroxidasa de rábano picante por 20 min. Luego, se aplicó 3,30 -diaminobencidina en oscuridad durante 5 min. La contratinción se realizó con Hematoxilina Flex (Dako-Agilent) y a continuación se lavaron los portaobjetos con agua corriente durante 5 min. Por último, las muestras se deshidrataron y se montaron con un cubreobjetos tras su deshidratación.

6.5.- Interpretación de datos de Inmunohistoquímica:

Para la interpretación de IHQ, es necesario analizar: puntaje proporcional e intensidad de tinción. El puntaje proporcional que corresponde a cuántas células son positivas a la IHQ del total de células analizadas. Y la intensidad de tinción, se refiere al color de la tinción y si esta es leve, moderada o intensa. Este análisis es una forma de cuantificar objetivamente un marcador por IHQ y de esta manera determinar si es positivo o no (Ahmad Fauzi et al., 2022; Ram et al., 2021).

6.5.1.- SALL2: Para el análisis del puntaje proporcional, el porcentaje (%) de células positivas, respecto al total de células, se determinó contando 100 células por imagen de 3 campos diferentes para cada muestra utilizando el plugining “*cell counter*” en Image J. Este análisis se realizó considerando sólo las células epiteliales frente a las estromales y la localización nuclear frente a la citoplasmática. Así se obtuvo el % de núcleos positivos para SALL2 en el epitelio o en el estroma. Además, para el análisis de intensidad de la tinción de SALL2 en el núcleo y el citoplasma se puntuó de 0 a 3+ (0: Ausencia de tinción, 1+: tinción débil, 2+: tinción moderada y 3+: tinción fuerte).

6.5.2.- β -Catenina: La expresión de β -catenina fue evaluada en función del patrón de localización e intensidad, según (Kundu et al., 2021; X. Ma et al., 2018). La tinción fue considerada negativa si la localización era de membrana o nuclear-citoplasmática débil o nula. Por el contrario, la tinción fue considerada como positiva si existía expresión nuclear-citoplasmática moderada o fuerte. El algoritmo para generar el puntaje proporcional incluía el número de células con un núcleo teñido positivamente, utilizando el siguiente sistema de clasificación 0: ninguna célula positiva, 1: < 30% de células con tinción nuclear positiva, 2: 30-70% de células con tinción nuclear positiva y 3: > 70% de células con tinción nuclear

positiva. La inmunorreactividad de β -catenina se analizó por separado para el centro del tumor y el frente invasivo del mismo. Adicionalmente, se evaluó la intensidad de tinción de 0 a 3+ (0: Ausencia de tinción, +1: tinción débil, +2: tinción moderada y +3: tinción fuerte).

Finalmente se generó la clasificación final en 4 grupos, considerando el puntaje proporcional (de 0 a 3) y la intensidad de tinción respectivamente (de 0 a +3): Expresión negativa (0, 0), expresión débil (1, 1+), expresión moderada (2, 2+) y expresión fuertemente positiva (3, 3+).

6.5.3.- Ki-67: Para el estudio de la tinción de Ki67 se utilizó el análisis realizado por (Ratajczak-Wielgomas et al., 2017), se consideró: A) puntaje proporcional: 0: menos del 5% de inmunorreactividad de las células, 1: del 6% al 25%, 2: del 26% al 50%, 3: del 51% al 75% y 4: del 75% al 100. B) puntuación de intensidad de la tinción: fue de 0 a +3 (0: Ausencia de tinción, +1: tinción débil, +2: tinción moderada y +3: tinción fuerte).

Para obtener la puntuación final de tinción de Ki67, los resultados se calcularon multiplicando A x B (puntaje proporcional x intensidad de tinción), por ejemplo, en presencia de una tinción fuerte de Ki67 correspondía A: 90% de células positivas= 4 y B: 3+, por lo que AXB: 3 X 4: 12 puntos. De esta manera se clasificó los resultados de la tinción en 2 grupos: expresión negativa (puntaje: 0 puntos) y expresión positiva (puntaje: entre 1 y 12 puntos).

6.6.- Inmunohistoquímica multiplex:

Se trabajó con secciones de 4 μ m del "tissue microarray" normal y cáncer. Para el pre-tratamiento se utilizó el EnVision FLEX Target Retrieval Solution High pH (50X) (K8004, DAKO), lo que permitió la desparafinación, rehidratación y recuperación de antígenos simultáneamente. Luego se utilizaron los anticuerpos primarios, todos en una sola dilución. Panel 1: Citoqueratina-conjugada a Alexa 488, Vimentina y SALL2. Panel 2: SALL2, CD68 y CD8. Ver detalles en la **tabla 3, de anticuerpos primarios**. Posteriormente se incubó con los anticuerpos secundarios, para los anticuerpos de conejo (ej: SALL2), se utilizó EnVision+ System-HRP labelled Polymer Anti-Rabbit (K4003, DAKO) y para los anticuerpos de ratón (ej: CD8), se usaron anticuerpos fabricados en cabra isotipo específico conjugados a HRP (**ver tabla 4, anticuerpos secundarios**). Entre cada incubación, se fue inactivando la actividad de la HRP (enzima Peroxidasa de Rábano Picante) con 100mM hidrazida benzoica y 50mM de peróxido de hidrógeno en solución de PBS, que corresponde a un inhibidor suicida de la peroxidasa. Para revelar se utilizó el sistema de amplificación basado

en tiramida (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Se usó TSA Plus Cyanine 5 (cy5) Reagent (TS-000203, Akoya) o TSA Plus FITC Reagent (TS-000200, Akoya). Finalmente se realizó una co-tinción con DAPI y los portaobjetos fueron montados utilizando Prolong Gold mounting medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Cereceda et al., 2022; Villarroel-Espindola et al., 2017).

6.6.1.- Análisis Inmunohistoquímica multiplex:

Para el análisis de la inmunohistoquímica multiplex, se realizó un escaneo 20X en el microscopio Aperio VERSA 200 (Leica Biosystems, Vista, CA, USA). Los tiempos de exposición fueron determinados acorde a cada target. El escaneo fue realizado en primer lugar usando el aumento 1,25X para detección automática del core del TMA, luego un segundo escaneo a 5X para detección de señal fluorescente utilizando DAPI y finalmente un escaneo a 20X para los filtros FITC, CY3 Y CY5.

Para el análisis de imágenes, se utilizó el software QuPath v.0.3.2 (University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland, UK). De manera resumida, se utilizó el canal DAPI para la segmentación o detección de todas las células en el core tisular. El Threshold usado fue de 5.0. Luego se realizó la clasificación de objetos y se definieron los siguientes clasificadores: citoquetina, SALL2, Vimentina, CD8 y CD68 positivo. Finalmente, se realizó la corrida del script automático seleccionando manualmente cada ROI (Región de interés). Los datos fueron exportados como el total de células positivas para cada biomarcador en un Excel y se analizaron dichos datos usando el porcentaje de positividad de un marcador por sobre el total de células positivas a DAPI (Cereceda et al., 2022; Villarroel-Espindola et al., 2017).

6.7.- Cultivo Celular

Las líneas celulares HEK293, SW480, SW48, HT29 y SW620 disponibles en el laboratorio de Transducción de Señales y Cáncer, fueron obtenidas desde ATCC. Las células CCD-841-CoN fueron un obsequio del laboratorio del Dr. Julio Tapia (Universidad de Chile). Las líneas celulares SW480, SW48, HT29, SW620 se cultivaron en medio RPMI-1640 y las células HEK293 y CCD-841-CoN en medio DMEM (Roswell Park Memorial Institute, HyClone), ambos suplementados con FBS al 10% v/v, L-glutamina 2 mM, Penicilina 50 U/mL y Estreptomicina 50 µg/mL (HyClone). Los cultivos celulares se incubaron en estufa a 37° C y atmósfera con 5% de CO₂.

Las células fueron periódicamente testeadas con el test de mycoplasma (EZ-PCR™ Mycoplasma Detection Kit). Se utilizó de manera profiláctica una concentración de 2,5 µg/mL de Plasmocin (InvivoGen, L: 3801^a) o para limpiar las células micoplasma 25 µg/mL.

En este proyecto se trabajó con modelos de pérdida de función CRISPR-Cas9 (**Metodología 6.9**) y modelos de ganancia de función SALL2 E1A doxiciclina inducibles. Los modelos inducibles fueron generados por Paulina Sepulveda en el laboratorio. Para la inducción de SALL2 las células fueron tratadas con doxiciclina (1µg/mL) en suero TET-*On* por 24 a 48 hrs antes de cada experimento. Los modelos inducibles utilizados en este proyecto corresponden a: HEK293, SW48, SW480, SW620 y HT29.

6.8.- Generación modelo CRISPR-Cas9

Células CCD-841-CoN fueron electroporadas con los vectores pD1321-AP-SALL2 y pD1321-AP-Jun_SALL2 (**ver tabla 1**) plásmidos diseñados para generar una mutación genómica en el gen *SALL2* humano mediante la expresión de la proteína Cas9 silvestre acoplado a la proteína RFP (en inglés “Red Fluorescent Protein”). Esta última proteína, fue usada como marcador de selección para la citometría de flujo. Estos vectores fueron utilizados para generar las células “CRISPR-SALL2”. Se incluyó, además, como control de la transfección el vector vacío pD1321. Este plásmido, no tiene guías para la proteína Cas9, que se utilizó para la generación de células “CRISPR-Control” (Farkas et al., 2021). Las células electroporadas fueron disgregadas 18 horas post-electroporación mediante tripsinización y sometidas a citometría de flujo y cell sorting (BDFACSAria III cell sorting). En cada condición (CRISPR-control y CRISPR-SALL2) se seleccionó un pool de 96 células correspondientes al 1% de las células con mayor fluorescencia roja, luego se verificó la ausencia de expresión de *SALL2* en el modelo CRISPR-Cas9 mediante western blot en los diferentes clones.

6.9.- Medio condicionado (L-WRN):

El medio condicionado se generó a partir de células L-WRN (Obsequio de Dr. Jorge Toledo, Universidad de Concepción), células que corresponden a fibroblastos aislados de la areola de un ratón macho y son secretores de Wnt3a, R spondina y Noggin. Las células L-WRN se cultivaron en DMEM en las condiciones estándar, una vez que alcanzaron a un 90% de confluencia, se cambió el medio a DMEM/F-12 suplementado con suero bovino fetal al 20% (Vandussen et al., 2019).

El medio condicionado, se fue colectando cada 24 horas por 8 días. Se mezcló en partes iguales con DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, obteniendo finalmente una solución de trabajo al 50% v/v. Esta solución, se dividió en alícuotas de 20 mL para su posterior almacenamiento a -80°C.

6.10.- Generación de pellets citológicos desde líneas celulares:

Se sembraron 2.000.000 de células CCD-841-CoN, HT-29, SW620, SW480, HCT-116 y DLD-1 en placas de 10 cm. Cuando cada línea celular llegó al 90% de confluencia, se fijaron en metanol. Luego las células se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió cuidadosamente en 1 mL de agarosa líquida al 2% a 65°C (LE, grado analítico; Promega, Madison, WI). El agar solidificado se colocó en un casete de inclusión y se incluyó en parafina utilizando un procesador de tejidos automatizado (Tissue-Tek VIP150; Sakura) en condiciones estándar para biopsias quirúrgicas, en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Guillermo Grant Benavente. A continuación, se realizó la IHQ en el cyto-agar.

6.11.- Inmunocitoquímica

Se sembraron 150.000 células SW480 o HT-29 en cubreobjetos de 15 mm en placas de 12 pocillos. Luego de 48 horas de incubación las células se fijaron en 4% paraformaldehído en 1X PBS no estéril por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en 1X PBS por 10 minutos. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (**Tabla 3**) diluido en 3% BSA por 14-16 horas a 4°C (sala fría) en cámara húmeda. Luego, se realizaron tres lavados con 1X PBS por 5 minutos y se incubó por 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 4**), en BSA al 1% incluyendo la tinción nuclear de DAPI (dilución 1:400). Finalmente, se montaron los cubreobjetos en portaobjetos, usando 15-20uL de "Fluorescence Mounting Medium" (Dako) para su posterior análisis bajo microscopía confocal. El microscopio confocal empleado fue un microscopio espectral confocal LSM780 NLO Zeiss (objetivos 63X, CMA Bío-Bío). En cada inmunofluorescencia además se incluyó un control negativo, que involucra un cubreobjeto sin la incubación de anticuerpo primario.

6.11.1.- Análisis de imágenes de inmunocitoquímica:

Para el análisis de Inmunofluorescencia se utilizó el software de acceso gratuito "FiJI". Las imágenes en formato csv fueron descargadas desde el servidor CMA, se separaron en el canal verde (β -catenina) y azul (DAPI) para seleccionar la región de interés (ROI) utilizando un método de segmentación manual con la herramienta "varita" en el canal azul. Luego se

procedió a importar este ROI a la señal del canal verde y tomar registro de la intensidad de fluorescencia de β -catenina en cada núcleo. Estos datos fueron promediados por imágenes, considerando un mínimo de 100 células por réplica de experimento. Se realizaron 3 réplicas independientes por cada condición.

6.12.- Inmunoblot:

Las células se lisaron en el buffer de lisis (Tris/HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, MgCl₂, glicerol al 5%), suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa al 1%. Las lisados proteicos (50-70ug) fueron separados utilizando electroforesis denaturante (SDS-PAGE), usando voltaje constante de 75V y en presencia del tampón de corrida (Tris 25mM; Glicina 192mM; SDS al 0.1% p/v). Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar Accuruler (MAESTROGEN, No. Cat. # 02102-250). El gel separador contenía acrilamina:bisacrilamina 29:1 (30%) desde el 6 hasta 12% p/v, Tris 375 mM pH 8.8; SDS al 0.1% p/v; persulfato de amonio al 0.1% p/v; N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) al 0.09% v/v). Por otra parte, el gel concentrador utiliza acrilamina:bisacrilamina 29:1 (30%) al 5%p/v; Tris 125 mM pH 6.8; SDS al 0.1% p/v; persulfato de amonio al 0.1% p/v; TEMED al 0.1% v/v). Las proteínas se transfirieron durante 16-18 hrs a 30 mA a una membrana de PVDF (Immobilon, Merck, Kenilworth, NJ, EE. UU.).

Las membranas de PVDF se bloquearon en leche descremada al 5% 1 h a temperatura ambiente en TBS-T (TBS-Tween20: Tris 20mM; NaCl 500mM; pH 7.4; Tween20 0.05% v/v)). Luego se incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C durante toda la noche (**ver tabla 3**). Después del lavado, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad) diluido en 5% en leche en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas inmunomarcadas se visualizaron mediante el kit de quimioluminiscencia Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences). Para realizar la cuantificación de las bandas se utilizó Image J, en donde se procedió a hacer una densitometría de las proteínas de interés normalizando con un control de carga como GAPDH o β -actina. Finalmente se graficaron los datos utilizando Graph Prism 8.0

6.13.- Fraccionamiento subcelular (núcleo-citoplasma).

El fraccionamiento nuclear/citoplasmático se realizó utilizando un protocolo *in house* con extracción de tampón nuclear (HEPES 10 mM (pH 7,9), MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM) y extracción de tampón citoplasmático (HEPES 20 mM (pH 7,9), glicerol 25 % (v/v), NaCl 0,42 M, MgCl₂ 2mM 1,5 mM, EDTA 0,2 mM). La membrana nuclear se disgregó con 20 golpes

en un homogenizador “Dounce” y luego los extractos se separaron en un SDS/PAGE. Se utilizó HDAC 1 como normalizador nuclear y GAPDH como normalizador de la fracción citoplasmática (Tesis Doctorado, Mario Palma, 2019).

6.14.- Extracción de ARN y generación de ADNc.

Para la extracción de ARN, se utilizaron placas de 60 mm en donde las células fueron colectadas en 500µL del reactivo TRIZOL (ambion). Para la separación de las fases se agregaron 100µl de cloroformo, vortex y luego se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue traspasada a otro tubo nuevo, donde posteriormente se le agregaron 500µl de isopropanol a temperatura ambiente para la precipitación del ARN. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 rpm (10 minutos a 4°C), y se removió el sobrenadante cuidadosamente. El pellet (ARN) se lavó con 500µl de etanol 75% en agua DEPC y se centrifugó a 10.000 rpm (5 minutos a 4°C). Para resuspender el ARN se removió el sobrenadante, se dejó secar el pellet al aire por 20-30 minutos y se adicionó 50µl de agua DEPC para hidratar en hielo por 30 minutos. Las muestras fueron tratadas con el kit de turbo DNasa (Invitrogen) para eliminar cualquier residuo de ADN. Se cuantificó la concentración de ARN y su pureza a través de absorbancia en el lector de placas INFINITE 200 PRO NanoQuant Microplate readers (TECAN), considerando como óptimo una pureza entre 1,8 - 2, relación Abs 260-280 nm.

Para realizar PCR transcriptasa reversa, se mezcló una concentración de 1000ng de ARN total con 1,6 uL de oligoDT (Promega) en 10uL de volumen final en agua grado biología molecular (Hyclone). El programa ocupado consta de una etapa de 5 minutos a 70°C y una segunda etapa a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV (PROMEGA), usando el programa de una etapa a 60°C por 42 minutos y una segunda etapa a 65°C por 15 minutos en un termociclador de PCR convencional (Veriti).

6.15.- PCR cuantitativa en tiempo real

6.15.1.- Diseño de partidores: Los partidores utilizados se confeccionaron descargando la secuencia de ADNc desde ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). Para ello se debe buscar la secuencia de SALL2 humano y seleccionar “ADNc” exportando el resultado en HTML. Luego, utilizando la secuencia codificante, se crearon los partidores para RT-qPCR en Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>). Para las condiciones de generación de partidores se seleccionó un %CG inferior al 60%, largo inferior a 20pb y tamaño de amplicon entre 100 y 300pb. Luego con el objetivo de descartar la presencia de dímeros de partidores que pueden disminuir la eficiencia de la reacción, se usó la herramienta “oligoanalyzer”

(<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), en donde se buscaron estructuras secundarias como por ejemplo horquillas, homodímeros o heterodímeros. Los partidores que tenían estos dímeros fueron descartados. Se confirmó el producto de amplificación en Umelt, un servidor que permite conocer la temperatura de melting teórica y además entrega una curva de Melting de simulación (Umelt: <https://dna-utah.org/umelt/umelt.html>). Finalmente se usó el servidor de PCR *in silico*: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>, que permite conocer el tamaño del amplicon y la especificidad de los partidores.

6.15.2.-PCR cuantitativo: Se realizaron las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) por triplicado utilizando “KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Kit” (Kapa Biosciences) con una concentración de partidores de 0,4 μM (**ver tabla 2**). Cada reacción contenía: 0,4 μL de cada partidor, 5 μL del kit 2X, 1 μL de ADNc y 3,2 μL de agua grado biología molecular. Las condiciones usadas en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, luego 40 ciclos de 95 °C por 5 segundos (desnaturalización) y 60 °C por 20 segundos (extensión). La curva de melting, fue usada para verificar la T_m de los partidores. La expresión de cada gen fue relativa a la expresión del gen normalizador *GAPDH*, *ACTINA* o *PPIB*. La representación de los datos fue como veces de cambio en comparación con el control, para cada caso, esto utilizando la formula delta delta CT.

6.16.- Ensayo de reportero

Se sembraron 350.000 células HEK293 SALL2-E1A-FLAG doxiciclina inducibles en placas de 6 pocillos. Luego de 24 h, las células se trataron con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxiciclina para inducir la expresión de SALL2 E1A. Transcurridas 24 h de tratamiento con doxiciclina, se realizó la transfección transiente por el método de fosfato de calcio. A las 24 h post-transfección, las células se colectaron para el ensayo.

Se transfectó 1 μg de pGL3 basic, 0,125 μg RSV- βGal , 1 μg pCDNA3-AXIN2 1kb silvestre y 1 μg pCDNA3-AXIN2 1kb mutado (**tabla 2**), según corresponda. El plásmido RSV- βGal que codifica la β -Galactosidasa, fue usado para normalizar la actividad de luciferasa respecto al número total de células transfectadas (actividad de β -galactosidasa).

Se preparó una mezcla de ADN plasmidial y 250mM de CaCl_2 , la que se agregó sobre un volumen equivalente de 2X HBS (**Ver metodología 6.23.1, transfección con fosfato de calcio**).

Las células fueron colectadas en 1X PBS frío en tubos de microcentrífuga de 1.5mL. Y se centrifugó a 1500rpm por 5 min a 4°C. El pellet de células fue lisado con una dilución 1X de

la solución comercial 5X Luciferase Cell Lysis Buffer (New England Biolabs). Luego, 25 μ L de lisado de utilizaron para la medición de actividad de luciferasa o β -galactosidasa por separado, usando el kit Luciferase-Glo® (Promega, Madison, WI, USA) o Beta-Glo® (Promega, Madison, WI, USA), respectivamente. Finalmente, la actividad de los reporteros fue cuantificada en el luminómetro utilizando placas de 96 pocillos de fondo blanco en el INFINITE 200 PRO NanoQuant Microplate readers (TECAN).

6.17.- Inmunoprecipitación de cromatina:

Células HEK293 SALL2-E1A-FLAG doxiciclina inducibles fueron tratadas con 1 μ g/ml de doxiciclina por 48 horas para la inducción de SALL2-E1A-FLAG, posterior a este tiempo se realizó un tratamiento con 5 μ M CHIR99021 por 4 horas. Luego las células fueron incubadas con formaldehído al 1% por 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave con el objeto de entrecruzar el ADN con las histonas. La reacción de entrecruzamiento se detuvo con 500 μ L de 1,25 M glicina por 5 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con 1X PBS frío y colectadas en tubos falcon de 15 mL. El pellet celular se lisó en un buffer de lisis (0.5 M HEPES pH 7.8, 1 M MgCl₂, 1 M KCl y 10% de NP-40) en presencia de 10 μ L de inhibidores de proteasas por mL por 10 minutos en hielo. Luego, los lisados fueron homogenizados en un homogenizador "Dounce" mediante 20 golpes y después de 5 minutos de centrifugación a 4500 rpm, los núcleos celulares contenidos en el pellet fueron resuspendidos en 300 μ L de buffer de sonicación (50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na deoxycholate y 0.1 % SDS) y finalmente sometidos a sonicación. Se utilizó el sonicador Bioruptor ® PLUS en el laboratorio de Ciencias Biomédicas en la Universidad Católica de la Santísima Concepción. El programa de sonificado utilizado fue: 2 rondas de 20 ciclos cada una de 15 segundos ON y 15 segundos OFF manteniendo la temperatura a 4°C. Se verificó mediante gel de agarosa al 1% que los fragmentos obtenidos correspondan a fragmentos de cromatina entre 100 y 500pb. Para ello se utilizó marcador de peso de 100pb (Thermofisher).

Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo durante la noche a 4 °C en una mezcla que contenía 2 μ g de anticuerpo anti-flag (mouse) o control IgG de ratón (Santa Cruz) más 40 μ g de cromatina en rotación constante toda la noche. Posterior a esto, a cada mezcla se le agregó 40 μ L de proteína A/G - agarosa (Santa Cruz Biotechnology) y se incubó durante 2 horas a 4 °C en rotación constante. Después de esto, la agarosa se centrifugó durante 5 minutos a 1000 r.p.m. y se lavó una vez en 500 μ L de buffer de sonicación (50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na deoxycholate y 0.1 % SDS),

dos veces en 500 μ L de buffer de lavado de inmunoprecipitación (500 mM LiCl, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 1% NP-40 y 0.1% Deoxycolato de Sodio) y una vez en 500 μ L de buffer TE pH=8.0 (Tris-EDTA). Los complejos ADN-proteína fueron eluidos desde la resina de agarosa en 100 μ L de un buffer que contenía 1% de SDS y 0.1% NaHCO₃, luego se incubaron durante 65 °C por 15 minutos. Los entrecruzamientos entre el ADN y la proteína se revirtieron por la adición de 4.1 μ L de NaCl 5 M y posterior incubación a 65 °C toda la noche. La proteinasa K se añadió durante 4 horas a 42 °C y el ADN se purificó utilizando un kit “DNA clean & concentraror™ 25 (ZYMO RESEARCH). El ADN proveniente de la cromatina de los “input” se diluyó en 100 μ L y el ADN proveniente de las inmunoprecipitaciones en 30 μ L de buffer TE pH=8.0. Se analizó la unión de SALL2 a las regiones promotoras del gen *AXIN2* por PCR cuantitativa en tiempo real utilizando los partidores detallados **la tabla 2** “partidores”. Para realizar el PCR, se utilizó 1uL de los inputs y 3uL de las inmunoprecipitaciones.

6.18.- Ensayo de Proliferación

Se sembraron 10.000 células CCD-841-CoN, HT-29 y SW480 por pocillo (placas 24 pocillos). Las células fueron contadas diariamente en microscopio de luz óptica utilizando una cámara de Neubauer, cada condición fue realizada por triplicado. Luego se comparó el número de células por día en términos de porcentaje para construir el gráfico usando Graph Prism 8.

6.19.- Estandarización esquema de tratamientos 5-FU y XAV939:

Con el objetivo de encontrar diferencias en proliferación celular utilizando 5-FU y XAV939, se estandarizó la concentración de ambos fármacos usando calceína y XTT. Se sembraron 5.000 células por pocillo (placas de 96 pocillos). Luego se realizaron los tratamientos usando 75uM de 5-FU y 12uM de XAV939 por tiempos de 24, 48, 72 y 96 horas en los modelos inducibles HT29, SW480, SW48 y SW620.

6.19.1.- Calceína: Las células analizadas en placas de 96 pocillos fueron lavadas con 1X PBS estéril a 37°C y se diluyó la calceína 2,5uL en 10mL de medio RPMI-10% FBS. Se realizó la tinción usando 100 μ L de esta mezcla por pocillo y se incubó por 20 minutos en oscuridad. Posteriormente se realizaron lavados por 5 minutos y se tomaron fotografías en el microscopio Olympus (Arquimed), usando la cámara digital Moticam Pro-2526 (Motic).

6.19.2.- XTT: Se realizó la mezcla de XTT utilizando 20uL de solución activadora B en 1mL de solución XTT A y se incubaron las células con 50uL de esta mezcla por 4 horas.

Posteriormente se realizó medición del XTT de absorbancia a 480nm. Los ensayos fueron realizados en triplicado. Normalizando por el número de células usando con absorbancia a 660nm.

6.20.- Transformación bacteriana

La transformación fue realizada por la técnica de shock térmico. Para ello, se incubaron 50 μ L de bacterias XL-Blue competentes en un tubo eppendorf de 1.5 mL con aproximadamente 100 ng de plásmido, en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, las bacterias junto con el ADN se incubaron a 42° C por 50 segundos en platina caliente y nuevamente los tubos volvieron al hielo por 2 minutos. Se agregó 250uL de medio LB a los 50-100 microlitros de bacterias y este volumen fue transferido a una placa estéril con medio sólido LB-agar con antibiótico de selección (ej: ampicilina 100 ng/mL, United States Biological), estos procedimientos fueron realizadas bajo mechero en todo momento. Las bacterias se dejaron crecer por 14-16 horas en la placa a 37° C (overnight). Al día siguiente, se seleccionó una o más colonias aisladas con una punta de 10uL o en su defecto un asa microbiológica y se traspasó de forma individual cada colonia desde la placa a un tubo de ensayo con 6 mL de caldo LB con antibiótico selección (6uL de ampicilina 100 ng/mL, United States Biological) en orbital shaker incubator (MRC). Finalmente se incubó el cultivo durante toda la noche a 37° C con agitación a 210 rpm (14-16 horas). Se utilizaron 800 μ L de este cultivo bacteriano para almacenar stock con glicerol al 20% v/v a -80° C.

6.21.- Purificación de plásmidos Midi-Prep.

Un mL del cultivo bacteriano fue inculado en 500mL de caldo LB con el antibiótico correspondiente (6uL de ampicilina 100 ng/mL, United States Biological) por 16-18 hrs a 37°C en agitación a 210 rpm. Luego, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm en centrífuga Hitachi CR22GIII (3920 xg) durante 15 minutos 4° C y se procedió a la purificación de plásmidos a gran escala con kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel), guiándose de las instrucciones del fabricante. La concentración del plásmido obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y 280nm, esto utilizando el equipo TECAN. De la relación A260/A280 se establece la pureza (considerando una razón sobre 1.8 como óptima para poder utilizar el plásmido).

6.22.- Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de ADN obtenidos fue realizada mediante geles de agarosa al 1% o 2,5% p/v (SeaKem® LE Agarose). El buffer utilizado para realizar la electroforesis fue 1X TAE (Tris Acetate EDTA Buffer #TAE50X01). A los geles se les agregó el bromuro

de etidio 0,5 µg/mL (sigma E1385-5mL). Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (GeneRuler, Thermo Scientific). Finalmente, con el objetivo de visualizar los distintos fragmentos de ADN en el gel de agarosa, el gel fue ubicado en un equipo ultravioleta transiluminador (Arquimed).

6.23.- Transfección transiente

6.23.1.- Fosfato de calcio:

Para transfectar células cultivadas en placas de 100 mm de diámetro se utilizó 250µL de 2X HBS (HEPES ((ácido 4-(2-hidroxi)etil)piperazina-1-etanosulfónico) 50 mM; NaCl 280 mM; Na₂HPO₄ x 7H₂O 1.5 mM; pH 7.05) correspondiente al tubo “A”. En paralelo se diluyó en 250uL de DMEM la cantidad de plásmidos requerida para cada experimento, para el caso de placas de 100mm se consideran 10 µg de cada vector, correspondiente al tubo “B”. Para placas de 60 mm o pocillos de placas de 6 pocillos, se utiliza 125 uL en el tubo A y 125 uL en el tubo B. Además, en estos formatos se espera que idealmente no supere los 3 µg de cantidad total de ADN.

Luego, gota a gota se agregó la dilución de ADN sobre la mezcla de 2X HBS, es decir agregando el contenido del tubo B, sobre el tubo A. Para ello es necesario apoyar suavemente el tubo eppendorf receptor sobre un agitador tipo vortex a baja intensidad. La mezcla se deja reposar por 10 minutos y se procede a agregar la mezcla 2X HBS-ADN a la placa. Para agregar los 250 uL finales a las placas de 60mm o de 6 pocillos, se utiliza una micropipeta de 200uL. Es relevante visualizar el tamaño de los cristales al microscopio óptico invertido. Luego de al menos 8 o 12 horas, se procedió a retirar el medio de cultivo con los cristales de fosfato de calcio, para cambiarlo por medio de cultivo DMEM completo. La recolección de células fue a las 24 o 48 horas, post transfección.

6.23.2.- Electroporación:

Para generar el modelo SALL2 KO en células CCD-841-CoN se utilizó como técnica de transfección transiente la electroporación. Este proceso se llevó a cabo utilizando plásmido CRISPR-Cas9 SALL2 (**ver tabla 1**) y el protocolo de Neon Transfection System (Thermo Fischer Scientific). Un millón de células fueron resuspendidas en 90 µL de buffer de resuspensión. A esta suspensión se le agregan 30 µg de ADN hasta llegar a un volumen final de 115 µL en un tubo eppendorf. Se recolectaron 100 µL de la mezcla con las puntas de electroporación suministradas por el fabricante. La condición estandarizada en la cual se pudo obtener una alta eficiencia de transfección y baja muerte celular fue de un pulso de 30 msec usando un voltaje de 1150 voltios. La recolección de células electroporadas fue a

las 48 horas. La eficiencia del método se confirmó al visualizar RFP al microscopio de epifluorescencia.

6.24.- Análisis estadísticos:

El análisis de los datos se llevó a cabo en el Programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Para análisis de variables cualitativas se utilizó prueba Chi-cuadrado (ej: al comparar la expresión de SALL2 entre diferentes características demográficas de los pacientes). Para comparar más de dos grupos, los datos se analizaron mediante ANOVA (Analysis of Variance) de una vía para muestras que difieren en solo factor (una sola variable independiente, e.g., tratamiento), o de dos vías para muestras que difieren en dos factores (e.g. tiempo de tratamiento 0, 4, 12, 24 hr). También se utilizó prueba *t*-student (ejemplo: expresión de un target de la vía Wnt y expresión de SALL2). Las comparaciones se realizaron en unidades relativas a la condición control. Se trabajó usando el intervalo de confianza de un 95% y el valor $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

Tabla 1: Plásmidos utilizados en el proyecto.

Plásmido	Objetivo	Referencia
pcDNA-Wnt3A	Plásmido de expresión eucarionte, para transfección con ligando WNT3A como activador autocrino y paracrino de la vía Wnt. Bajo promotor CMV y 1065pb. Resistencia a ampicilina.	Addgene (#35908). Najdi et al Differentiation. 2012
pGL3Basic-AX2(1078WT)/Luc	Plásmido de expresión eucarionte, reportero de luciferasa de 1000pb del promotor silvestre. Resistencia a ampicilina.	Addgene (#25701). Leung et al J Biol Chem. 2002
AX2(1078MUT)/Luc	Plásmido de expresión eucarionte, reportero de luciferasa de 1000pb del promotor mutado en un total de 200pb (sitio de unión a TCF a bp -108 to -102 mutado CTTTGAT --> CTTTGGC). Resistencia a ampicilina.	Addgene (#25704). Leung et al J Biol Chem. 2002
PGL3-Basic	Plásmido de expresión eucarionte, usado para obtener datos de actividad de luciferasa basal de la célula.	Addgene (N° Cat= E1751)
RSV-β-gal	Plásmido de expresión eucarionte, usado para normalizar valores de luciferasa respecto a total de células transfectadas.	Addgene Plasmid (#24058)
pD1321-AP-SALL2	Plásmido de expresión eucarionte, utilizado para generar modelos CRISPR-Cas9. Secuencia: GGCTCCTTAGGCCAGACGGT	pX330, Addgene (Farkas et al., 2021)
pD1321-AP-Jun_SALL2	Plásmido de expresión eucarionte, utilizado para generar modelos CRISPR-Cas9. Secuencia: CACCCCAACTAGCGGTTAC	pX330, Addgene (Farkas et al., 2021)
pD1321-AP-Vacío	Plásmido de expresión eucarionte, utilizado como control negativo en la generación de modelos CRISPR-Cas9.	pX330, Addgene (Farkas et al., 2021)

Tabla 2: Partidores utilizados en el proyecto

Partidores	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>ARID1B</i>	TCCTGTGCGCCTCAGAGACTT	CTTGGGCAAGGTTTCGATAAA
<i>ARID1A</i>	TTCCCCAACCACCAGTACAA	GACGTGAGCAGTTGGTTGAG
<i>FBXW7</i>	AGGCTTTGACAGGGCATAGT	AGAACCGGCAACAAAACCTCC
<i>FBXW11</i>	GCACTGATCCCCTATGGAAA	GTCCACACCGCCAGTTAGAT
<i>LEF1</i>	ACGACAAGGCCAGAGAACAC	CCACGGGCACTTTATTTGAT
<i>DAAM2</i>	ATCTTCCAGAAGCTGCCAAA	TTGTCCCTGGCCTCATTTAG
<i>WNT7B</i>	TCAATTCCCCGGGCTCAC	TGCGAAAGTTTCTGTGCATGA
<i>AXIN2</i>	CCCATGCCTGTCTCTTCCAA	ATCCACGCATTTCTCCCTCT
<i>ACTIN</i>	GATGAGATTGGCATGGCTTT	CACCTTCACCGTTCCAGTTT
<i>AXIN2 set1</i>	CTGTTGCATTCCAGAGCCG	CCTTAAAGGGACAGCGCC
<i>AXIN2 set2</i>	ATGTGAGTCGGCGTGTGA	AGGGAGGGGAAAAGGGGA
<i>AXIN2 set3</i>	GCGCCTTTGAAGTGCACA	TATGCAAAGATCCGAGCGG
<i>URR</i> (Riffo et al., 2022)	TGCAGTGTGGCTTGCACTAT	TGGGTGGACAGTGAGCTATG
<i>ITG1</i> (Riffo et al., 2022)	GCTTAGCCAGTTCCCTTCCA	GAGACAGTCGCCGTGCCTCA
<i>SALL2 E1A</i>	AATCCGAGAGGAGCTCTCGT	AGGGTCAGTAGAACATGCGT
<i>SALL2 total</i>	TATGTGCTAGAGCCCTTGGG	GCACTCGGAGACAGATGACA

Tabla 3: Anticuerpos primarios usados en el proyecto.

Anticuerpo	(clon) Código	Fabricante	Técnica	Dilución	Especie
SALL2	HPA004162	SIGMA	WB	1:500	Conejo
			IF	1:25	
			IHQ	1:100	
			IFm	1:100	
SALL4	(EE-30): sc-101147	Santa Cruz	WB	1:500	Ratón
	(6E3): 385M-14	Cell Marque	IHQ	1:300	
ARID1B	(KMN1): sc-32762	Santa Cruz	WB	1:350	Ratón
ARID1A	(C-7): sc-373784	Santa Cruz	WB	1:350	Ratón
FBXW7	(A-4): sc-518093	Santa Cruz	WB	1:350	Ratón
FBXW11	(C-6): sc-390629	Santa Cruz	WB	1:350	Ratón
LEF1	(B-6): sc-374522.	Santa Cruz	WB	1:500	Ratón
DAAM2	(E-1): sc-515129	Santa Cruz	WB	1:500	Ratón
WNT7B	(H-8): sc-365459	Santa Cruz	WB	1:350	Ratón
AXIN2	(C-6): sc-25302.	Santa Cruz	WB	1:500	Ratón
		Santa Cruz	IF	1:25	
β -catenina	(e-5): sc-7963	Santa Cruz	WB	1:500	Ratón
			IF	1:100	Ratón
	(β catenin1):IR702	DAKO	IHQ	1:100	Ratón
Ki-67	(MIB-1): GA626	DAKO	IHQ	1:100	Ratón
β -Actina	(C4): sc-47778	Santa Cruz	WB	1:20000	Ratón
GAPDH	(e-5): sc-7963	Santa Cruz	WB	1:20000	Ratón
HDAC 1	(10E2): sc-81598	Santa Cruz	WB	1:500	Cabra
pGSK3- β	Cs:9336	Cell	WB	1:2000	Conejo

(ser9)		signaling			
GSK3-β	Cs: D5C5Z	Cell signaling	WB	1:2000	Conejo
Flag	Anti-Flag M2, clone M2	SIGMA	WB	1:5000	Ratón
CD8	(C8: 144B) M7103	Dako	IFm	1:100	Ratón
CD68	(PG-M1) Ab783	Abcam	IFm	1:200	Ratón
Pan-CK	(AE1/AE3) 53-9003-82	Invitrogen	IFm	1:500	Ratón
Vimentina	Ab-2 (V9) MS-9003-82	ThermoSci	IFm	1:200	Ratón

*WB: western blot, IF: inmunofluorescencia, IHQ: Inmunohistoquímica. IFm: Inmunofluorescencia multiplex.

Tabla 4: Anticuerpos secundarios.

Proteína	Anticuerpo (fabricante)	Fabricante	Técnica	Dilución	Conjugado	Especie
Anti-Mouse IgG	#1705047	BioRad	WB	1:20000	HRP	Cabra
Anti-Rabbit IgG	#1706515	BioRad	WB	1:20000	HRP	Cabra
Anti-Goat IgG	#1721011	BioRad	WB	1:5000	HRP	Ratón
Anti-Mouse IgG1	Ab97240	Abcam	IFm	1:200	HRP	Cabra
Anti-Mouse IgG3	Ab98708	Abcam	IFm	1:200	HRP	Cabra
Anti-Mouse, Alexa 488	IgG(A-11001)	ThermoSci	IF	1:400	FITC	Cabra
Anti-Rabbit, Alexa 546	IgG (A-11035)	ThermoSci	IF	1:400	Cy5	Cabra

*HRP: Peroxidasa de rábano picante.

7.-RESULTADOS:

7.1 OBJETIVO I: Determinar la expresión espacio-temporal de SALL2 en la progresión del cáncer de colon.

7.1.1.- Análisis masivos de datos de expresión génica muestran que SALL2 presenta baja expresión en cáncer de colon.

Estudios previos del laboratorio utilizando la base de datos MiPanda (Farkas et al., 2021) indican que los niveles de SALL2 se encuentran significativamente disminuidos en cáncer de colon en comparación con el tejido normal. Con el objetivo de ampliar datos de la expresión de SALL2 en cáncer colorrectal (CCR) en diferentes contextos genéticos, se realizó el análisis de expresión diferencial de genes. Para ello se utilizaron grupos de datos masivos descargados desde la base de datos GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), usando las palabras claves “cáncer de colon” o “cáncer colorrectal”. Los criterios de inclusión para la búsqueda fueron: muestras humanas y experimentos de “Expression profiling by array” con un n superior a 6 muestras normal y tumoral. Basados en estos criterios se seleccionaron los estudios: GSE146587, GSE21815, GSE35279, GSE3629, GSE37182, GSE44861, GSE87211 y GSE9348. Luego, se usó el algoritmo entregado por la biblioteca “Limma-Voom” en R Studio. Con el objetivo de conocer el logaritmo del fold change (logFC) para SALL2. El LogFC y su valor de significancia estadística (Adj. P. value) fueron determinados en los siete estudios seleccionados. Los resultados se resumen en la tabla de la **Tabla 5**.

En resumen, en los ocho estudios analizados se obtuvo que SALL2 se encuentra en el grupo de genes “downregulated”, obteniendo en cada uno de ellos un LogFC con valores negativos al comparar su expresión en colon normal vs. cáncer de colon, representado en los boxplot de la **Figura 7A**. Estos resultados fueron también complementados con datos obtenidos desde las bases de datos públicos UALCAN <http://ualcan.path.uab.edu/> (**Figura 7B**) y GEPIA <http://gepia.cancer-pku.cn/> (**Figura 7C**), en donde se puede observar que los niveles de expresión de SALL2 se encuentran significativamente disminuidos en cáncer de colon, comparado con colon normal.

Tabla 5: Resultados de análisis de expresión diferencial de SALL2 en diferentes estudios de colon, recto y colorrectal.

geo_id	Tipo de cáncer	plataforma	normal	tumor	LogFC	Adj. P. value
GSE146587	Recto	GPL17077	6	6	-1.78	0.07
GSE21815	Colorrectal	GPL6480	9	132	-0.58	0.29
GSE35279	Colorrectal	GPL6480	5	140	-0.33	0.68
GSE3629	Colorrectal	GPL570	53	68	-4.19	9.60e-28
GSE37182	Colon	GPL6947	88	84	-0.60	1.14e-13
GSE44861	Colon	GPL3921	55	56	-0.09	0.56
GSE87211	Recto	GPL13497	160	203	-0.74	1.39e-18
GSE9348	Colorrectal	GPL570	12	70	0.41	0.22

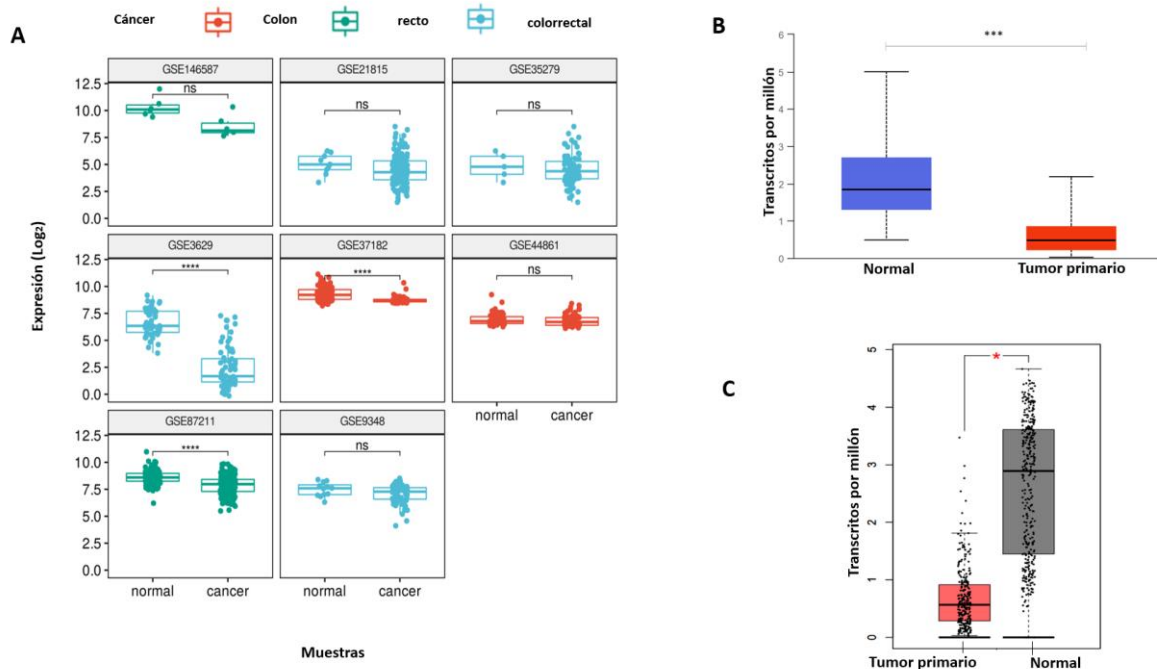


Figura 7: La expresión de ARNm de *SALL2* se encuentra disminuida en cáncer de colon, comparando con tejido normal. A) Boxplot de la expresión de *SALL2* en tejido de cáncer de colon, recto y cáncer colorrectal respecto al tejido de colon normal humano (**** = $p < 0,001$). El eje y representa el logaritmo en base 2 de la expresión de *SALL2*. **B)** Análisis de expresión diferencial de *SALL2* desde base de datos UALCAN <http://ualcan.path.uab.edu/> (***) = $p = 7,5E-05$). 41 muestras normales y 289 muestras de CCR desde TCGA **C)** Análisis expresión diferencial de *SALL2* desde base de datos GEPIA <http://gepia.cancer-pku.cn/> (* = $p < 0,05$). 349 muestras normales y 275 muestras de CCR desde GTEX y TCGA.

7.1.2- Expresión de SALL2 en tejidos de colon normal, adenoma y cáncer.

Con el objetivo de evaluar cambios en la expresión proteica de SALL2 en muestras humanas de colon desde Pacientes Chilenos se obtuvo la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Comité Ético-Científico del Hospital Guillermo Grant-Benavente para estudios de inmunohistoquímica (IHQ). **Ver Anexo 3 y 4**, respectivamente. Para ello se seleccionaron un total de 130 tejidos fijados en formalina, embebidos en parafina provenientes de la Unidad de Anatomía Patológica. Se usó como criterio de inclusión biopsias con el diagnóstico de adenocarcinoma de colon y como exclusión, a pacientes que hayan recibido tratamiento con radioterapia a la fecha de toma de muestra.

Respecto a tinciones y análisis de localización mediante IHQ para SALL2 en tejido humano, sólo existen cuatro estudios publicados en diferentes contextos tumorales y con distintas condiciones. Estos trabajos fueron utilizados para adaptar el protocolo y posterior análisis de la IHQ de SALL2 (**Tabla 6**).

Tabla 6: Inmunohistoquímica de SALL2 en tejidos humanos.

Contexto tumoral	Patrón de tinción	Anticuerpo	Dilución	Referencia
Sarcoma Sinovial	Tinción nuclear y citoplasmática en células tumorales.	(N-terminal) #HPA004162; Sigma-Aldrich	1:100	(Nielsen et al., 2003).
Cáncer de Ovario	Tinción fuertemente nuclear en el epitelio sano de ovario.	C-terminal (antisuero de conejo)	1:3000	(Sung et al., 2013).
Piel Humana	Núcleo de fibroblastos estromales en la dermis reticular.	(N-terminal) #HPA004162; Sigma-Aldrich	1:2000.	(Sung, 2011)
Cáncer de mama	Núcleo y citoplasma de células tumorales.	(N-terminal) #HPA004162; Sigma-Aldrich	1:100.	(Ye et al., 2019)

Para el correcto análisis de la tinción de IHQ de SALL2, fue necesario realizar la estandarización del recuperador antigénico, la generación de controles de IHQ y la optimización de la dilución del anticuerpo primario. La recuperación antigénica es un proceso que consiste en exponer los epítopes por acción enzimática (PIER: Proteolitic-

Induced Epitope Retrieval) o por calor (HIER: Heat-Induced Epitope Retrieval), dependiendo los requerimientos del tejido y dicho anticuerpo (Shi et al., 1997). Este proceso, se debe estandarizar al momento de realizar IHQ, ya que en rutina clínica la fijación en formaldehído es el método de preservación de estructuras tisulares más usado. Sin embargo, el mecanismo de fijación de la formalina tamponada al 10% genera la aparición de puentes metílenos. Dichos puentes o también conocidos como “crosslinking” generan el enmascaramiento de los epítopes del tejido, lo que implica la baja penetración de los anticuerpos al tejido y por ende no se realiza correctamente el reconocimiento epítope-parátopo.

Entonces para la recuperación de los determinantes antigénicos del tejido, producto del efecto de la fijación con formalina, se evaluó el uso de buffer citrato a pH 6, solución de EDTA a pH 8 y buffer TP LINK proveniente desde el kit DAKO. De esta primera estandarización se concluyó que con el buffer TP LINK del kit DAKO se obtiene la óptima recuperación antigénica, por lo que se continuó utilizando dicho buffer para la IHQ de SALL2 (**Figura 8A**).

Para generar los controles positivos de la IHQ se utilizó la línea celular de epitelio de colon no tumoral CCD-841-CoN, ya que desde análisis de Western blot se determinó previamente que expresan SALL2 (A. Quiroz, unidad de investigación 2019). Se generó un citoagar y posteriormente se realizó la IHQ anti-SALL2 observando, un patrón positivo de tinción, principalmente en el núcleo (**Ver figura 8A**). Como control negativo de expresión se utilizó un modelo isogénico deficiente en SALL2, CCD-841-CoN SALL2^{-/-}, generado previamente con CRISPR-Cas9 (Farkas et al., 2021), y como control negativo del anticuerpo se realizó la IHQ en la línea celular CCD-841-CoN (SALL2^{+/+}) en ausencia del anticuerpo primario. De estos dos controles negativos no se observó tinción de SALL2. Finalmente, para comprobar la especificidad de la tinción de SALL2 en tejidos, se incubó el tejido humano de colon normal, sin anticuerpo primario y tampoco se vio tinción de fondo o inespecífica con la técnica realizada (**Figura 8B**). Estos controles nos permiten confirmar que las condiciones utilizadas eran óptimas para realizar la IHQ de SALL2 usando el kit DAKO.

Para la estandarización de la dilución del anticuerpo a utilizar a modo de estudio preliminar se seleccionaron tejidos de 12 pacientes, considerando 4 tejidos normales, 4 tejidos de adenoma y 4 tejidos de adenocarcinoma. Con estas muestras se construyó un “*tissue microarray*” y se evaluó dilución 1:100, 1:75, 1:50 y 1:25, observando tinción positiva

de SALL2 con las dos diluciones más concentradas, y seleccionando finalmente la dilución 1:25 para estudios posteriores (**Figura 8C**).

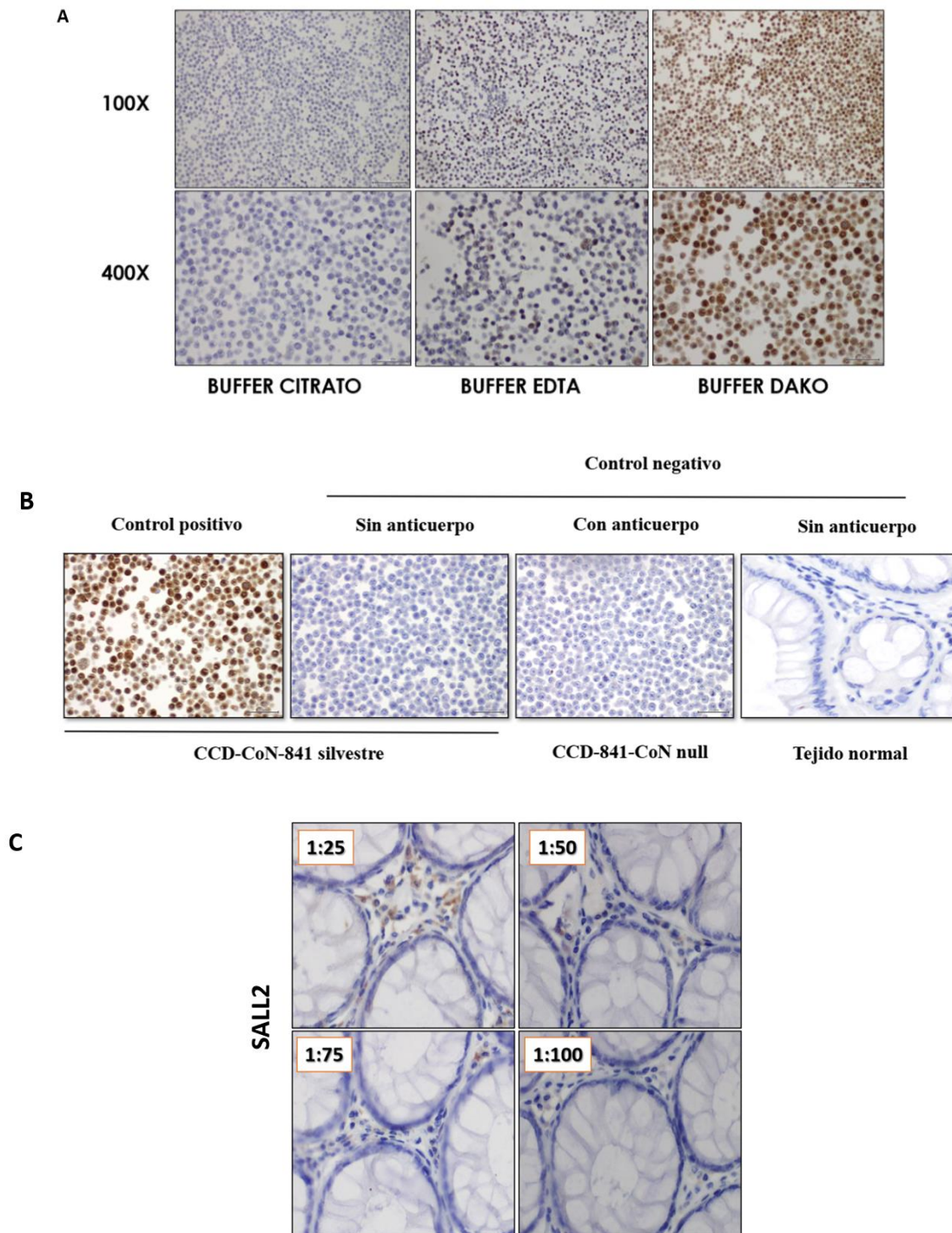


Figura 8: Estandarización de condiciones para IHQ de SALL2. A) Estandarización de la recuperación antigénica de SALL2 usando buffer citrato, EDTA y DAKO. Se trabajó con un

Citoagar de células CCD-841-CoN, aumento 100X y aumento 400X. **B)** Controles de la IHQ de SALL2 (control positivo y negativo). **C)** Estandarización de las diluciones del anticuerpo SALL2, 1:25 hasta 1:100 (Sigma HPA004162). Tejido normal de colon 400X.

Una vez lograda la estandarización de la IHQ de SALL2 y controles respectivos, se procedió a generar un *tissue microarray* desde tejidos de 130 muestras. Este incluyó 42 muestras de tejido normal, 40 de adenoma y 48 adenocarcinoma de colon. La información demográfica de la cohorte de estudio se encuentra resumida en la **tabla 7**, considerando 66 mujeres y 64 hombres con una edad promedio de 67 años.

Tabla 7: Características demográficas de la cohorte de estudio.

Diagnóstico Histológico	Número	Mujeres	Hombres	Edad promedio (años)
Normal	42	20/42 (47,6%)	22/42 (52,4%)	70
Adenoma	40	19/40 (47,5%)	21/40 (52,5%)	63,5
Adenocarcinoma	48	27/48 (56%)	21/48 (43,7%)	69,6
Total	130	66	64	67,7

De los resultados de la IHQ de SALL2 se pudo observar que consecuente a los resultados bioinformáticos, la expresión proteica de SALL2 fue significativamente menor en los tejidos de cáncer de colon en comparación con los tejidos de colon normal (**Figura 9A**). La expresión de SALL2 en las IHQs fue cuantificada con Image J, utilizando la herramienta “cell counter”, generando el gráfico de la **Figura 9B**. Se detectó expresión positiva de SALL2 en el 90,6 % de los tejidos normales, el 74,3 % de los adenomas y el 25,4 % de los tejidos CCR.

Entendiendo que la función de SALL2 depende de su localización nuclear (Hermosilla et al., 2018), analizamos la localización subcelular de SALL2 en las muestras de IHQ. En los tejidos normales, se detectó SALL2 en el núcleo y el citoplasma de células epiteliales y del estroma (**Figura 9C**), encontrando una mayor proporción de SALL2 nuclear (23,3 %) en el estroma que en el epitelio (15,4%) (**flechas negras en la figura 9A**). La expresión nuclear de SALL2 en el epitelio disminuyó significativamente durante la progresión a adenoma y adenocarcinoma.

Además, evaluamos la intensidad de la tinción de SALL2 en el estroma y el epitelio desde la IHQ. La intensidad de la tinción se clasificó como 0 = sin expresión/negativa; + = expresión débil; ++ = expresión moderada; +++ = expresión fuerte. La tinción promedio detectada en los tejidos normales, en estroma ó epitelio, fue fuerte (+++), en adenoma la tinción fue débil (+) en el epitelio y fuerte (+++) en el estroma, y en CCR fue negativa (0) en epitelio y moderada a fuerte (++ o +++) en el estroma (**Figura 9D**). En resumen, la tinción de mayor intensidad observada en las glándulas fue en tejidos normales y esta fue disminuyendo hacia la progresión del adenocarcinoma.

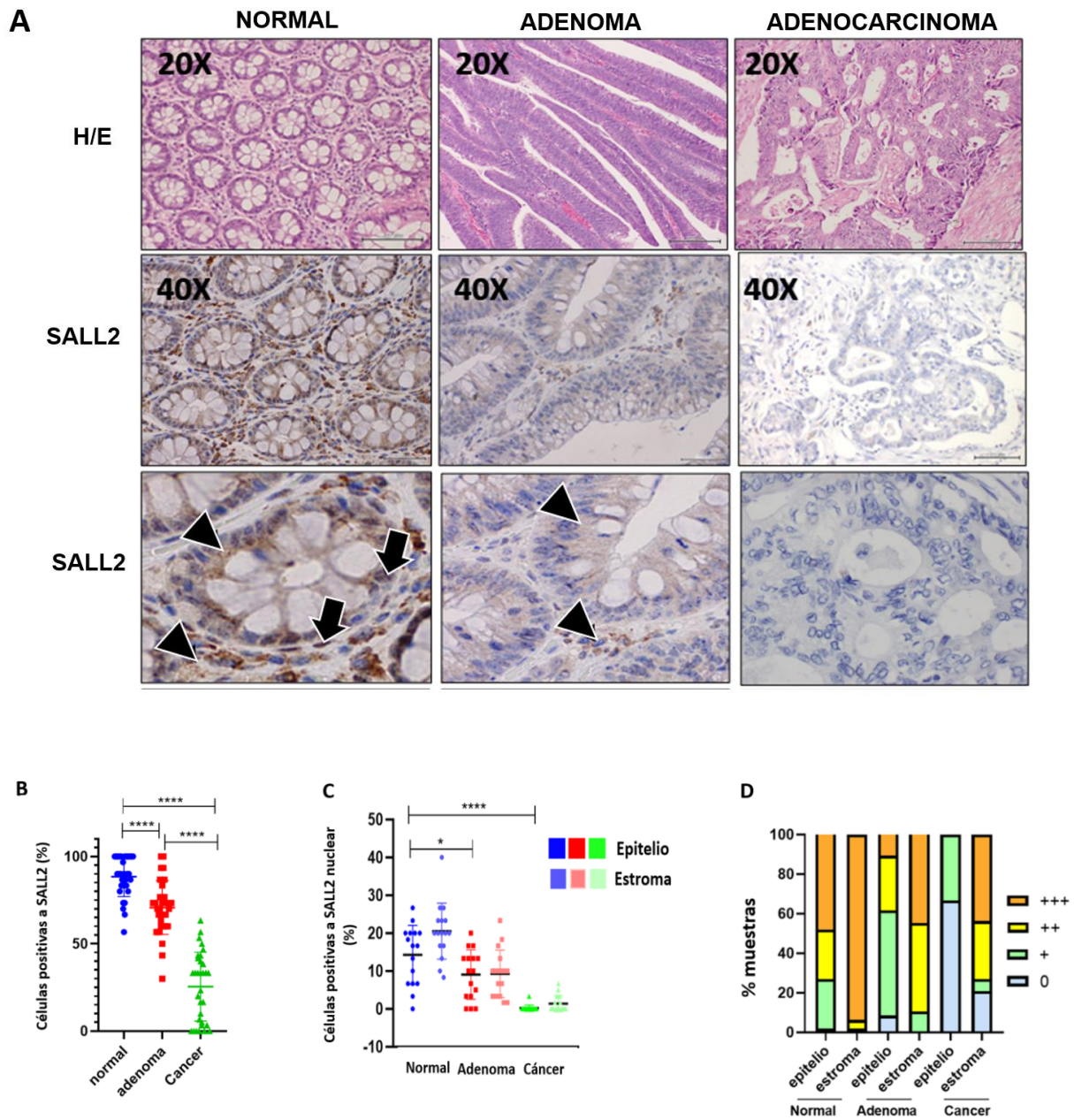


Figura 9: Expresión proteica de SALL2 en tejidos humanos de una cohorte chilena de estudio. Resultados representativos de tejidos normal, adenoma y adenocarcinoma de colon. **A) Arriba**, tinción con Hematoxilina-Eosina (H/E) en aumento 20X. **Medio**, IHQ de SALL2 en aumento 40X. **Abajo**, zoom digital del aumento 40X. La cabeza de flecha indica tinción citoplasmática de SALL2 tanto en estroma como en las glándulas y la flecha negra

indica tinción nuclear tanto en estroma como en las glándulas. **B)** Porcentaje de células totales positivas para SALL2 (****= $p < 0,001$). **C)** Porcentaje de células, de epitelio y estroma, con tinción nuclear de SALL2 (*= $p < 0,05$, ****= $p < 0,001$). **D)** Gráfico de distribución de intensidad de tinción. Indica el porcentaje de muestras para epitelio o estroma en los diferentes contextos analizados. Naranja: +++ (tinción fuerte), Amarillo: ++ (Moderado), Verde: + (débil) y celeste: 0 (negativa).

7.1.3- Asociación de expresión de SALL2 entre factores pronósticos y características clínicas de la cohorte de estudio.

Adicionalmente a la evaluación de SALL2 en los tejidos, se evaluó β -catenina, SALL4, Ki67 y vimentina. β -catenina es un componente de la vía de señalización Wnt y desempeña un papel importante en la progresión de ciertos tipos de cáncer, como el de mama, melanoma y CCR. Específicamente, la acumulación anormal de β -catenina nuclear se considera un marcador positivo de progresión en CCR, ya que promueve la proliferación celular, la migración y la invasión (Clevers et al., 2013). Cuando β -catenina es expresada en la membrana, se asocia con uniones adherente célula-célula y se considera un marcador negativo de progresión, ya que la vía Wnt no se encontraría activa. Finalmente, cuando β -catenina se encuentra con un patrón mixto de tinción, tanto nuclear como citoplasmático, es considerado positivo. Esto tiene directa relación con la activación de la vía Wnt canónica (Gao et al., 2014).

SALL4, miembro de la familia SALL que se considera un marcador de mal pronóstico encontrándose aumentados sus niveles en varios contextos de cáncer como leucemia mieloide, cáncer gástrico, de mama o carcinoma hepatocelular (Sun et al., 2022; X. Zhang et al., 2015). Ki67, es un biomarcador de índice mitótico por lo que relaciona con el estado proliferativo de las células. En este contexto, alta expresión de Ki-67 se correlaciona significativamente con una baja supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad (Luo et al., 2019). Por último, vimentina, es un marcador mesenquimal, se utilizó para evaluar la calidad tisular de las muestras en el “*tissue microarray*”. Muestras vimentina negativas se consideran no óptimas para el estudio.

Nuestros resultados indicaron que los 130 tejidos comprendidos en el “*tissue microarray*” fueron vimentina positiva, por lo que no fue necesario excluir muestras. En la figura 10, se muestran imágenes representativas de los tejidos vimentina positivos y los marcadores de

malignidad y progresión SALL4, β -catenina, y Ki67. Para poder utilizar dichos marcadores en el tissue microarray de colon normal y CCR, se realizaron controles positivos externos, utilizando, tejidos que se sabe expresen Vimentina, SALL4, Ki67 y β -catenina. Para Vimentina y β -catenina se utilizó cáncer de colon, para SALL4 Disgerminoma, un tipo de tumor de ovario y para Ki67 amígdala. Estos tejidos fueron seleccionados, ya que previamente se publicó que SALL4 se encuentra sobre expresado principalmente en tumores de célula germinales y se utiliza como biomarcador diagnóstico en Disgerminoma (Mei et al., 2009). Como era esperado, SALL4 mostró tinción nuclear en las células de disgerminoma, comprobando que la técnica y anticuerpo primario funcionaron (**Figura 10**) (Cao et al., 2009). Por otra parte, la amígdala es uno de los tejidos con alta tasa proliferativa (Luo et al., 2019), se utilizó como control positivo de Ki67, encontrando células con marcación nuclear para Ki67. Respecto a β -catenina, se observó tinción de membrana en las glándulas de tejido normal. Finalmente, para vimentina, se observó fuerte tinción citoplasmática en el estroma tisular, como vimentina es un filamento intermedio, se esperaba una alta expresión en tejidos humanos. En resumen, como todos los marcadores dieron el patrón esperado, se procedió al análisis de cada uno de ellos.

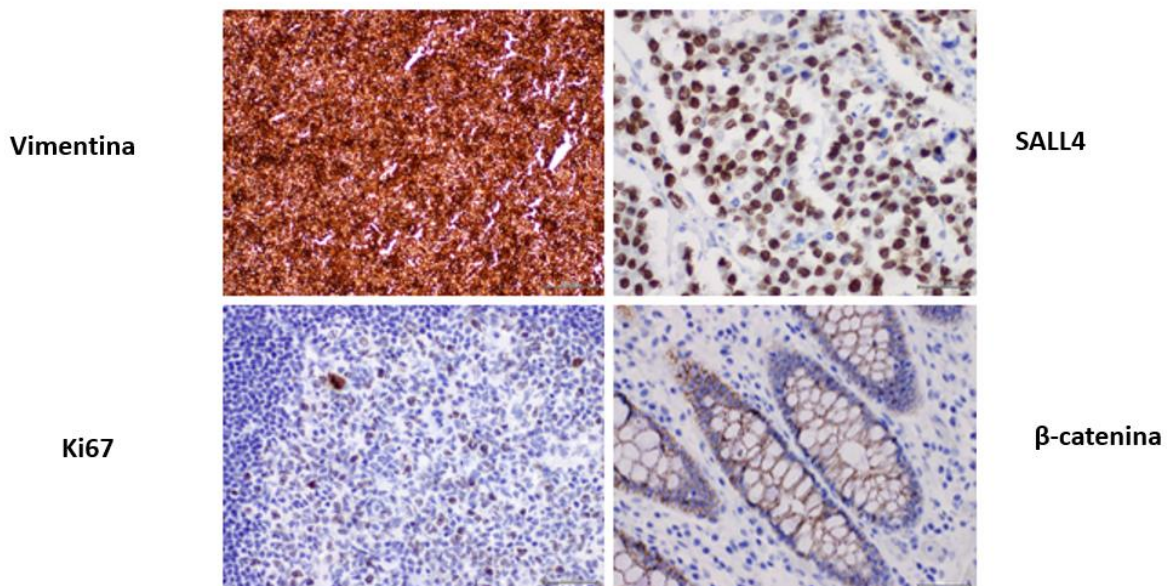


Figura 10: Controles positivos para la tinción de Inmunohistoquímica de β -catenina, Ki67, SALL4 y Vimentina. Se muestra vimentina en una muestra de cáncer de colon, SALL4 en Disgerminoma, Ki67 en amígdala y β -catenina en tejido de colon normal.

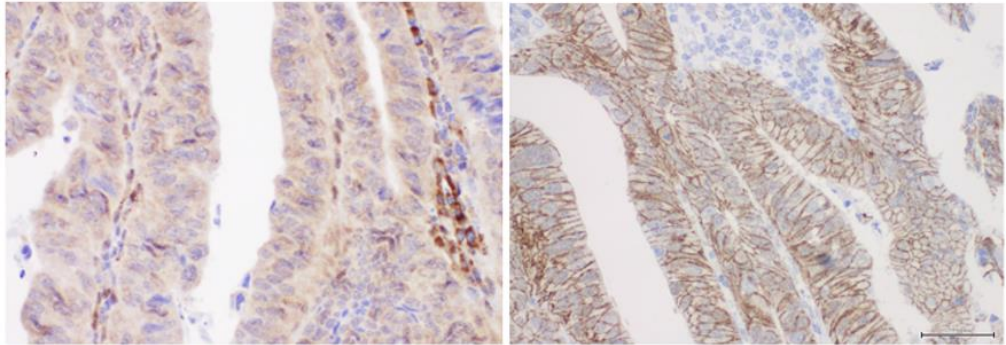
Del análisis de la IHQ de β -catenina, nuestros resultados indican una asociación negativa entre SALL2 y los niveles de expresión de β -catenina nuclear (**tabla 8**). La **Figura 11A** muestra que en tres muestras independientes de CCR (pacientes #89, #118 y #120), la inmunotinción de SALL2 es positiva, y la localización de β -catenina es en la membrana plasmática, lo que se considera una tinción negativa. Además, en estas muestras el parámetro de permeación linfovascular es negativo. Por el contrario, en otras tres muestras de CCR representativas (pacientes #115, #91, #95) se observa una inmunotinción SALL2 negativa y la localización de β -catenina es fuertemente nuclear, estando presente en grupos celulares del frente migratorio (flecha roja). Además, en estas muestras el parámetro de permeación linfovascular es positivo (**Figura 11B**). En resumen, cuando SALL2 presenta una tinción negativa, el marcador de β -catenina nuclear fue positivo en el 70,5% de los pacientes, mientras que el resto de los pacientes correspondiente al 29,4% presenta β -catenina negativo. Estas diferencias fueron significativas y se resumen en la **tabla 8**. También se relacionó con el parámetro de invasión, con la ausencia de SALL2 en CCR, el 69,2% de los pacientes tienen invasión de serosa en comparación con el 31% en tejidos SALL2 positivos.

A

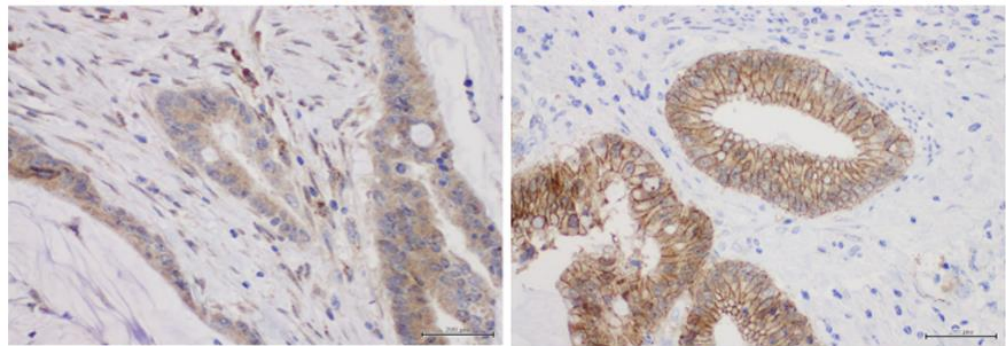
**SALL2
positivo**

**β -catenina
negativo**

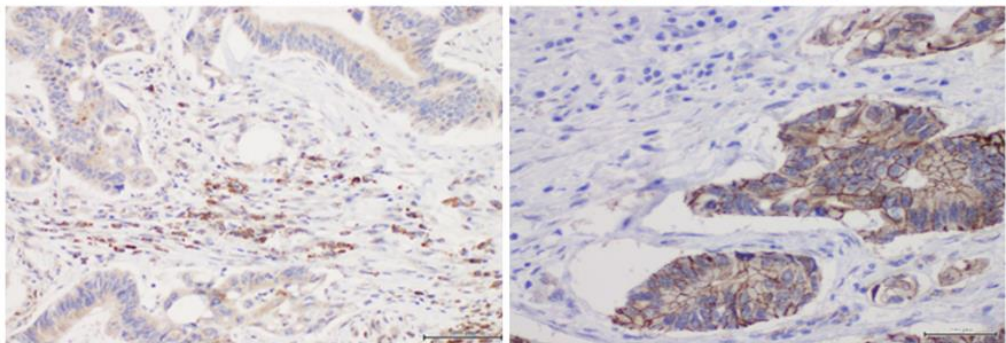
**Paciente
1
(#89)**



**Paciente
2
(#118)**



**Paciente
3
(#120)**



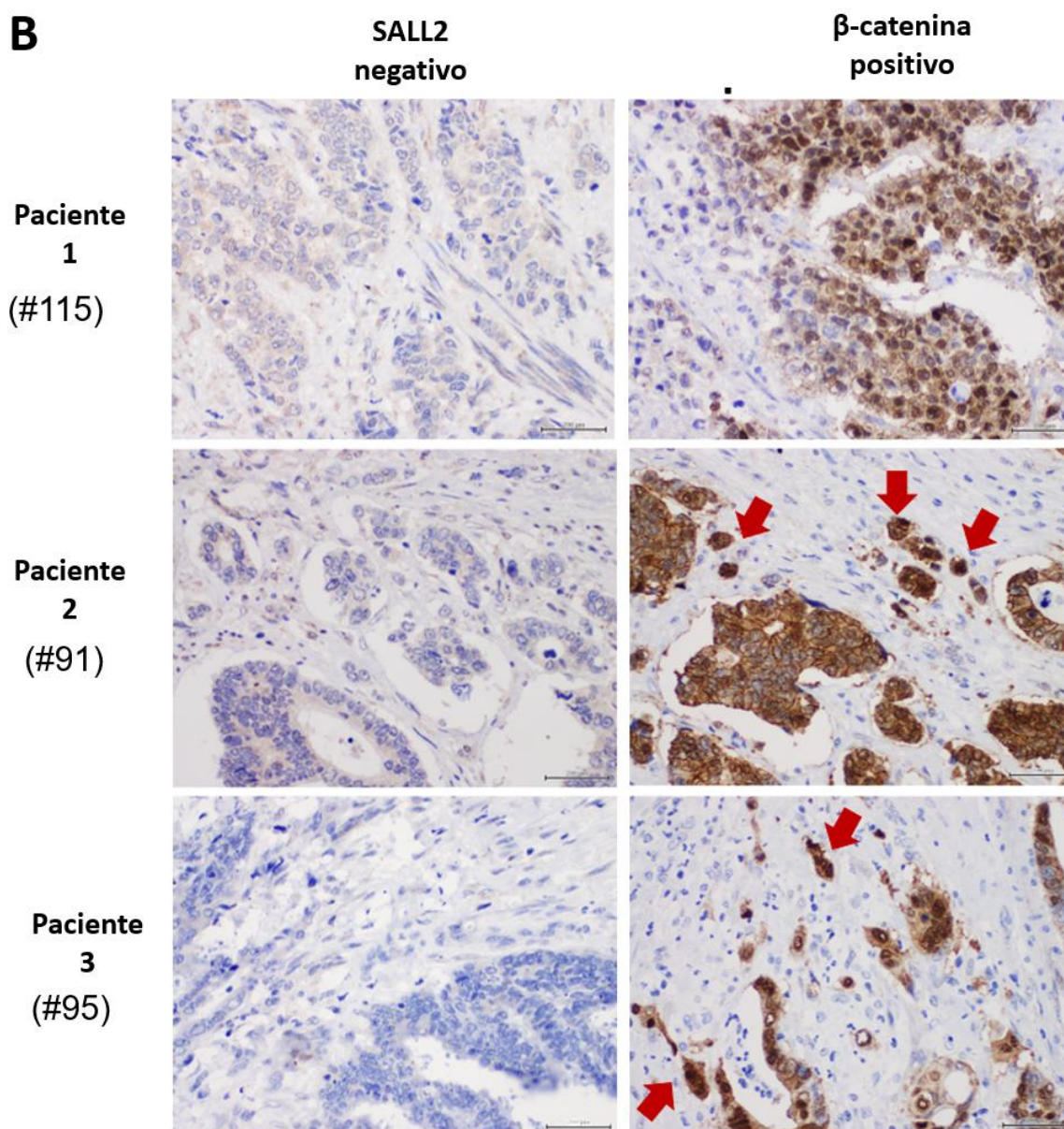


Figura 11: Relación negativa entre la expresión de SALL2, permeación linfovascular, y β -catenina nuclear. A) Muestras representativas de CCR, IHQ de SALL2 positiva tanto en estroma como en el epitelio. IHQ de β -catenina negativa (tinción en membrana) y permeación linfovascular negativa. **B)** Muestras representativas de CCR, IHQ de SALL2 negativa o leve correlaciona con patrón positivo de β -catenina nuclear, en células del frente migratorio (flechas rojas), y presentan permeación linfovascular positiva.

Luego, el análisis de la expresión de SALL4 en la misma cohorte de 130 muestras dio negativo para SALL4, siendo todas las muestras vimentina positivas y observando que el control positivo de SALL4 marcaba correctamente, sin embargo, no fue posible detectar SALL4 en tejido de colon normal o tumoral (**Figura 12A**).

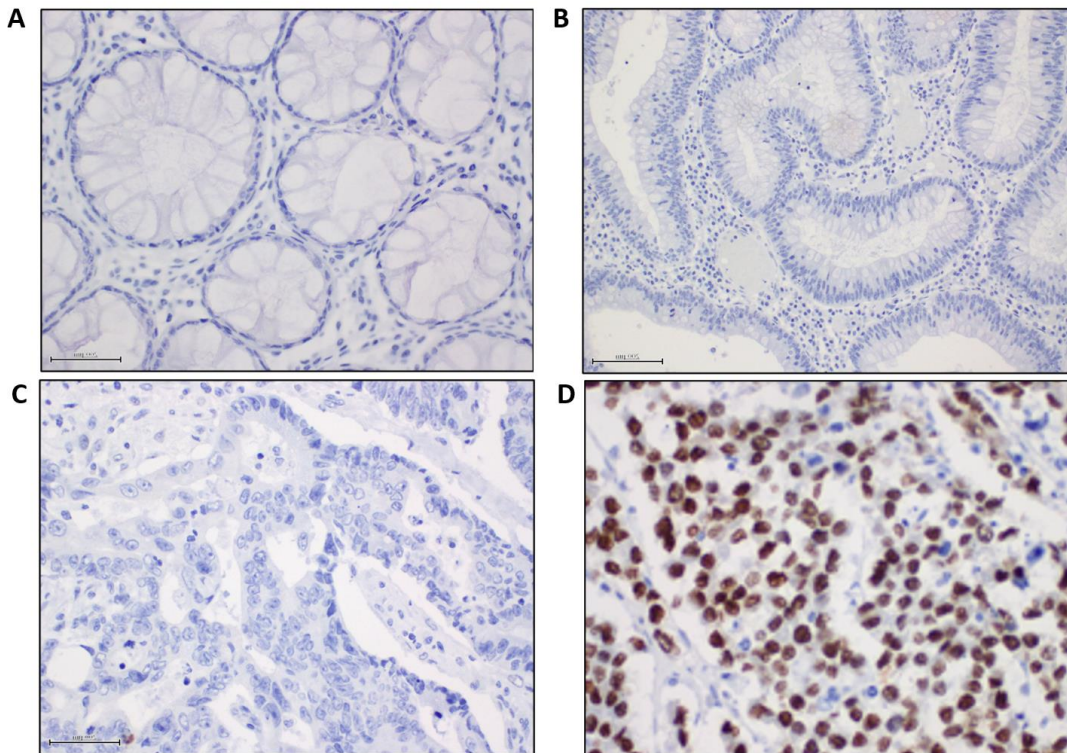


Figura 12: Expresión de SALL4 en tejido de colon. IHQ de SALL4 en tejido de colon normal (**A**), adenoma (**B**) y cáncer (**C**). En **D**, se muestra el control positivo de SALL4 usando un tejido de Disgerminoma.

Por otra parte, se evaluó una posible asociación entre la expresión de SALL2 y el marcador de proliferación Ki67. El resultado de muestras positivas para SALL2 y positivas para Ki67 fue de 36,8% mientras que para muestras SALL2 negativas y Ki67 positivas fue del 63,1%, por lo que no se observó una diferencia significativa respecto a SALL2 ($p=0,26554$). Resultados esperados, de relacionan inversa entre SALL2 y Ki67, son presentados en la **figura 13A-B**.

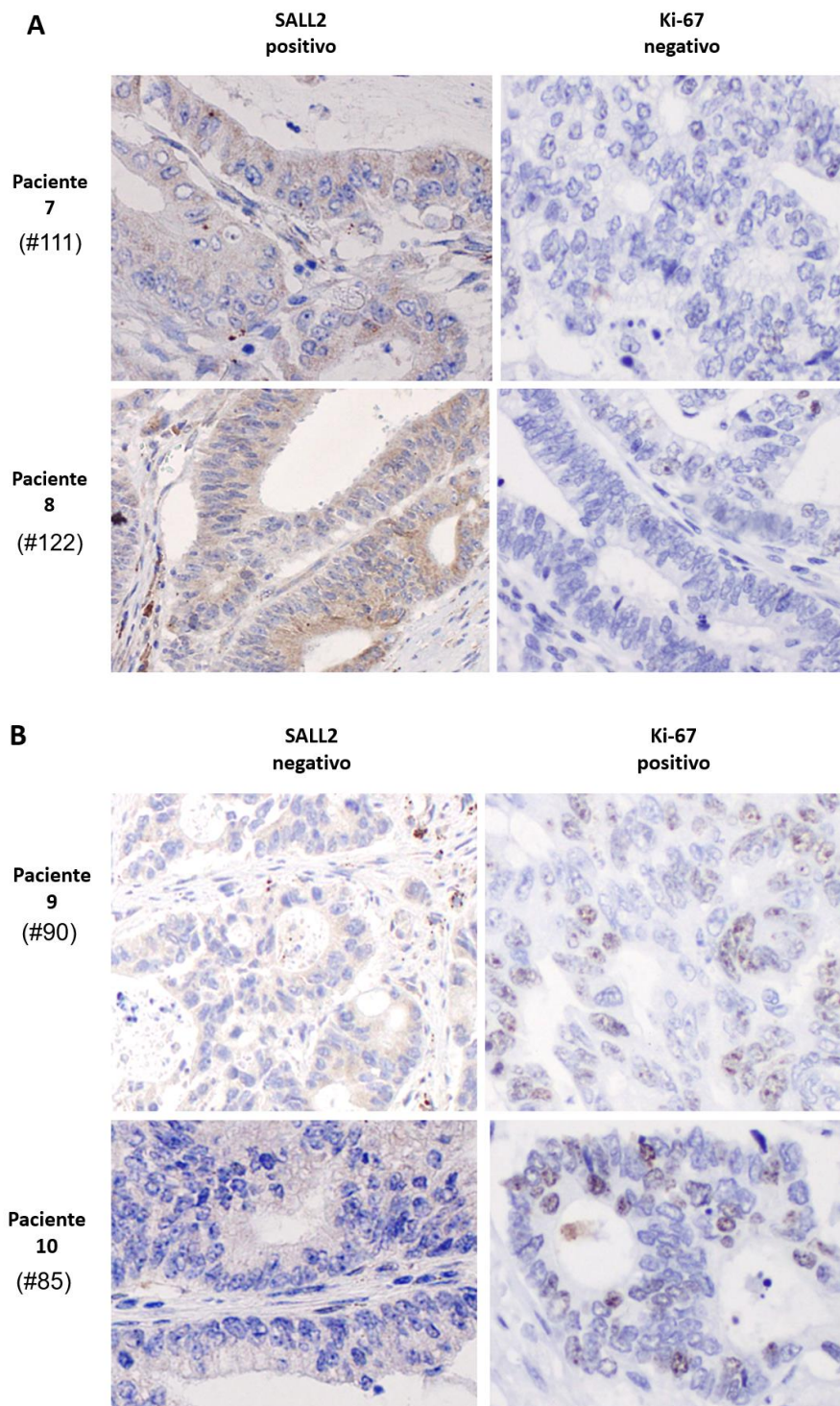


Figura 13: Expresión de Ki67 en muestras positivas y negativas para SALL2. A) Expresión proteica de SALL2 positiva y Ki67 negativa en muestras de cáncer. **B)** Ausencia de expresión de SALL2 en muestras de cáncer y Ki67 positivo.

SALL2 ha sido postulado como un biomarcador de buen pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Esto debido a que favorece el proceso de apoptosis y disminuye la proliferación (Ye et al., 2019). Por este motivo, para ver si esta relación se mantiene en cáncer de colon, se estudió la relación entre la sobrevida de los pacientes del estudio y los niveles de SALL2, a través de una curva de sobrevida o análisis de Kaplan Meier.

Desde el certificado de defunción (obtenido del registro civil) de los pacientes se obtuvo la fecha de fallecimiento y la causa de muerte. Para el análisis se consideraron sólo pacientes cuya causa principal de muerte fue cáncer, encontrándose dentro de ellas: falla multiorgánica/ shock séptico/tumor recto sigmoideo, falla multiorgánica/ cáncer colon con metástasis hepática, y cáncer de colon etapa IV/ metástasis hepáticas. Del total de 13 pacientes fallecidos a la fecha, se excluyó 1 paciente, fallecido por SARS-CoV-2. Quedando para el análisis dos grupos de 6 pacientes fallecidos por cáncer de colon, SALL2 negativo y SALL2 positivo, respectivamente. Desde la tabla de contingencia (**tabla 8**), se observa que no existe una relación significativa entre el grupo fallecido versus vivo dependiente de la expresión de SALL2. Sin embargo, la tendencia observada, graficada en la **figura 14** indica que la sobrevida a los 500 días desde el diagnóstico para el grupo de SALL2 positivo es del 66,6% y de un 16,6% para los pacientes SALL2 negativo. Esta misma tendencia se evidenció realizando un análisis de sobrevida utilizando la base de datos R2. Similar a los resultados obtenidos en nuestra cohorte de estudio, existe una tendencia a que pacientes con expresión disminuida de SALL2 muestran menor sobrevida general (**Figura 15**).

Por otro lado, la expresión de SALL2 no mostró una correlación significativa con el género, el estado de los ganglios, el tamaño tumoral, la inestabilidad microsatelital, o la sobrevida entre otros parámetros evaluados (**Tabla 8**). Sin embargo, la expresión de SALL2 correlacionó significativamente con la edad, existiendo una relación positiva entre pacientes mayores de 60 años, con la ausencia de la expresión de SALL2.

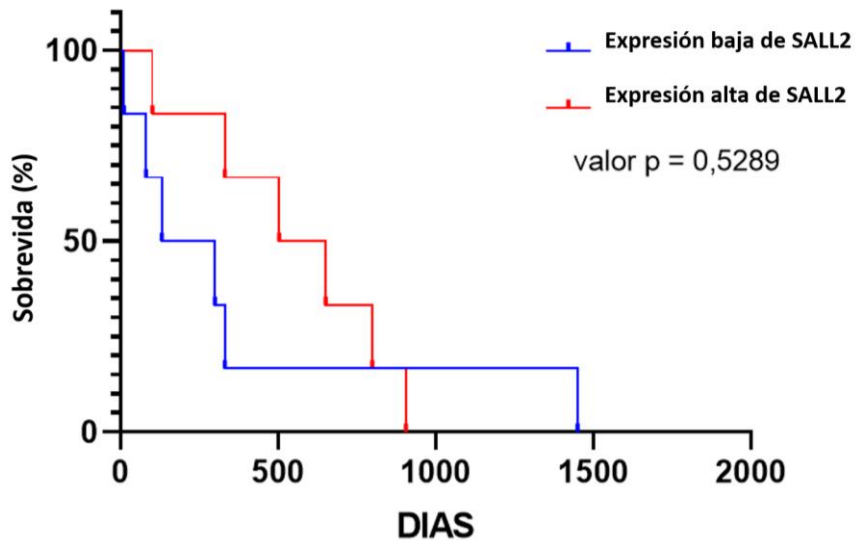


Figura 14: Pacientes con expresión disminuida de SALL2 muestran menor sobrevida general en CCR. Gráfico de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de sobrevida general y en el eje x se representa el paso de los días. De los pacientes fallecidos por cáncer (N=6) SALL2 negativos y (N=6) SALL2 positivos ($p=0,5289$).

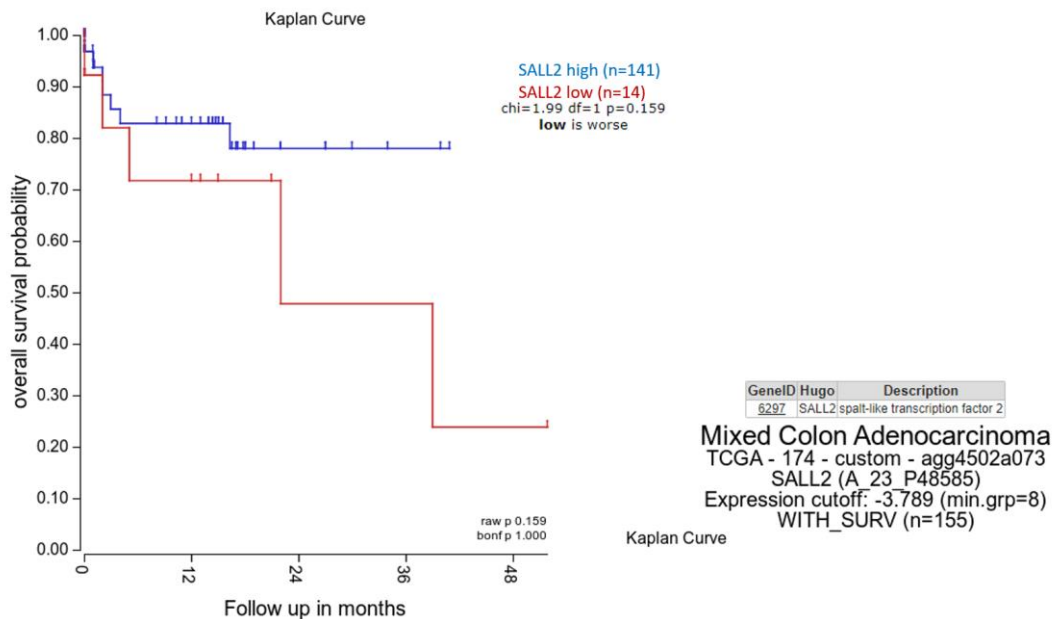


Figura 15: Pacientes con expresión disminuida de SALL2 muestran menor sobrevida general en CCR. Utilizando la base de datos R2 Genomics: (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) la plataforma “Kaplan Meier”, es posible observar que en pacientes con alta expresión de SALL2 en CCR (azul, n= 141) presentan una mejor sobrevida general, mientras que pacientes con pérdida de expresión de SALL2 (rojo n=14) presentan una peor sobrevida, sobreviviendo sólo en un 20% a los 48 meses (1460 días) desde el diagnóstico de la enfermedad ($P=0,159$).

Tabla 8: Características clínicas de la cohorte de estudio.

Características Clínicas		SALL2 negativo		SALL2 Positivo		p-value
		N	%	N	%	
Género	Femenino	18	66,6666667	9	33,3333333	0,3469
	Masculino	16	76,1904762	5	23,8095238	
Edad	Mayor 60	26	47,0588235	5	23,8095238	0,0100
	Menor 60	8	47,0588235	9	52,9411765	
Tamaño tumoral	Menor 5 cm	8	57,1428571	6	42,8571429	0,1610
	Mayor 5 cm	26	76,4705882	8	23,5294118	
T	T1-T2	4	50	4	50	0,1596
	T3-T4	30	75	10	25	
N	N0	18	69,2307692	8	30,7692308	0,9503
	N1	6	75	2	25	
	N2	10	71,4285714	4	28,5714286	
Invasión	Mucosa	2	50	2	50	0,5649
	Submucosa	1	33,3333333	2	66,6666667	
	Serosa	31	75,6097561	10	24,3902439	
Inestabilidad microsatelital	Positivo	33	73,3333333	12	26,6666667	0,1999
	Negativo	1	33,3333333	2	66,6666667	
β-catenina en el frente migratorio	Positivo	24	80	6	20	0,0471
	Negativo	10	55,5555556	8	44,4444444	
Permeación linfovascular	Positivo	19	76	6	24	0,3074
	Negativo	15	65,2173913	8	34,7826087	
Sobrevida	Fallecidos	7	53,8461538	6	46,1538462	0,1568
	Vivos	26	74,2857143	9	25,7142857	
Ki67	Negativo	22	75,862069	7	24,137931	0,2654
	Positivo	12	63,157894	7	36,842105	

7.1.3- Expresión de SALL2 en el nicho de células madre en la cripta del colon.

En el proceso de proliferación de las células de la cripta es muy importante el balance entre la proliferación y la diferenciación. La homeostasis es realizada por células madre intestinales multipotentes o también conocidas como células LGR5+ (presentes en el nicho de células madre del fondo de la cripta). Para favorecer la proliferación, la expresión de los ligandos Wnt muestra una pendiente decreciente del gradiente a lo largo del eje cripta, siendo mayormente expresada en la base de la cripta Lieberkühn, en el nicho de células madre. Este nicho de células madre se compone por células LGR5+, células de Paneth y fibroblastos estromales (**Ver esquema figura 2**) (Osawa et al., 2016). Entonces una primera interrogante en la positividad de SALL2 en el estroma-epitelio de tejidos normales es si se encuentra expresado principalmente en la región de diferenciación de la cripta o en el nicho de células madre (**Figura 16A**).

Para dar respuesta a esta interrogante, de los 42 tejidos normales analizados se seleccionaron 11 muestras positivas para SALL2 donde el corte histológico permitía una visión longitudinal de la cripta y, por ende, el análisis de las regiones de la cripta. De las glándulas analizadas, sólo se consideró como positivo la tinción de SALL2 nuclear, ya que esto permite inferir que el programa transcripcional dependiente de SALL2 estaría activo. Se encontró que la expresión de SALL2 nuclear es positiva, en un 71,6% en células basales y en un 22,8% en células apicales de la cripta del colon. Esto indica que SALL2 está localizado en la región del nicho de células madre correspondiendo principalmente a células estromales (**ver figura 16B**). En la **figura 16C**, se muestra una imagen representativa del análisis histológico, dividiendo la cripta de Lieberkühn en las dos grandes regiones mencionadas. Considerando con tinción nuclear positiva en la base (flechas azules) y en la región de diferenciación (flechas rojas).

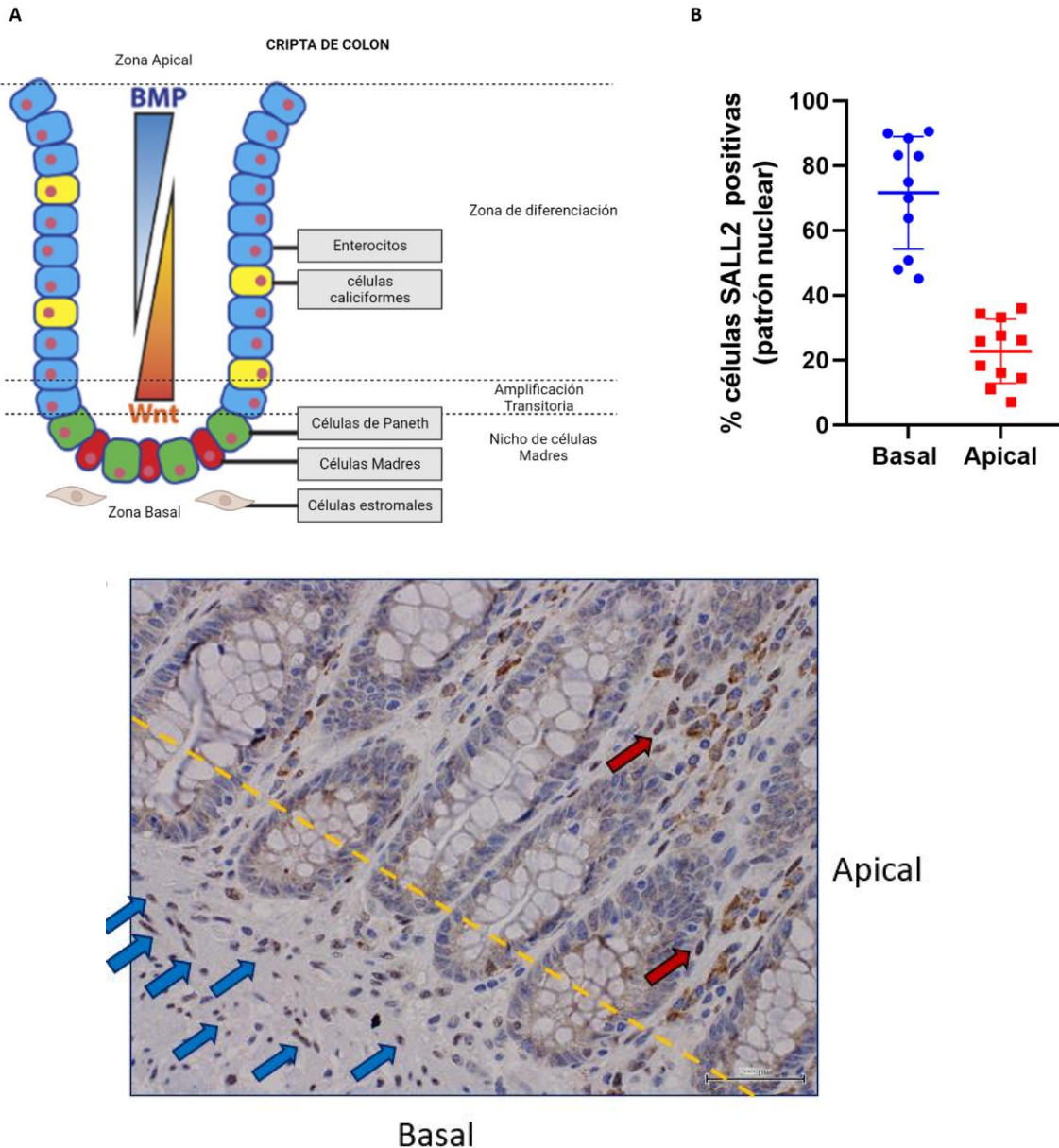


Figura 16: SALL2 nuclear se localiza en el nicho de células madre en tejido normal de colon. A) Esquema gráfico de la cripta del colon, en donde se observa el nicho de células madre, en la zona basal, amplificación transitoria y diferenciación o apical. Fuente: creación propia, modificado de (Barker et al., 2013) **B)** Cuantificación (%) de la localización de SALL2 en la región basal versus apical, sólo considerando como positivo el patrón nuclear. Cada punto representa el % de SALL2 positivo en una muestra del total de células positivas **C)** Imagen representativa de la cuantificación de SALL2 en la cripta del colon con corte longitudinal, utilizando “cell counter” en Image J.

7.1.4- Expresión de SALL2 en el estroma de tejido de colon humano.

Como es observado en la **figura 17A**, en colon normal y adenoma SALL2 se expresa en el estroma tisular. En este contexto, es necesario recordar la existencia del microambiente tumoral, en donde existen diferentes células como macrófagos, fibroblastos y/o linfocitos que rodean la cripta. En donde el secretoma del microambiente tumoral es de vital importancia para la correcta diferenciación y mantenimiento controlado de la proliferación de la cripta de Lieberkühn (Barker et al., 2013; H. C. Clevers & Bevins, 2013; Gjorevski & Ordóñez-Morán, 2017)

Con el objetivo de determinar qué tipo (s) de célula(s) del estroma expresa(n) SALL2 se realizó inmunofluorescencia multiplex. Se generaron dos paneles de tinción de 4 marcas. En el primero se utilizaron anticuerpos para marcar a SALL2, vimentina (marcador de fibroblastos) y citoqueratina (marcador de células epiteliales o enterocitos). En el segundo panel se utilizaron anticuerpos para marcar SALL2, CD8 (marcador de linfocitos citotóxicos) y CD68 (marcador de macrófagos), además de tinción nuclear con DAPI en ambos paneles. De esta forma se cuantificó la localización de SALL2 en el estroma del tejido normal y canceroso, observando el porcentaje de células que presentan tinción dual, para SALL2 y algunos de los marcadores mencionados.

Análisis de la IHQ multiplex utilizando el software Qupath indica que en tejido normal existe un porcentaje de 40,3% de células citoqueratina-SALL2 positivo en comparación con el 7,5% con el tejido de cáncer, por lo tanto, confirmamos que SALL2 estaría localizado en células epiteliales. Esta misma tendencia se mantuvo en los fibroblastos, que corresponden a células vimentina-SALL2 positivo, encontrando que en el tejido normal existe un 21,8% de células SALL2-vimentina positivo y en cáncer sólo un 1% (**Figura 17A-B**). Por lo tanto, en tejido normal las células positivas a SALL2 corresponden a enterocitos y fibroblastos.

Respecto a los marcadores de infiltrado inflamatorios, la localización de SALL2 en células CD8 positivas (linfocitos citotóxicos) fue baja (menor al 10%) en ambos tejidos. Para el tejido normal fue de un 2,9% y para el tejido de cáncer fue de 9,5% de positividad, lo que indica que SALL2 prácticamente no es expresado por células tipo linfocitos citotóxicos.

Por otro lado, respecto a las células CD68 que nos indican marcador de macrófagos, se muestra que en cáncer fue significativamente mayor, en comparación con el tejido normal. En el tejido normal se obtuvo una positividad SALL2-CD68 de 7,5% versus en cáncer con 65,7%. En resumen, se tiene que en el estroma del tejido normal la célula que

mayormente expresa SALL2 corresponderían a fibroblastos y la célula estromal en la que mayormente se expresa en el cáncer correspondería a macrófagos (**Figura 17C-D**).

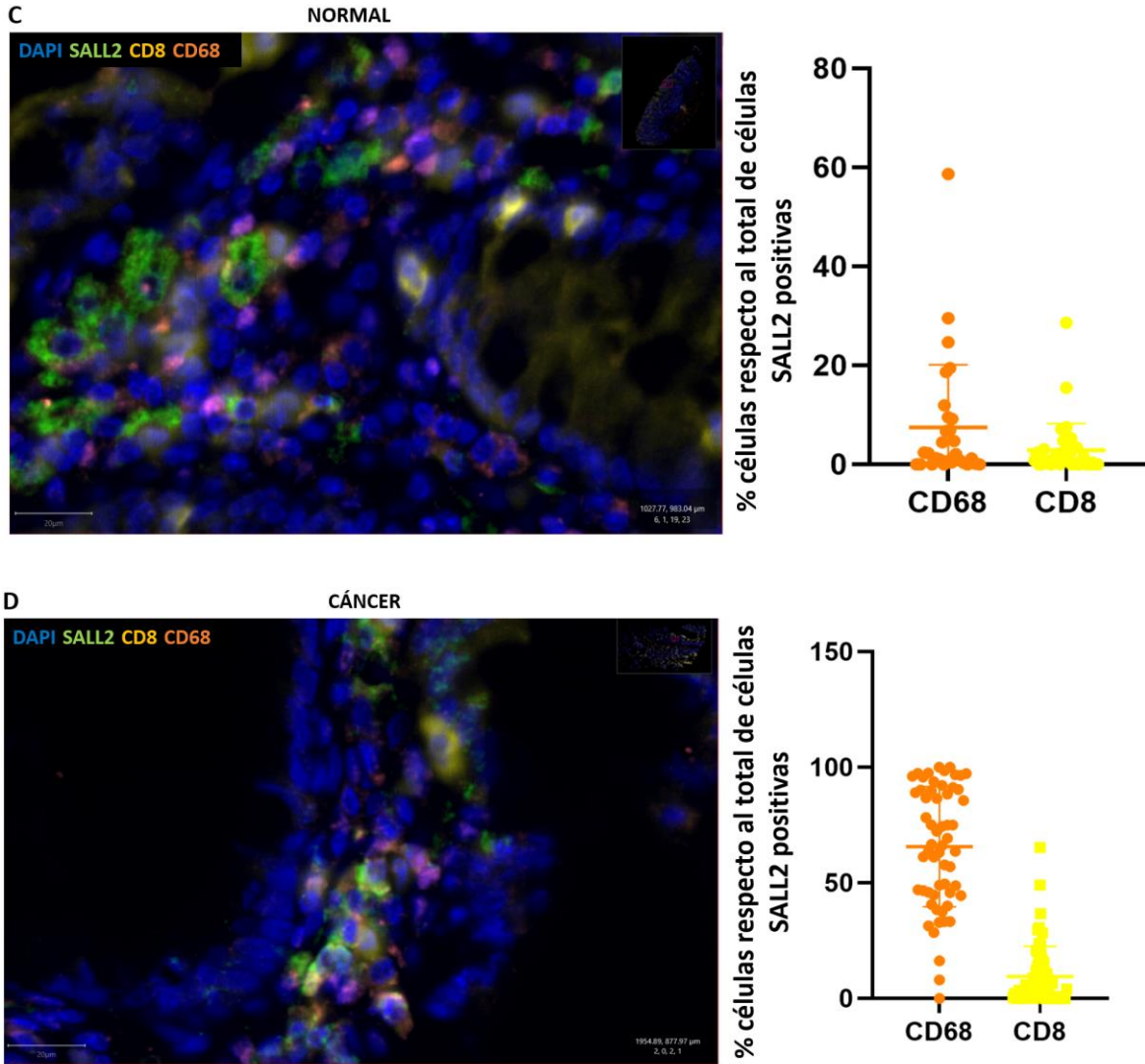


Figura 17: Localización de SALL2 en el estroma del tejido de colon normal y el microambiente tumoral de tejidos de CCR. Análisis de inmunofluorescencia multiplex **A)** corresponde a panel 1 en tejido normal **B)** corresponde a panel 1 en adenocarcinoma **C)** corresponde a panel 2, en tejido normal y **D)** corresponde a panel 2 en adenocarcinoma Panel 1: SALL2 (verde), fibroblastos (vimentina en rojo) y epitelio (citoqueratina en magenta). Panel 2: SALL2 (verde), linfocitos CD8+ citotóxicos (amarillo) y macrófagos CD68+ (naranja). **Al lado de cada imagen,** se muestra la cuantificación utilizando segmentación automática por color “threshold” en software de acceso gratuito QuPath. Los ROI (Región de Interés) se seleccionaron de forma manual, diferenciando entre zonas

normal y de cáncer. Se grafica el porcentaje (%) de células positivas para SALL2 y para los marcadores analizados. Cada punto graficado corresponde a un ROI.

7.1.5- Expresión de SALL2 en líneas celulares de colon normal y cáncer.

Con el objetivo de realizar estudios funcionales asociados a la modulación de SALL2 en CCR se evaluó la expresión de SALL2 en varias líneas celulares de CCR incluyendo una línea no cancerosa de epitelio de colon, CCD-841-CoN, como contexto no patológico. Además, se realizó western blot e inmunohistoquímica (IHQ) de SALL2 en líneas celulares de cáncer de colon (HCT116, DLD-1, HT-29, SW620 y SW48) y de epitelio normal (CCD 841CoN). En la **tabla 9** se indican las mutaciones más frecuentes para cada línea celular trabajada.

Tabla 9: Genética de líneas celulares usadas.

Línea celular	APC	β -catenina	Alteración genómica	RAS	Referencias
HCT116	Silvestre	Mutado	MSI	Mutado	(Ahmed et al., 2013; Berg et al., 2017)
DLD-1	Mutado	Silvestre	MSI	Mutado	
HT-29	Mutado	Silvestre	MSS	Silvestre	
SW620	Mutado	Silvestre	MSS	Mutado	
SW480	Mutado	Silvestre	MSS	Mutado	
SW48	Silvestre	Mutado	MSI	Silvestre	

El análisis de western blot indica que SALL2 se expresa en la línea celular no cancerosa de epitelio de colon, CCD-841-CoN y no es detectado en la mayoría de las líneas de cáncer analizadas, con excepción de las células SW480 donde se detecta una banda del tamaño esperado (aprox. 130kDa), de menor intensidad respecto a la de CCD-841-CoN (**Figura 18A**).

Para realizar la IHQ, se cultivaron todas las líneas celulares anteriormente mencionadas incluyendo modelos de pérdida de función de SALL2 (ver sección Mat & Metodos), CCD-841-CoN *SALL2*^{-/-} y SW480 *SALL2*^{-/-}. Luego se obtuvieron pellets celulares, los cuales fueron procesados histológicamente para generar un “*cell microarray*” como herramienta para la IHQ. Análisis de IHQ muestran resultados similares a lo observado en western blot, sin embargo, la sensibilidad de la IHQ no permite detectar SALL2 en las células SW480 *SALL2*^{+/+} (**Figura 18B**). Finalmente, se realizó análisis *in silico* de expresión de ARNm de SALL2 mediante Depmap (<https://depmap.org/portal/>), que utiliza datos de ARN-seq desde líneas celulares en la base de datos disponibles. En este

contexto, se observó que la línea SW480 es la que mayores niveles de expresión de SALL2 presenta en contexto de cáncer y le sigue la línea celular SW48 (**Figura 18C**), siendo niveles no detectables a nivel de proteína, lo que concuerda con los resultados de la figura 18A.

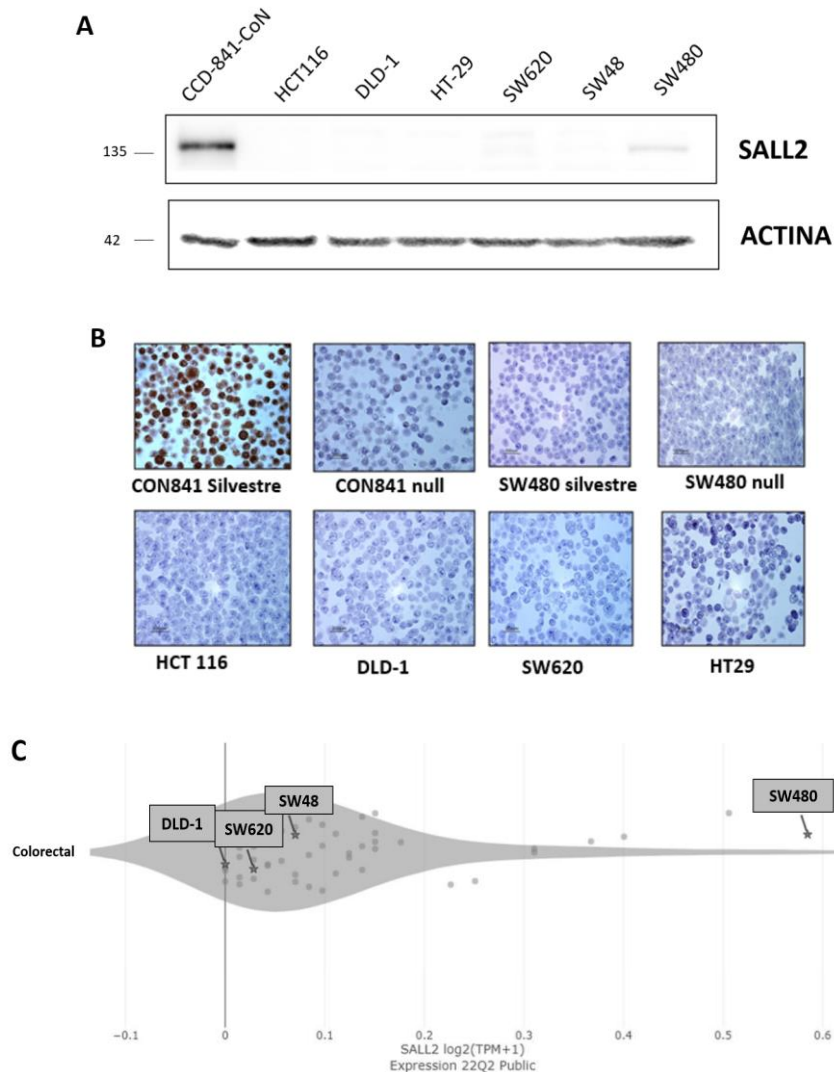


Figura 18: Pérdida de la expresión de SALL2 en líneas celulares de CCR. A) Inmunoblot de la expresión de SALL2 en la línea celular normal CCD-841-CoN y líneas celulares de cáncer de colon HCT116, DLD-1, HT29, SW620, SW48 y SW480. **B)** Inmunohistoquímica de SALL2 en las líneas celulares de colon utilizando pellets de citoagar. **C)** Análisis de expresión de SALL2 en líneas celulares utilizando base de datos depmap (fuente: <https://depmap.org/portal/>).

7.2.- OBJETIVO II: Definir la relación funcional entre SALL2 y la vía Wnt.

7.2.1.- Definir la relación entre SALL2 y Vía Wnt/ β -catenina.

Con el objetivo de determinar la relación entre SALL2 y la vía Wnt, se generó en el laboratorio un modelo SALL2 knockout desde células epiteliales de colon CCD-841-CoN (ver Sección Materiales y Métodos (Farkas et al., 2021). Con este fin, se usó electroporación del plásmido que expresa la nucleasa Cas9 y el ARN guía para SALL2 dirigido contra una región del exón 2 de SALL2, además de RFP que se usa como marcador de selección. Clones individuales aislados por “cell sorting” (RFP+), fueron crecidos en placas de 96 pocillos, y expandidos hasta su posterior análisis por Western blot. Los niveles proteicos de SALL2 se evaluaron en relación con las células CCD-841-CoN silvestres y se usó β -actina como control de carga. Se obtuvieron 7 posibles clones para estudios posteriores; 4 clones CRISPR SALL2 nulos o *SALL2*^{-/-} (clon 1, 2, 3 y 4) y 3 clones CRISPR Control o *SALL2*^{+/+} (clon 1, 2 y 3) (**Figura 19A**).

Estudios previos de nuestro laboratorio utilizando fibroblastos primarios de ratón aislados desde embriones *Sall2* silvestre (*Sall2*^{+/+}) and *Sall2* nulos (*Sall2*^{-/-}) han demostrado que SALL2 regula negativamente la proliferación celular (Hermosilla et al., 2018). Con el fin de corroborar que la pérdida de función de SALL2 afecta la proliferación de células CCD-841-CoN humanas se sembró igual número de células CRISPR control (*SALL2*^{+/+}) y CRISPR SALL2 (*SALL2*^{-/-}), y se realizó conteo celular en paralelo por diferentes días. Se observó que las células *SALL2*^{-/-} proliferan más rápido que las controles, *SALL2*^{+/+}. De esta manera, se confirma que en células de colon normal se mantiene la ventaja proliferativa respecto a las células deficientes de SALL2 (**Figura 19B**).

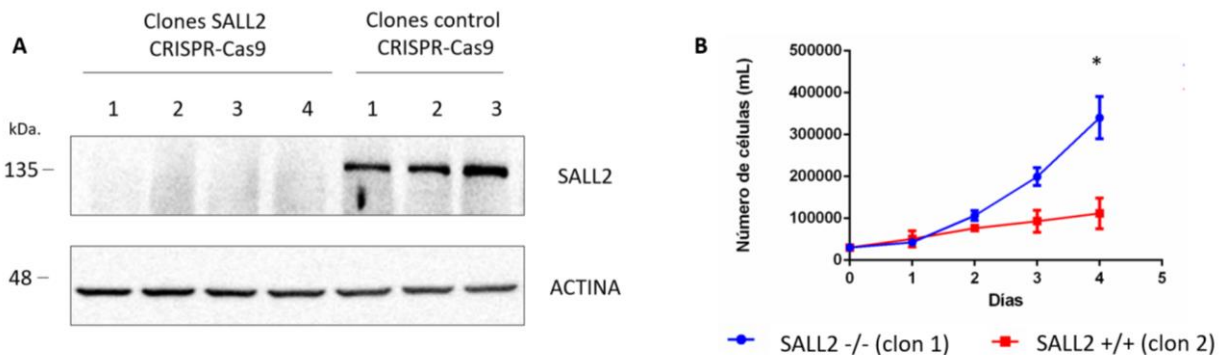


Figura 19. Modelo generado de pérdida de función de SALL2 **A)** Western blot desde clones CRISPR SALL2 y CRISPR Control en células CCD-841-CoN (N=3). **B)** Ensayo de

proliferación en el modelo generado, las células con pérdida de SALL2, poseen una ventaja proliferativa, respecto a las *SALL2*^{+/+} (N=3; *P*<0,05).

Acorde a los resultados obtenidos en el objetivo 1 en los estudios en tejidos humanos, existiría una relación negativa entre SALL2 y β -catenina nuclear. Observando que en los tejidos de cáncer negativos para SALL2, β -catenina se encontraba con localización nuclear en el frente migratorio. Con el fin de entender la dependencia de SALL2 en la expresión de β -catenina nuclear utilizamos modelos celulares con pérdida y ganancia de función de SALL2. Para ello, se realizó un fraccionamiento subcelular, obteniendo proteínas citoplasmáticas y nucleares desde células CCD-841-CoN, como contexto normal de colon y SW480 ó HT29, como modelos de cáncer de colon. Los resultados del inmunoblot indicaron que las células con pérdida de función (*SALL2*^{-/-}) mostraron niveles más altos de β -catenina nuclear en comparación con los modelos CRISPR-Cas9 control (*SALL2*^{+/+}) tanto en células CCD-841-CoN como SW480, ver **figura 20A-B**. Mientras que la ganancia de función en modelos SALL2 E1A doxiciclina inducibles, se encontró reversión en el fenotipo, en donde la inducción de SALL2 E1A disminuyó los niveles nucleares de β -catenina en células HT-29 SALL2 E1A (**Ver figura 20C**).

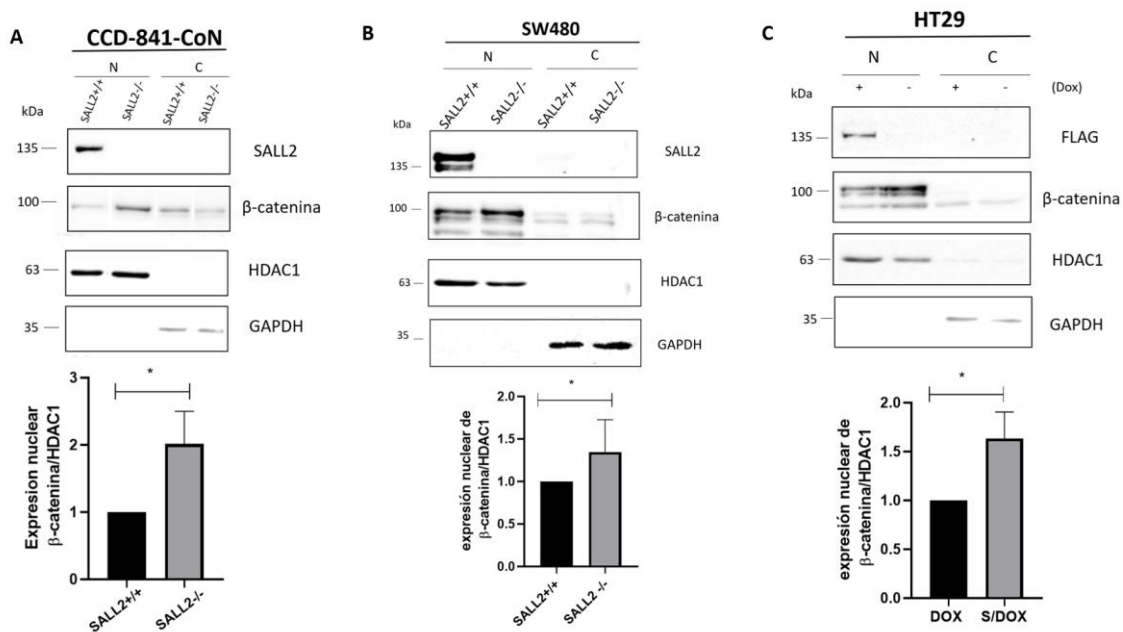


Figura 20: La pérdida de función de SALL2, incrementa los niveles de β -catenina nuclear. Fraccionamiento subcelular de células CCD-841-CoN (A), SW480 (B) y HT-29 (C). Como control de carga nuclear se utilizó HDAC1 y citoplasmático GAPDH. Resultado

representativo de 3 réplicas independientes, el análisis densitométrico se representa en los gráficos inferiores a cada inmunoblot ($*=p<0,05$).

Por otra parte, datos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce a β -catenina endógena mostró que la pérdida de expresión de SALL2 aumentaba la acumulación nuclear de β -catenina en las células SW480. Es decir, en el modelo de pérdida función (*SALL2*^{-/-}) se confirma la relación negativa entre SALL2 y β -catenina nuclear (**Figura 21A**). Como era esperado, en el modelo isogénico de ganancia de función usando células SW480 (KO) SALL2 E1A inducibles, muestra la reversión del fenotipo, observando menores niveles de β -catenina nuclear en células tratadas con doxiciclina (**Figura 21C**) Estos datos fueron replicados en el otro modelo de ganancia de función, HT-29 SALL2 E1A inducibles (**Figura 21E**). Finalmente, para confirmar los datos observados en estos ensayos, se realizó un análisis de z-stack observando que, de la sumatoria de todos los planos obtenidos, las células *SALL2*^{-/-} presentaban mayores niveles de β -catenina nuclear, en comparación con las células *SALL2*^{+/+} (**Figura 21G, anexo 5**). Estos datos sugieren que la expresión de SALL2 atenúa la acumulación nuclear de β -catenina, lo que ayudaría entonces a disminuir la actividad transcripcional de la vía Wnt/ β -catenina.

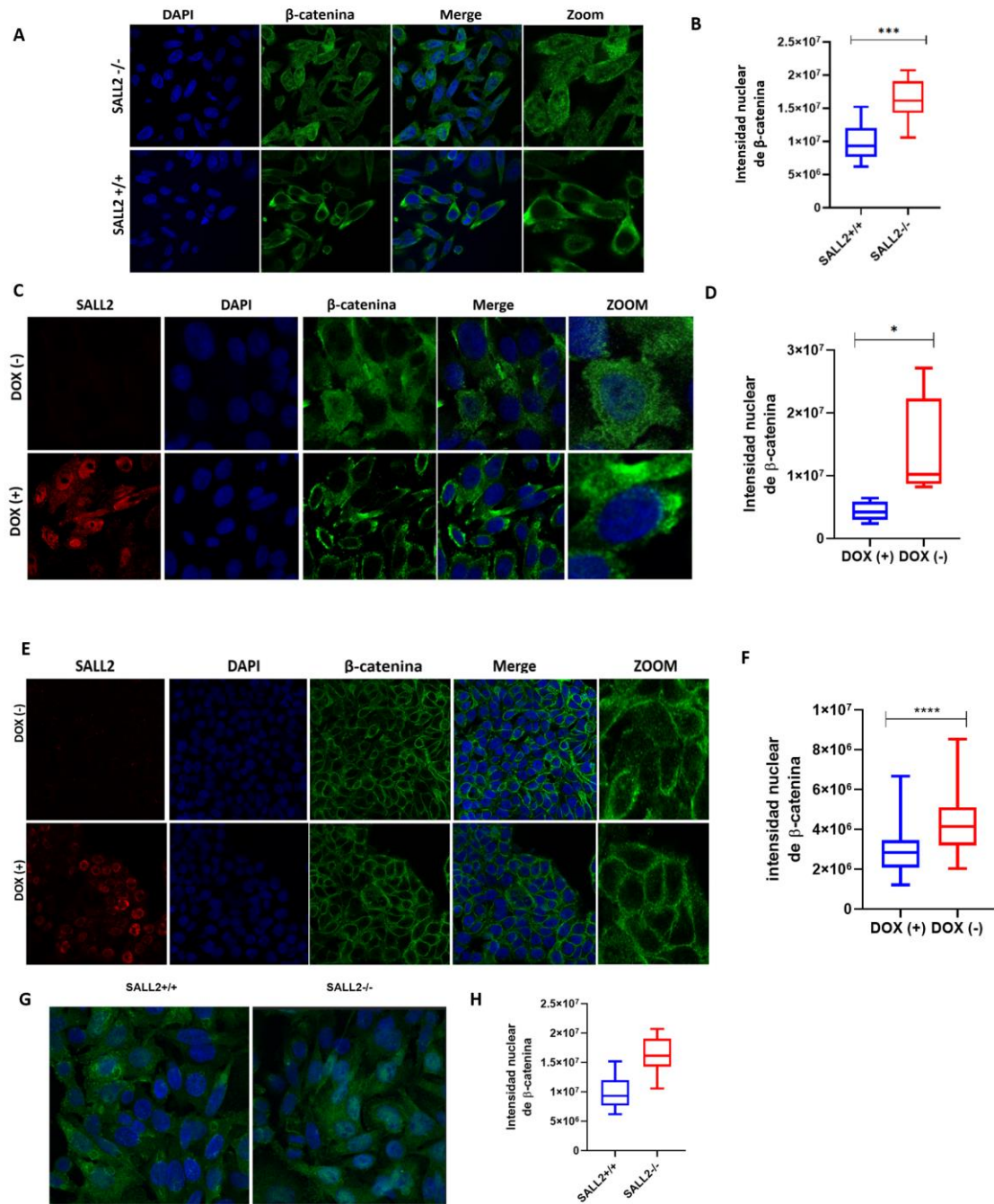


Figura 21: La pérdida de función de SALL2, incrementa los niveles de β -catenina nuclear y la ganancia de función, revierte el fenotipo. Inmunofluorescencia de β -catenina endógena (verde) en células de colon normal y CCR. SALL2 en rojo, se utilizó el anticuerpo FLAG para ser reconocido en los modelos de células inducibles SALL2-E1A-FLAG Doxiciclina (DOX). Inmunofluorescencia representativa a 63X y gráfico de la

cuantificación nuclear de β -catenina en Fiji, indicando la intensidad de tinción de β -catenina en células SW480 *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-} evaluando un mínimo de 100 células por experimento (N=3) **(A-B)**, en células SW480 *SALL2* E1A inducibles (N=3) **(C-D)** y células HT-29 *SALL2* E1A inducibles (N=2) **(E-F)**. En **G** se muestra una imagen digital que representa la sumatoria de todos los planos analizados con z-stack en el microscopio confocal LMS780 (N=1), en **H** su cuantificación evaluando un total de 73 células. Ver **Anexo 5**, enlace para visualizar video representativo de la sumatoria de todos los planos en la microscopía confocal en G.

Entendiendo que *SALL2* regula los niveles nucleares de β -catenina de manera negativa, se esperaría que exista un cambio en la expresión de los blancos de esta vía dependiente de *SALL2*. Para evaluar esta posibilidad, se realizó una búsqueda bioinformática de sitios de unión para *SALL2* en los promotores de genes candidatos que fueron previamente sugeridos desde el ChIP-seq en células HEK (**Figura 22A**, Farkas et al., 2021). Se utilizó la matriz de sitios de unión previamente publicada GGG(T/C)GGG (Gu et al., 2011), encontrando genes que significativamente clasificaban como posibles blancos de *SALL2* tales como *ARID1A*, *ARID1B*, *DAAM2*, *FBXW11*, *FBXW7*, *LEF1*, *AXIN2*, *WNT7B* y *WNT3A* (**Figura 22B**).

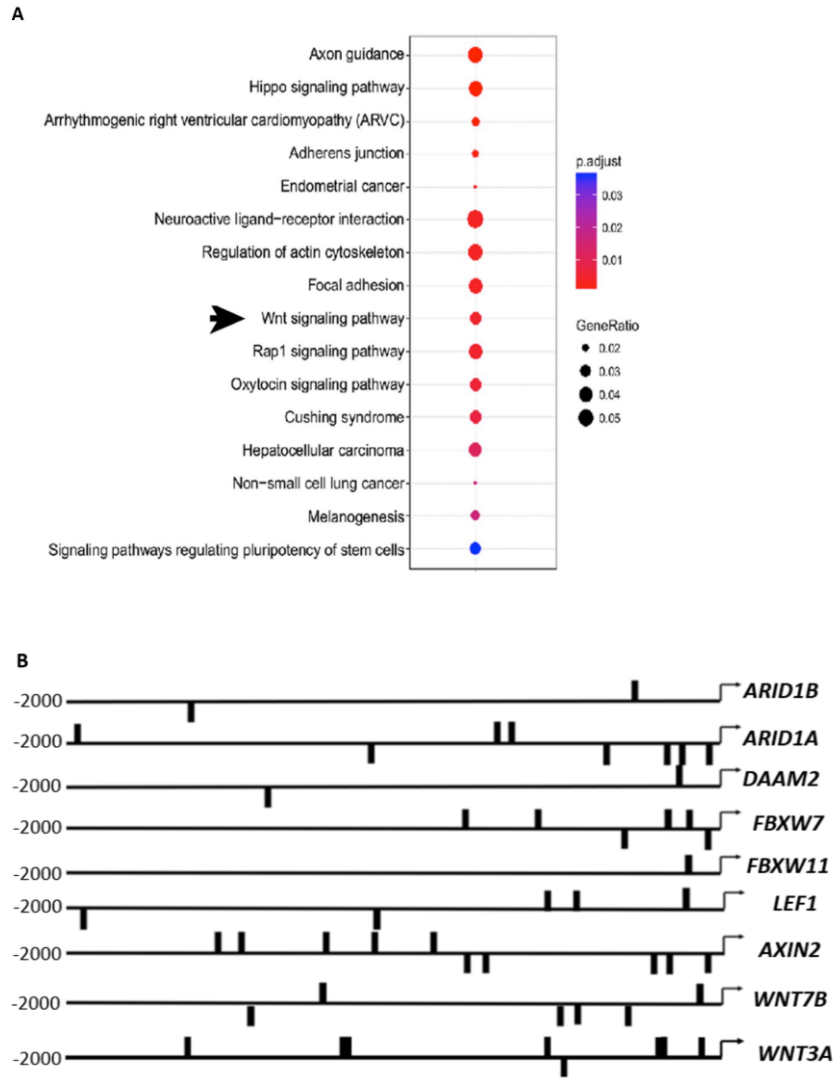


Figura 22: SALL2 regula genes asociados a la vía Wnt canónica. A) Análisis ontológico usando KEGG Pathway análisis (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) desde ChIP-Seq (Farkas et al., 2021), se muestra en rojo la significancia del análisis y el tamaño del círculo indica cuántos genes están involucrados en dicho grupo. Se destacó en rojo un grupo de genes que son incluidos en la categoría “Wnt signaling pathway”. **B)** Esquema representativo que muestra la región -2000 bp de promotores de posibles blancos transcripcionales (basados en A) y la posición relativa de los sitios de unión a SALL2 tipo GGG(T/C)GGG (rectángulos). La flecha corresponde al sitio +1 o inicio de la transcripción. Se incluye a *ARID1A*, *ARID1B*, *DAAM2*, *FBXW11*, *FBXW7*, *LEF1*, *AXIN2*, *WNT7B* y *WNT3A*.

En primera instancia se evaluó, utilizando western blot, si existían cambios en los niveles de expresión de reguladores negativos (AXIN2, FBXW7, FBXW11 y ARID1A-B) y de reguladores positivos (SALL4, LEF1 y WNT3A) en células CCD-841-CoN. Se encontró una relación positiva entre células que expresan SALL2 y reguladores negativos como *AXIN2* y *FBXW11*. Por otra parte, se encontró una relación negativa entre la expresión de SALL2 y reguladores positivos como *SALL4* y *WNT3A* (**Figura 23**).

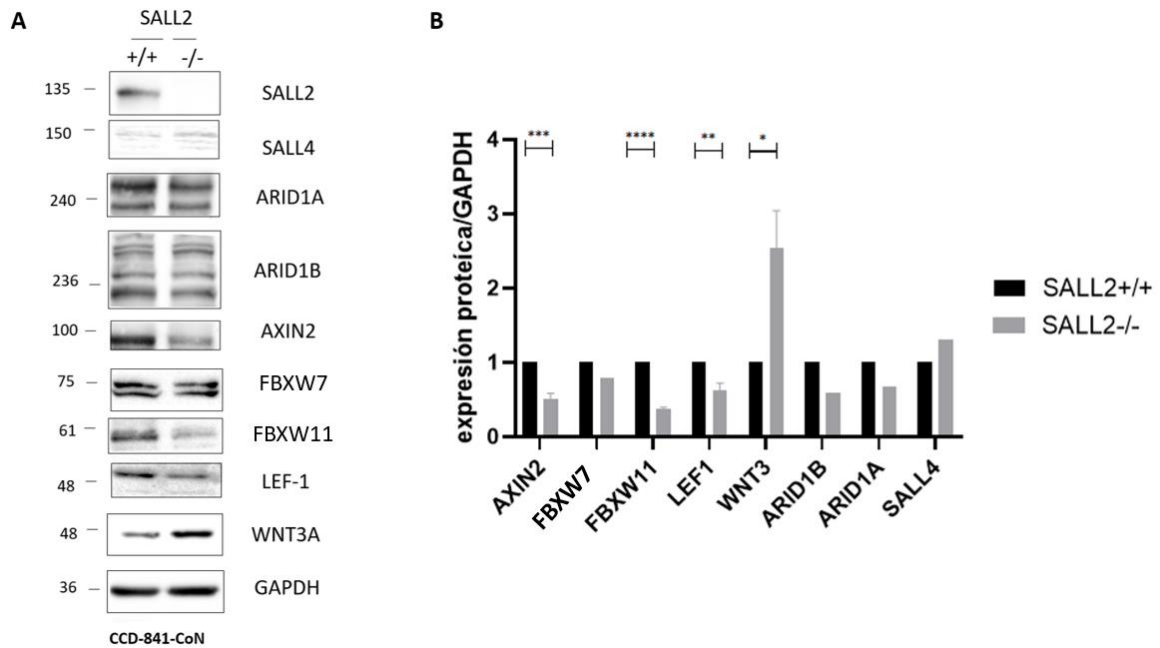


Figura 23: La pérdida de SALL2 disminuye la expresión de reguladores negativos y aumenta la expresión de reguladores positivos de la vía en células de epitelio de colon no tumorigénico. A) inmunoblot representativo de blancos de la vía Wnt en células CCD-841-CoN *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-}. **B)** densitometría en A, AXIN2, FBXW11, LEF1 y WNT3A (N=3).

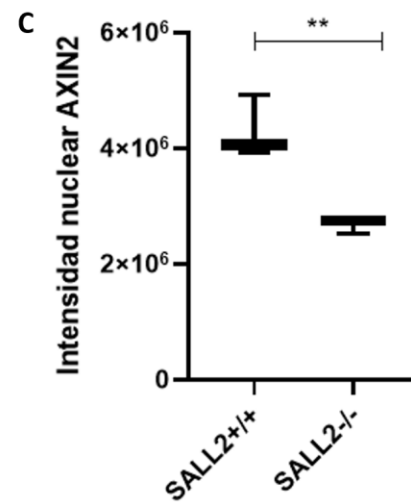
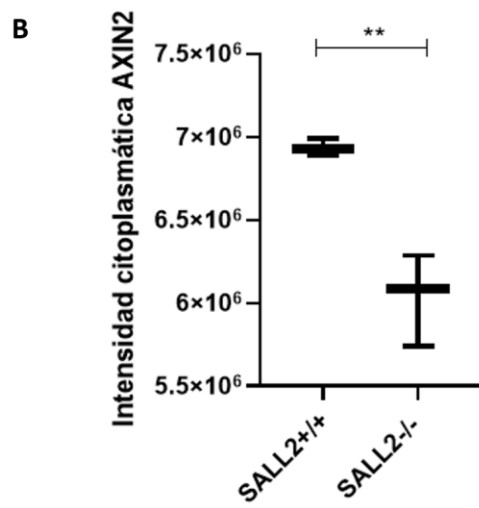
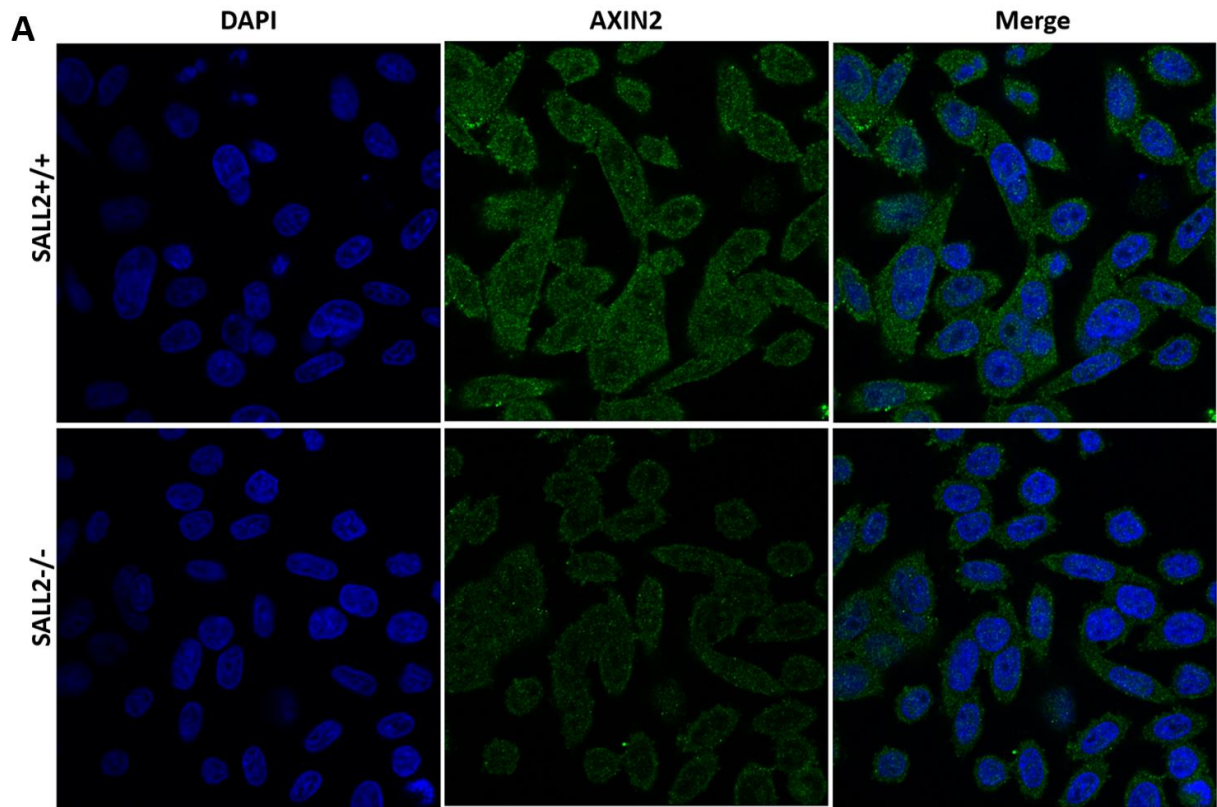
Concordando con los datos en células CCD-841-CoN, datos previos del laboratorio muestran que SALL2 se relaciona positivamente con los niveles de expresión de AXIN2, FBXW11-7 y ARID1B en células de CCR SW480 (Tesis de pregrado Bioingeniería, José Navarrete., 2022). De esta forma, se decidió evaluar la localización de estos tres reguladores negativos. Con el objetivo de determinar si existe un cambio en la localización subcelular de estos tres reguladores negativos dependiente de SALL2, se realizó inmunofluorescencia. AXIN2, esta cumple una función muy relevante en la fisiología de la

vía Wnt. En el citoplasma es la proteína limitante del degradosoma, permitiendo la unión de β -catenina con el complejo de destrucción (Thorvaldsen et al., 2017) (**Figura 4**). Por otra parte, a nivel nuclear ha sido caracterizada como proteína de anclaje para la represión de genes blancos de la vía, por lo que, respecto a su localización, esta proteína puede tener un patrón de inmunotinción nuclear y citoplasmático (Bernkopf et al., 2019, Rennoll, et al., 2014). AXIN2 presentó ambas localizaciones y que en ausencia de SALL2, existían menores niveles de AXIN2 tanto a nivel nuclear como citoplasmática (**Figura 24A**).

Adicionalmente, en los modelos de células CCD-841-CoN y SW480 se evaluó *FBXW11*, gen que codifica a la ubiquitina ligasa β -TrcP2 con la función de degradar a β -catenina. Por este motivo la localización de β -TrcP2 debe ser citoplasmática (Rim et al., 2022). El resultado de la inmunofluorescencia para β -TrcP2, mostró un patrón de inmunotinción citoplasmático, en donde se observó la misma tendencia de correlación positiva con SALL2 que en el resultado previo (**Figura 24B**).

Finalmente, ARID1B que posee una función de remodelador de la cromatina, permite alterar la estructura de los nucleosomas facilitando la represión génica de los blancos de la vía. Por este motivo, la localización de ARID1B al momento de ser evaluado debe ser de tipo nuclear (Vasileiou et al., 2015). Luego del análisis de intensidad de fluorescencia y segmentación nuclear, se encontró que efectivamente ARID1B mantenía una localización principalmente nuclear y que células deficientes de *SALL2* presentaban menor intensidad de fluorescencia nuclear (**Figura 24C**).

De este experimento se pudo confirmar la relación positiva entre SALL2 y los reguladores negativos como AXIN2, ARID1B y β -TrcP2 (*FBXW11*).



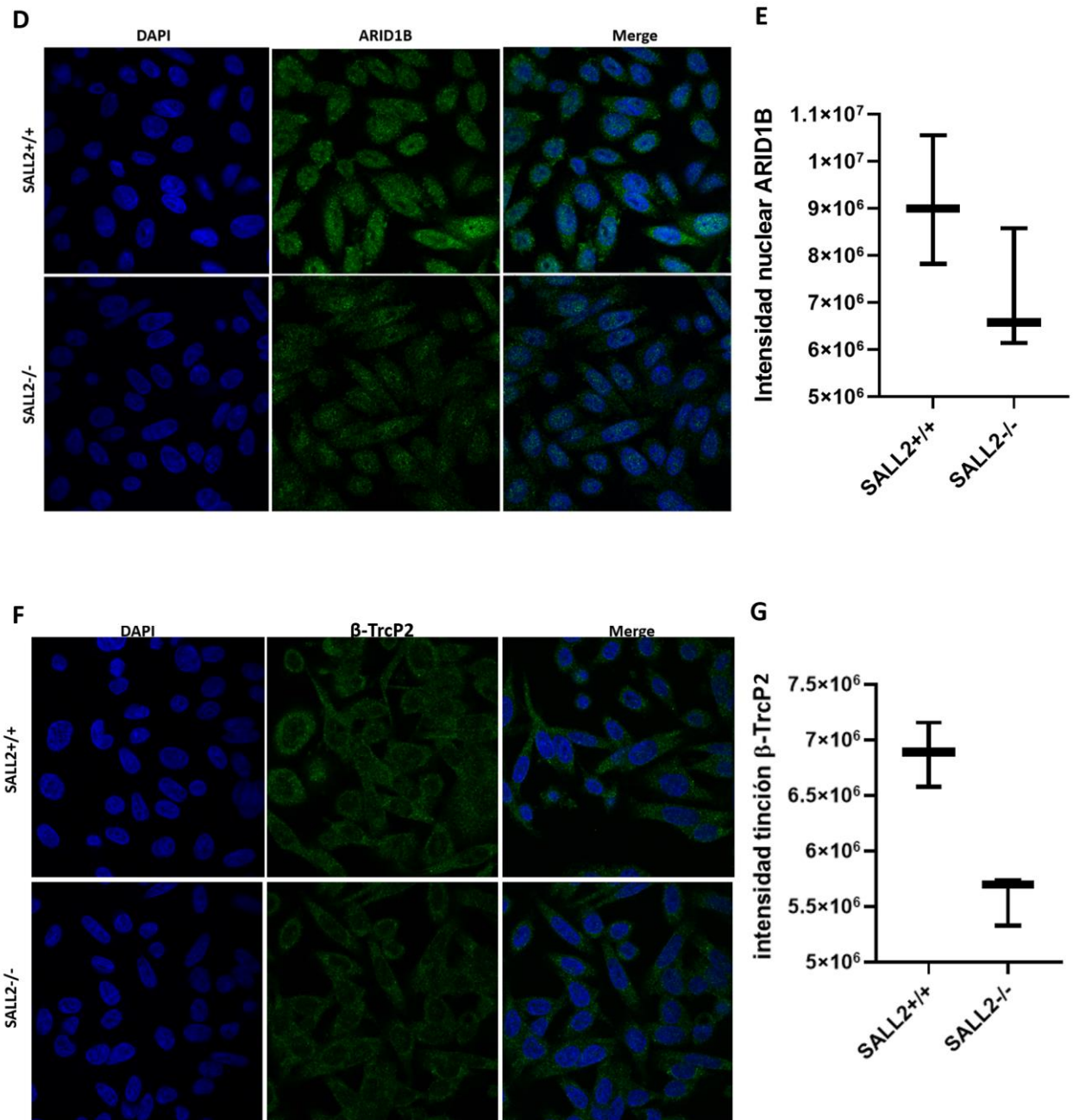


Figura 24: SALL2 correlaciona positivamente con reguladores negativos de la vía Wnt en células SW480. Inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal LMS780, aumento 63X. **(A)** AXIN2 endógena en verde y la cuantificación del ROI citoplasmático en **(B)** y nuclear **(C)** (N=3). **(D)** ARID1B endógeno y la cuantificación nuclear en **(E)**. **(F)** β-TrcP2 (*FBXW11*) endógeno y la cuantificación en **G**.

Estos resultados también fueron confirmados mediante qPCR en el modelo inducible de cáncer de colon HT-29, en donde es posible visualizar que en presencia de SALL2, inducida mediante doxiciclina, existe un incremento en los niveles de *AXIN2*, *FBXW11* y *ARID1B*, todos reguladores negativos de la vía Wnt canónica. Por otra parte, se mantuvo una relación negativa entre la expresión de *WNT3A* y la inducción de SALL2 E1A (**Figura 25**).

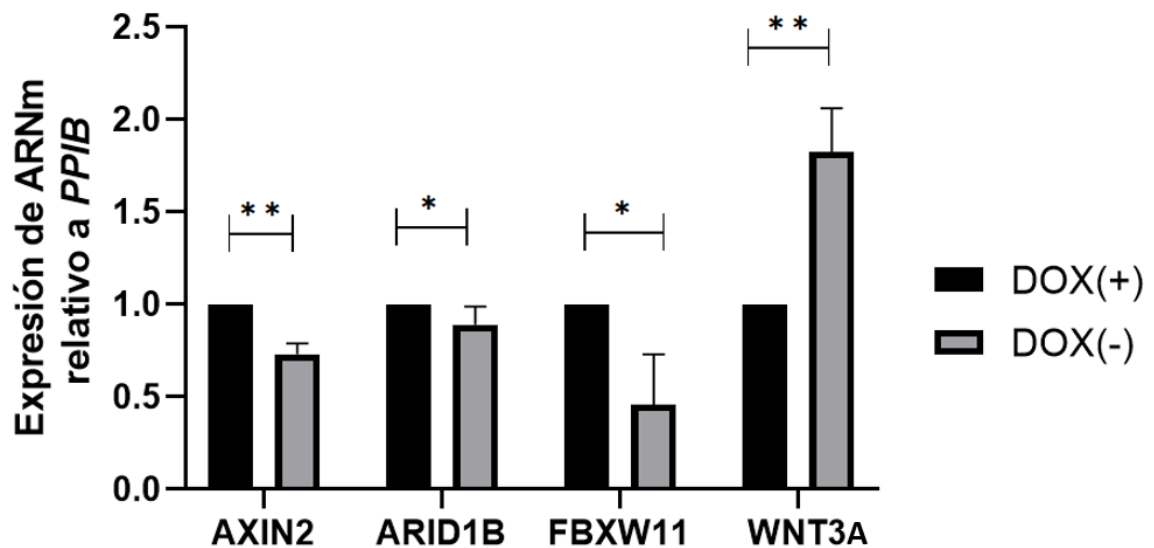


Figura 25: La inducción de SALL2 con doxiciclina correlaciona positivamente con reguladores negativos de la vía Wnt en células HT-29. PCR cuantitativa de células HT29 mostrando la expresión de *AXIN2*, *ARID1B*, *FBXW11* y *WNT3* en células con y sin tratamiento con doxiciclina (N=3) (*= $p < 0,05$, **= $P < 0,01$). Se usó como gen normalizador *PPIB*.

En resumen, los resultados indican que SALL2 correlaciona de manera positiva con reguladores negativos de la vía Wnt, *AXIN2*, *ARID1B* y *FBXW11* (β -TrcP2), tanto en contexto de células de colon normal (CCD-841-CoN) como en contexto cáncer (HT-29/SW480) (**Figura 26**).

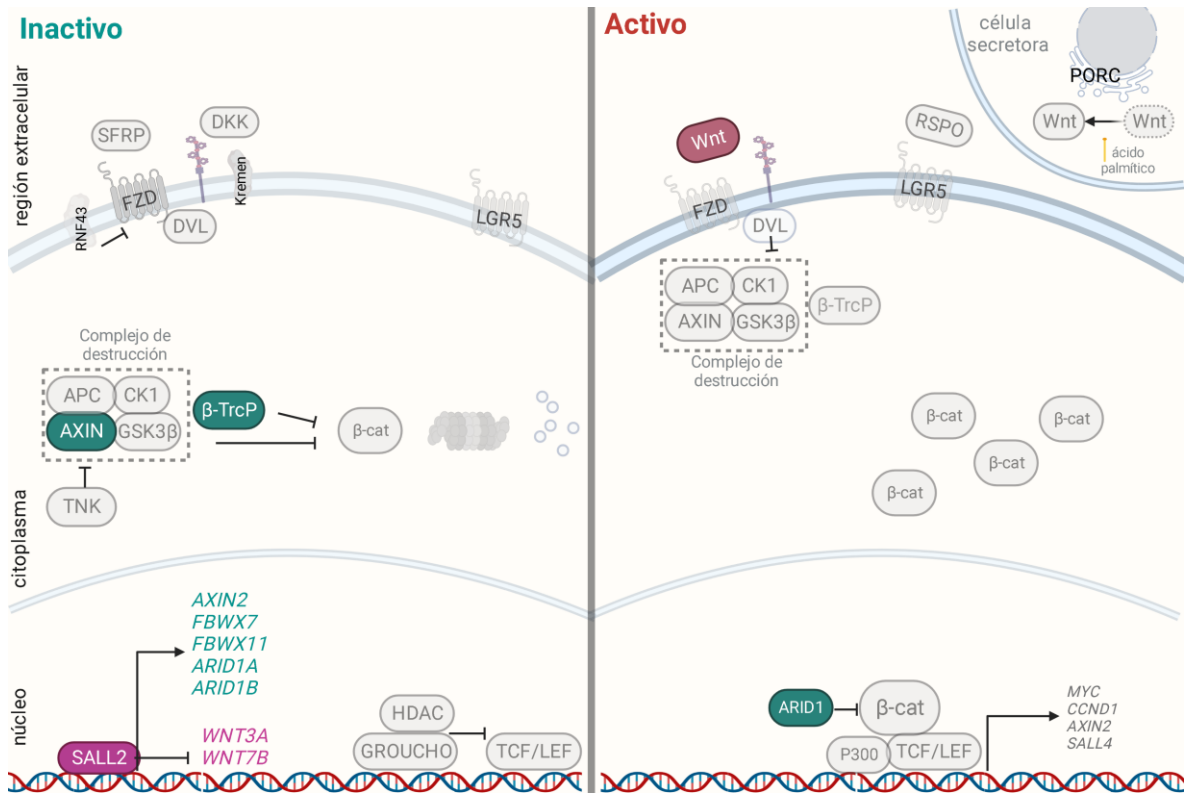


Figura 26: El déficit de SALL2, disminuye la expresión de reguladores negativos de la vía. SALL2 se relacionaría positivamente con la expresión de reguladores negativos de la vía, lo que explicaría los niveles aumentados de β-catenina nuclear en ausencia de SALL2. En el esquema se muestra la ubicación y rol de las proteínas que SALL2 podría regular de manera transcripcional. Estas proteínas cumplen roles en procesos activos e inactivos de la vía. Rojo: Reguladores positivos de la vía, por ejemplo, WNT3-7B Verde: Reguladores negativos de la vía, por ejemplo, ARID1A-B, (β-TrcP) FBXW7-11 y AXIN2. Fuente: Propia.

7.2.2.- Modulación de la expresión de SALL2 por la vía Wnt/ β -catenina.

Desde los resultados anteriores se sugiere que SALL2 regula los niveles nucleares de β -catenina, lo que explicaría los cambios en los niveles de los diferentes blancos de la vía Wnt canónica y que serían dependientes de SALL2. Considerando que SALL4, al igual que SALL2 regula los niveles de β -catenina nuclear en estado patológico (Chen et al., 2019), y a que se ha descrito una retroalimentación positiva entre SALL4 y la vía Wnt/ β -catenina que potenciaría su rol oncogénico, nos preguntamos si SALL2 puede también ser regulado por la vía Wnt a modo de *feedback* regulatorio.

Con el fin de caracterizar a SALL2 como un posible blanco de la vía Wnt se usaron inicialmente CHIR99021 o LiCl, fármacos ampliamente utilizados como activadores de la vía (H. J. Kim et al., 2018). CHIR99021 es una pequeña molécula que compite en el sitio de unión a ATP con GSK3- β inhibiendo su función y, por lo tanto, activa la vía Wnt β -catenina. Por otra parte, Cloruro de Litio (LiCl) inhibe a GSK3- β compitiendo por el sitio de unión del cofactor magnesio (Galli et al., 2013b).

Entonces, en primera instancia se estandarizó el tiempo y la concentración de los activadores en células CCD-841-CoN. Para ello, se utilizó por 4 y 6 horas utilizando concentraciones de Cloruro de Litio (LiCl) de 0, 2, 5, 10, 30 y 50mM utilizando como vehículo PBS a pH 7,4. Se observó que a las 4 horas de tratamiento existe un aumento de los niveles proteicos de β -catenina y AXIN2, evidenciado a partir de concentración 2mM LiCl, el cual aumenta a las 6 horas de tratamiento, confirmando así la activación de la vía Wnt. Por otro lado, se utilizó por 4 y 6 horas CHIR99021 a 0, 2, 5 y 8 μ M de, encontrando un aumento de los niveles de β -catenina y AXIN2 desde concentración 2 μ M. **(Ver figura 27).**

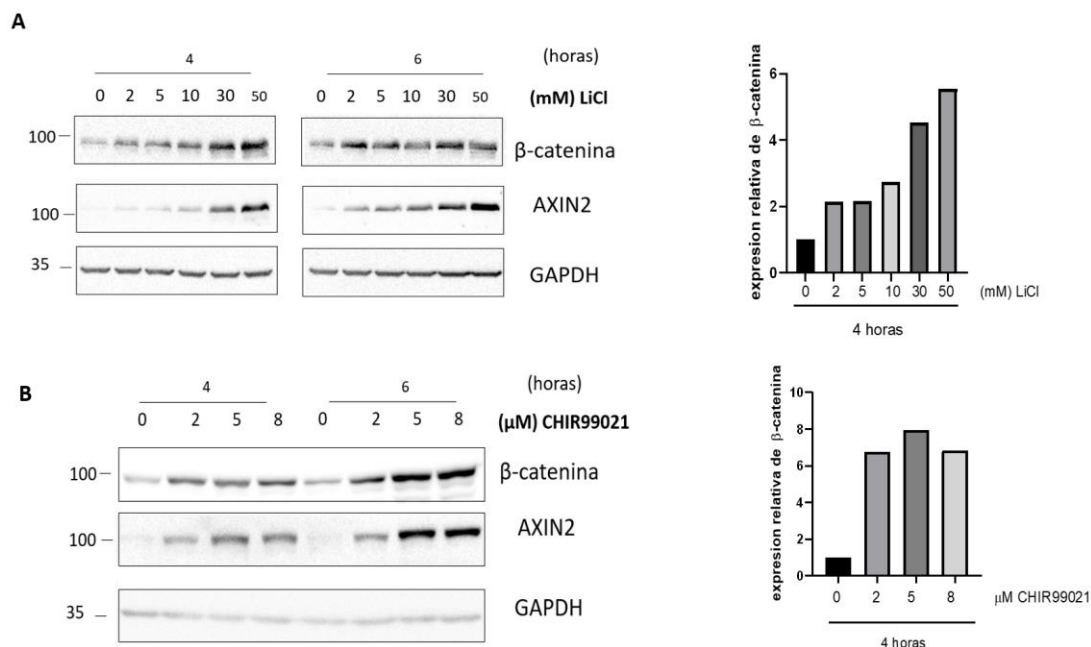


Figura 27: Estandarización de activadores de la vía Wnt canónica. Se utilizaron los inhibidores de GSK3 β , LiCl y CHIR99021 como agonistas de la vía Wnt. Como control de activación de la vía se usó AXIN2 y β -catenina. **A)** Tratamiento con LiCl desde stock 1 M en vehículo PBS 1X, densitometría a la derecha. **B)** Tratamiento con CHIR99021 en DMSO a partir de stock 10mM, densitometría a la derecha.

Posteriormente y a modo de confirmar los tiempos de activación de la vía, se utilizó la concentración de 5 μ M y se evaluó respuesta a diferentes tiempos (0, 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 horas). En esta oportunidad además de β -catenina y AXIN2 como controles positivos se evaluó la fosforilación en la serina 9 de GSK3- β , ya que representa una marca de GSK3- β inactiva. Esta inactivación de GSK3- β , se consigue con la inhibición de LiCl o CHIR99021 (Huang et al., 2017; Tapia-Rojas et al., 2015).

Se observó que los niveles de SALL2 también son modificados a lo largo del tiempo de tratamiento con CHIR99021. Específicamente se pudo observar un aumento de sus niveles luego de 1 hora de tratamiento con un pick de expresión a las 4 horas. A las 6 horas de tratamiento los niveles de SALL2 volvieron a su condición basal para luego volver a aumentar entre 24 y 48 horas de tratamiento (**Figura 28**). El aumento en los niveles de SALL2 a tiempos tempranos de tratamiento (4 horas) fue confirmado en células CCD-841-

CoN utilizando una concentración de 5 u 8µM de CHIR99021 (**Figura 29 A-B**) y en células SW480 utilizando 30mM de LiCl (**Figura 29 C**).

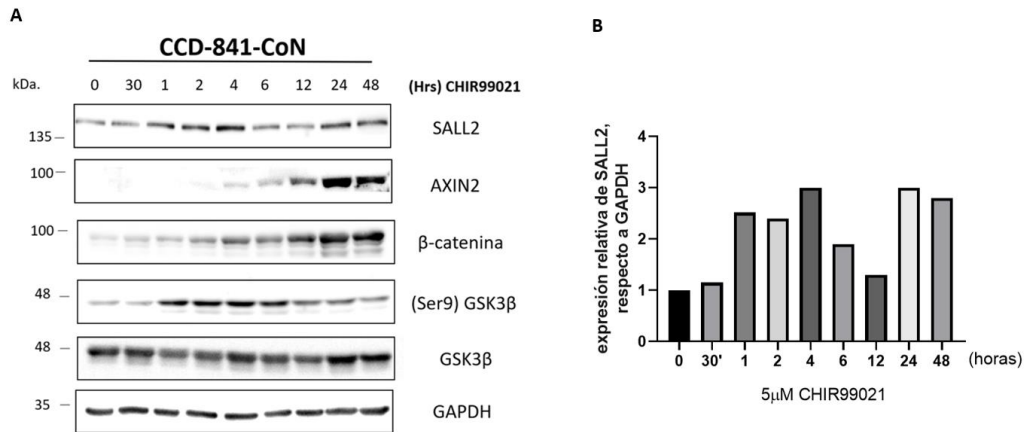


Figura 28: Los niveles proteicos de SALL2 son regulados por la activación de la vía Wnt en células CCD-841-CoN. A) Curva de tiempo utilizando 5uM CHIR99021. Se usó como control de la activación a AXIN2, β-catenina y (Ser9) GSK3-β (N=1). **B)** Análisis densitométrico.

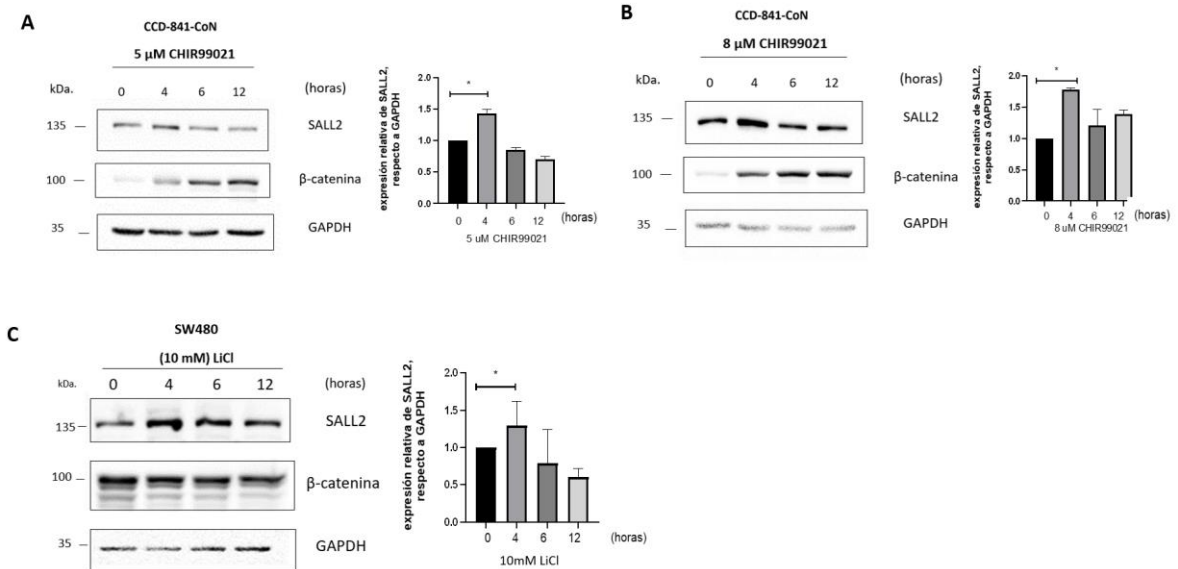


Figura 29: Los niveles proteicos de SALL2 son regulados por la activación de la vía Wnt en células de epitelio de colon normal, y en células SW480. A) Tratamiento de 5µM CHIR99021 por 0, 4, 6 y 12 horas CCD-841-CoN. Densitometría a la derecha (N=3). **B)** Tratamiento de 8µM CHIR99021 por 0, 4, 6 y 12 horas en células CCD-841-CoN.

Densitometría a la derecha (N=3). **C)** 30mM LiCl en PBS tratando por 0, 4, 6 y 12 horas células SW480. Densitometría a la derecha (N=3). (*= $P<0,05$).

Aludiendo a que SALL2 es un factor de transcripción, es muy relevante conocer su localización frente a algún cambio de expresión proteico. Entonces utilizando CHIR99021 y LiCl por 4 horas en células CCD-841-CoN se realizo fraccionamiento subcelular para determinar la localizacion subcelular de SALL2 en respuesta a activadores de la via Wnt. Se encontró que el aumento en los niveles de SALL2 es principalmente a nivel nuclear (figura 30).

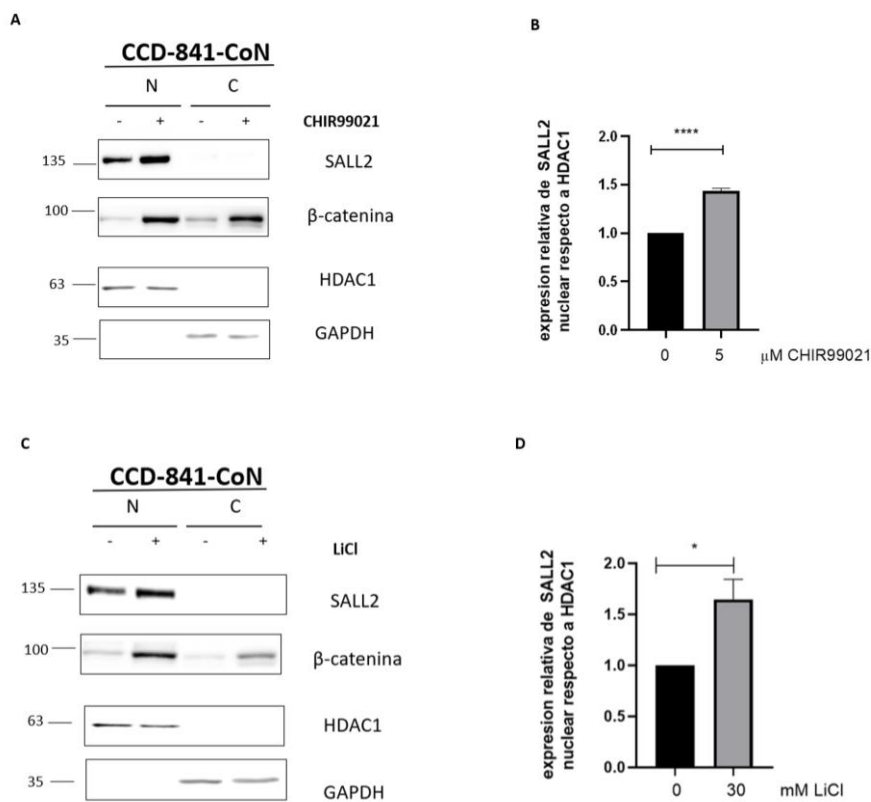


Figura 30: SALL2 incrementa sus niveles nucleares a las 4 horas de activación de la vía Wnt canónica. Fraccionamiento subcelular en células CCD-841-CoN utilizado como control de carga nuclear a HDAC1 y citoplasmático a GAPDH. **A)** Tratamiento con 5uM de CHIR99021 por 4 h (N=3). **B)** Histograma de la densitometría de SALL2 nuclear en A (****= $p<0,001$). **C)** Tratamiento con 30mM de LiCl por 4 h (N=3). **D)** Histograma de la densitometría de SALL2 nuclear en C (*= $p<0,05$).

Como se mencionó anteriormente, CHIR99021 y LiCl inhiben la vía Wnt al inhibir GSK3- β . Considerando estudios previos del laboratorio que identificaron sitios putativos de fosforilación por GSK3- β en la secuencia proteica de SALL2 (tesis doctorado Viviana Hermosilla, 2017), existe la posibilidad de que la inhibición GSK3- β , independiente de la vía Wnt, regule a SALL2. Por lo que queda la interrogante, si es que SALL2 es regulado por GSK3- β o por la vía Wnt en sí.

En este contexto evaluamos cambios en los niveles de SALL2 en respuesta a agonistas de la vía. Una aproximación experimental fue transfectar células CCD-841-CoN con un plásmido que codifica para WNT3A, un ligando de la vía Wnt. Este, al ser expresado, es secretado al medio y genera estimulación de la vía Wnt de manera autocrina. Como resultado de este experimento, se observó que los niveles de SALL2 son incrementados de igual forma por el ligando WNT3A (**Figura 31A**). Bajo el mismo contexto se utilizó medio condicionado proveniente de células L-WRN, que son fibroblastos de ratón que se caracterizan por secretar Wnt3, R-spondina y Noggin, 3 agonistas de la vía Wnt (Vandussen et al., 2019). Células CCD-841-CoN fueron tratadas con medio condicionado L-WRN por 0, 2, 4 y 24 horas para luego evaluar por western blot los niveles de SALL2 y marcadores de activación de la vía. Se encontró que, a las 2 y 4 horas de tratamiento, existe un incremento en los niveles de SALL2 confirmando que SALL2 estaría respondiendo a la activación de la vía (**Figura 31B**).

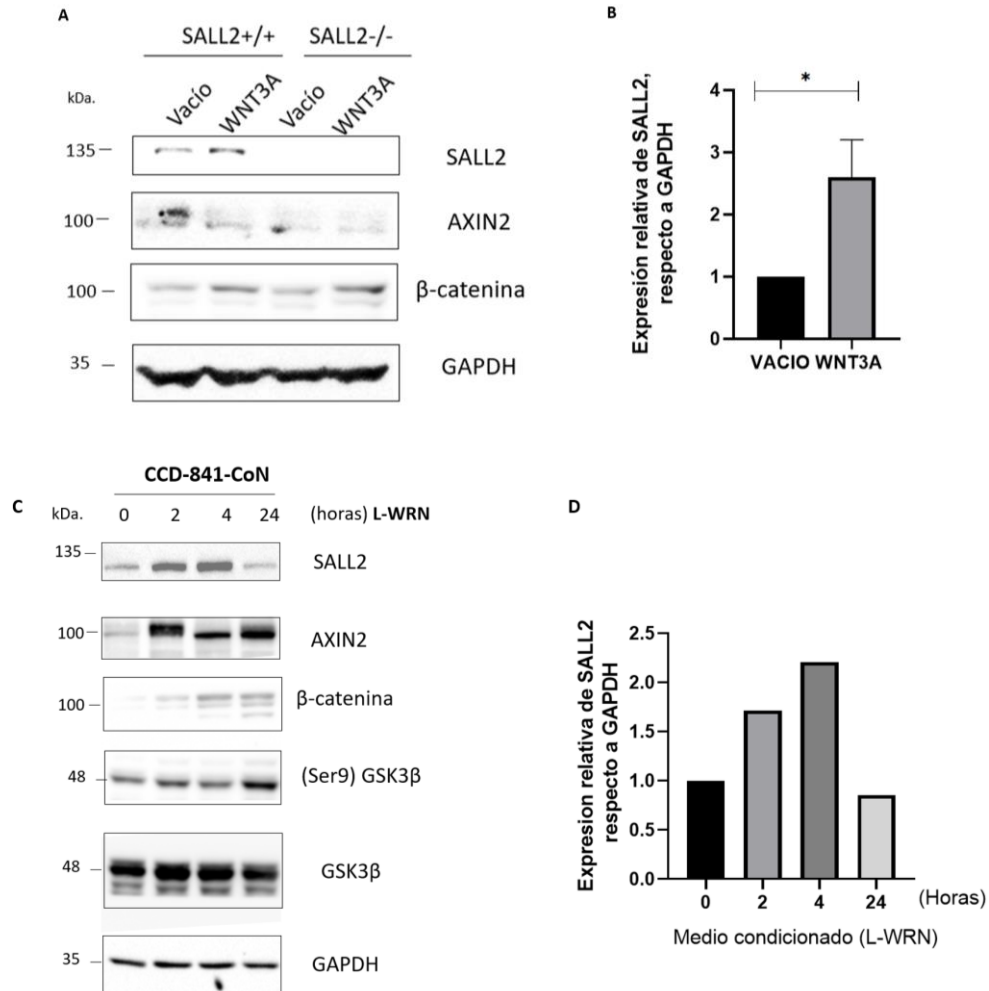


Figura 31: La activación por ligandos de la vía Wnt canónica aumenta los niveles proteicos de SALL2. **A)** Células CCD-841-CoN fueron transfectadas con el ligando WNT3A por 24 horas o en con el vector PCDNA3-vacío (N=3). **B)** Histograma de la densitometría de SALL2 en A, usando GAPDH como proteína normalizadora. **C)** Tratamiento con medio condicionado L-WRN (N=1). **D)** Densitometría de C usando GAPDH como proteína normalizadora.

Por otra parte, se confirmó la dependencia de la regulación de SALL2 por la vía Wnt en células SW480 utilizando 30mM de LiCl por 0, 4, 6 y 12 hrs. Por lo que la inducción de SALL2 dependiente de Wnt ocurriría tanto en contexto normal como canceroso (**Figura 32 A**).

Como las células de CCR suelen tener mutaciones en APC o β-catenina, los niveles basales de activación de la vía suelen ser elevados en comparación con células normales.

Por lo que una forma de estudiar la dependencia de la vía Wnt sobre blancos transcripcionales en este contexto, es utilizar inhibidores, como es el caso del XAV939. Células SW480 fueron incubadas con XAV939 8 μ M por 0, 4, 12 y 24 horas para luego evaluar por Western Blot cambios en los niveles de SALL2, y de proteínas controles incluyendo β -catenina, c-MYC, (Ser9)-GSK3 β y AXIN2. Como era esperado la vía se inhibió a las 24 horas de tratamiento, evidenciado por la disminución en los niveles de β -catenina, c-MYC y ser9-GSK3- β y el aumento de AXIN2. Respecto a SALL2, sus niveles se mantienen bajos entre las 4 y 12 horas de tratamiento para luego aumentar a las 24 horas **(Figura 32B)**.

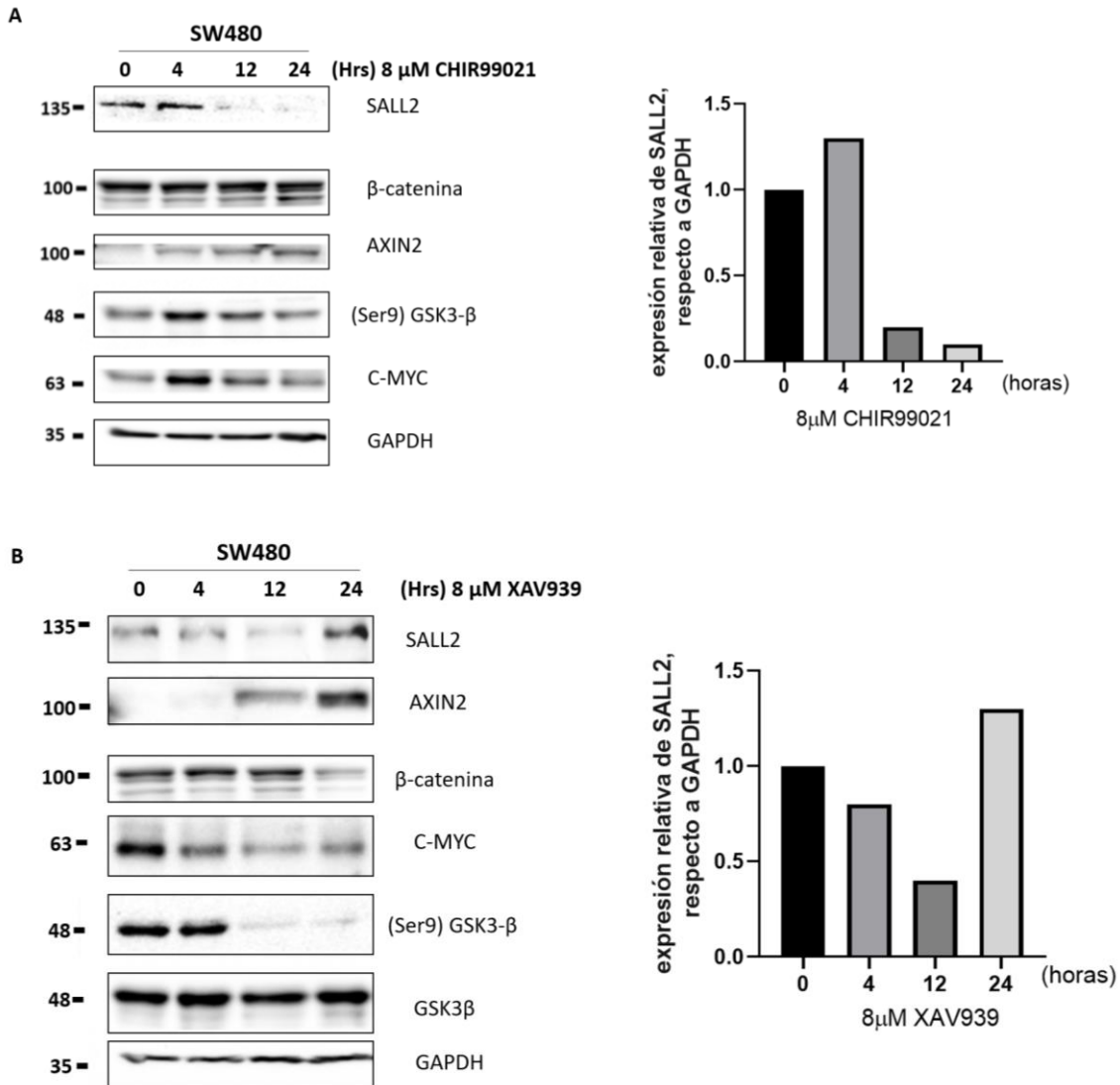


Figura 32: La expresión proteica de SALL2 es modulada por la vía Wnt en células SW480. A) Tratamiento con CHIR99021 por 0,12 y 24 h en células SW480 utilizando el clon silvestre G10, como control positivo de la activación se utilizó AXIN2, (ser9)GSK3- β y c-MYC. **B)** Tratamiento con XAV939 con 0, 4, 12 y 24 h. Como control positivo de la inhibición se usó AXIN2, (ser9) GSK3- β y c-MYC.

En resumen, estos resultados indican que SALL2 aumenta sus niveles en respuesta a la activación de la vía Wnt a tiempos tempranos (4 horas) y en respuesta a inhibición de la vía a tiempos tardíos (24 horas) (**Figura 33**).

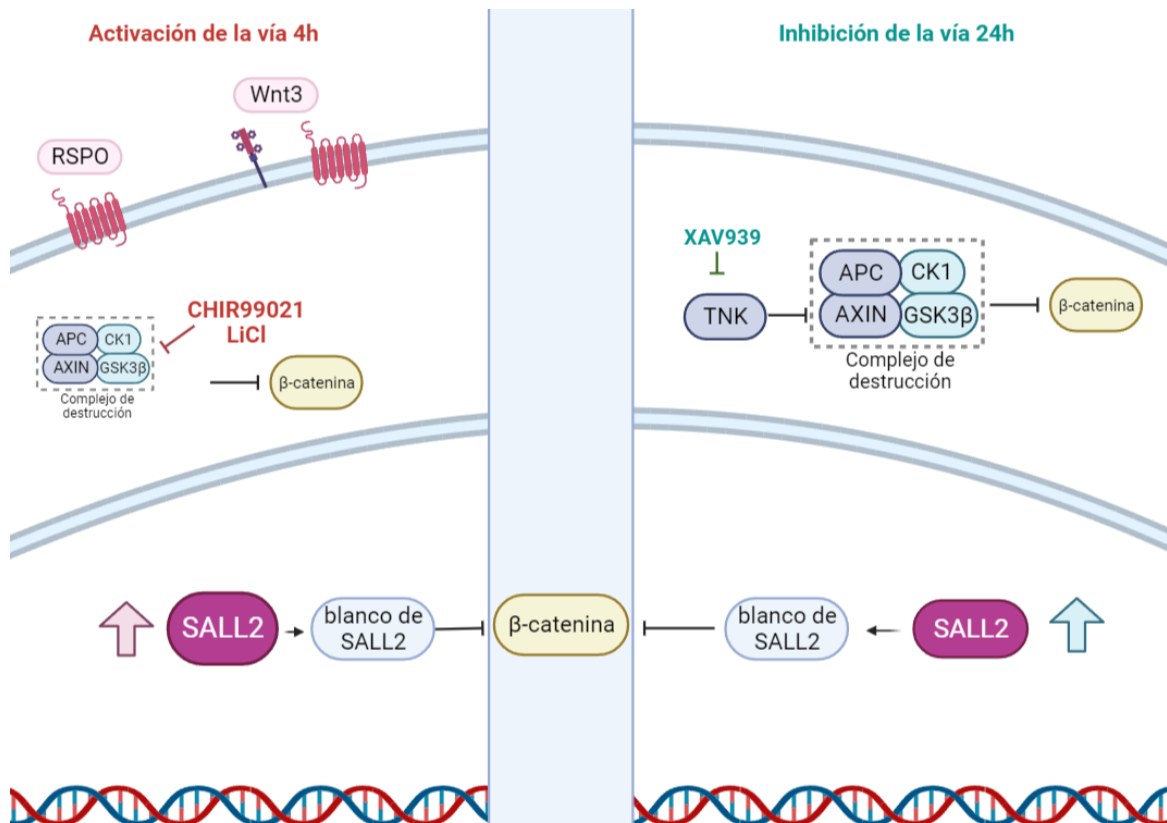


Figura 33: La expresión proteica de SALL2 es modulada por la vía Wnt.

Izquierda: Cuando se activa la vía Wnt a tiempos tempranos (4h), los niveles de expresión proteica de SALL2 aumentan, lo que podría inducir genes que van disminuyendo los niveles de β-catenina nuclear. **Derecha:** Con la inhibición de la vía (24 hr), los niveles de SALL2 incrementan, induciendo la expresión de genes que puedan inhibir la vía Wnt.

7.3.- OBJETIVO III: Definir blancos transcripcionales de SALL2 con impacto en la vía Wnt/ β -catenina.

7.3.1.- AXIN2, un nuevo blanco transcripcional de SALL2.

En base a los resultados del objetivo anterior, fue posible observar una relación positiva entre SALL2 y reguladores negativos de la vía, como por ejemplo *FBXW11*, *ARID1B* o *AXIN2*. Estos tres genes en sus promotores presentan sitios de unión para SALL2 (GGG(C/T)GGG), sin embargo, focalizamos el estudio específicamente en *AXIN2*, ya que análisis de expresión diferencial utilizando la base de datos Timer 2.0 indica que en muestras donde SALL2 se encuentra mutado (**ver anexo 1 y 2**) el nivel de ARNm de *AXIN2* disminuye significativamente en contexto de CCR, no así en el caso de genes *FBXW11* o *ARID1B* (**Figura 34**). Por este motivo el estudio se centró en el eje SALL2-*AXIN2*, además de considerar la importancia biológica de *AXIN2* respecto a la vía Wnt. *AXIN2*, es clásicamente conocido como un regulador negativo de la vía Wnt canónica. Además, se ha publicado que *AXIN2* y no *AXIN1* es la proteína limitante que permite la degradación de β -catenina en el degradosoma (Wang et al., 2021a). Es decir, la concentración de *AXIN2* es conocida como uno de los factores limitantes para el ensamblaje del complejo de destrucción. Incluso, la sobreexpresión de *AXIN* en células de CCR puede rescatar la acumulación aberrante de β -catenina producto de mutaciones en *APC*. Por este motivo es que investigar las regulaciones río arriba de *AXIN2*, se vuelve un importante blanco de estudio (Stamos & Weis, 2013; Wang et al., 2016).

Respecto a la regulación de *AXIN2* por SALL2, datos previos de nuestro laboratorio indican que el tratamiento con CHIR99021 en células SW480 puede incrementar los niveles proteicos de *AXIN2*, de manera dependiente de SALL2 (Tesis de pregrado Bioingeniería, José Navarrete., 2022).

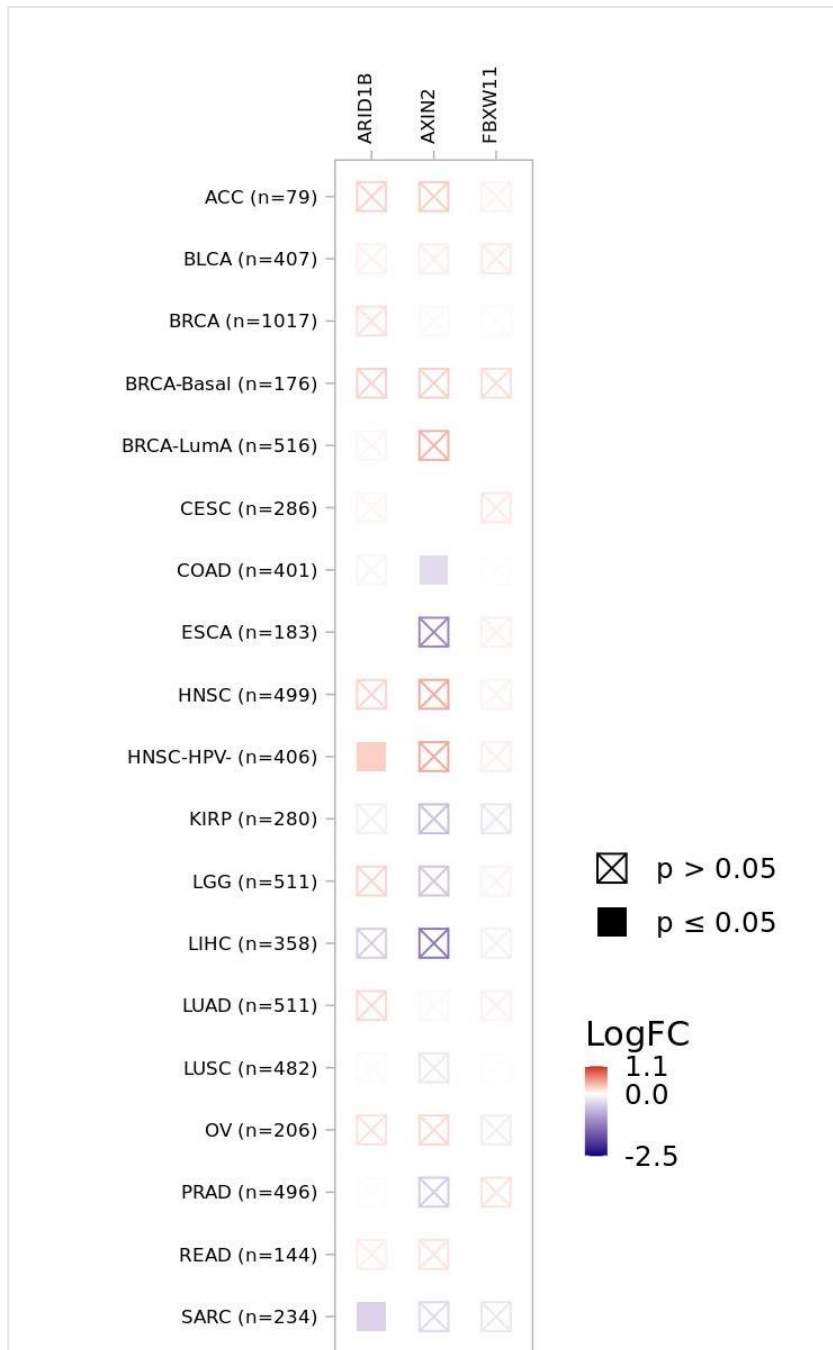


Figura 34: SALL2 mutado genera cambios en la expresión diferencial de AXIN2 en CCR (COAD). Análisis de expresión diferencial en TIMER 2.0 (<http://timer.cistrome.org/>) indica cambios en la expresión de genes de interés como AXIN2, FBXW11 y ARID1B con la condición “SALL2 mutado” en CCR (COAD) ⊠ : No significativo. ■ : Significativo ($p < 0,05$). En azul, genes que el ARNm se encuentra disminuido y en rojo aumentado.

Luego a modo de encontrar más asociaciones biológicas entre el eje SALL2-AXIN2-Wnt/ β -catenina se procedió a realizar análisis bioinformáticos. En primer lugar, se utilizó el software R2 de correlación génica (Genomics Analysis and Visualization Platform, <https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) donde se analizaron los datos públicos de 121 muestras de CCR (GSE3629). Se observó una correlación positiva entre *SALL2* y *AXIN2* con un $R=0.702$ y $p=2.74E-19$ (**Figura 35A**). Para complementar estos análisis de correlación, se utilizó la base de datos SurvExpress (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx/SurvExpress>), que es una base de datos que relaciona datos de expresión génica con información clínica. Resultados indican que *SALL2* y *AXIN2* tienen expresión significativamente disminuida en el grupo de pacientes de CCR de alto riesgo (rojo), comparado con el grupo de pacientes de bajo riesgo (verde) (**Figura 35B**).

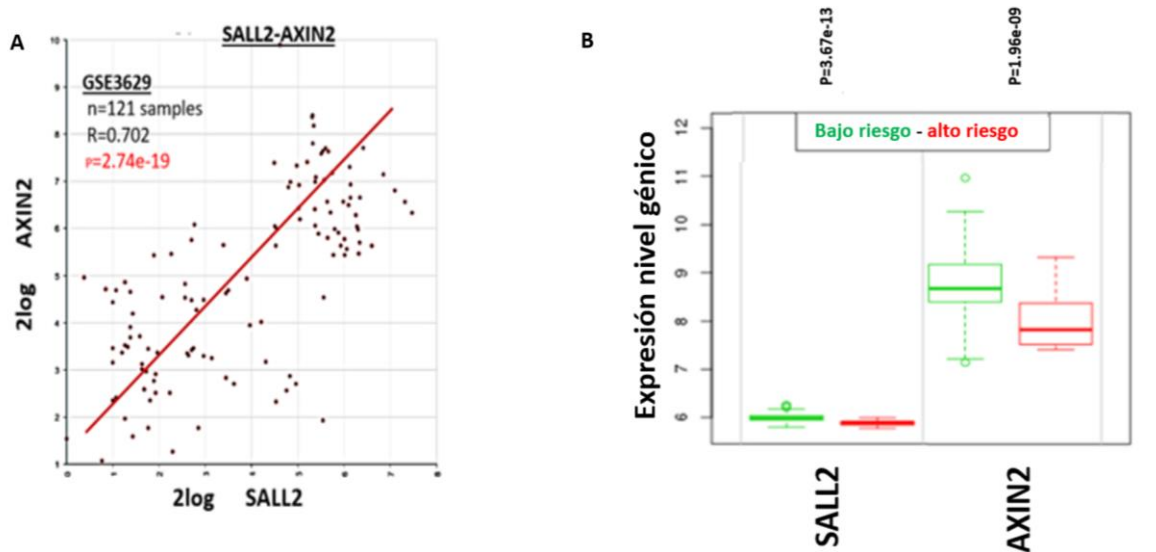


Figura 35: Correlaciones bioinformáticas positivas entre la expresión de *SALL2* y *AXIN2*. **A)** Correlación de *SALL2* y *AXIN2* del estudio GSE3629 utilizando la base de datos R2 (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). $R= 0,702$ $p=2,74E-19$. **B)** Correlación de *SALL2* y *AXIN2* utilizando base de datos SurvExpress (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>). En verde se muestra el nivel de expresión de *SALL2-AXIN2* en grupo de pacientes con bajo riesgo y en rojo pacientes con alto riesgo. *SALL2* ($p=1,67E-11$) y *AXIN2* ($p=1,96E-09$).

En resumen, se postula a *AXIN2* como un posible blanco transcripcional de *SALL2* por los siguientes motivos: 1) El promotor de *AXIN2* posee sitios de unión para *SALL2*. 2) Análisis bioinformáticos indican una relación positiva entre la expresión de *SALL2* y *AXIN2*

en CCR 3) Esta relación positiva puede impactar además en la clasificación de pacientes de bajo y alto riesgo de CCR.

Para poder determinar si la expresión de *AXIN2* es dependiente de *SALL2* en contexto de la vía Wnt, se usaron LiCl o CHIR99021 como activadores de la vía en modelos con pérdida y ganancia de función de *SALL2*.

Datos del objetivo 2 de esta tesis muestran un incremento en los niveles proteicos de *SALL2* luego de 4 h de activación de la vía. Por este motivo, se eligió este tiempo de tratamiento con diferentes concentraciones de CHIR99021 o LiCl, para evaluar los niveles de *AXIN2* mediante western blot. Se observó un incremento de *AXIN2*, concentración dependiente, en células *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-}, sin embargo, este incremento fue significativamente menor en células deficientes de *SALL2* (*SALL2*^{-/-}). Una observación interesante, fue que los cambios en la expresión de *AXIN2* se corresponden con el incremento de *SALL2* en respuesta a los activadores de la vía Wnt (**Figura 36 A-D**). Estos resultados también fueron analizados por fraccionamiento subcelular. Análisis de fraccionamiento subcelular indica que en presencia de CHIR99021 o LiCl, *AXIN2* aumenta su expresión en el núcleo, efecto que es disminuido en las células *SALL2*^{-/-} (**Figura 36 E-F**). Estos resultados indican que existe una dependencia de *SALL2* en la expresión de *AXIN2* mediada por agonistas de la vía Wnt. Además, se observa que el aumento de *AXIN2* dependiente de *SALL2* es principalmente nuclear.

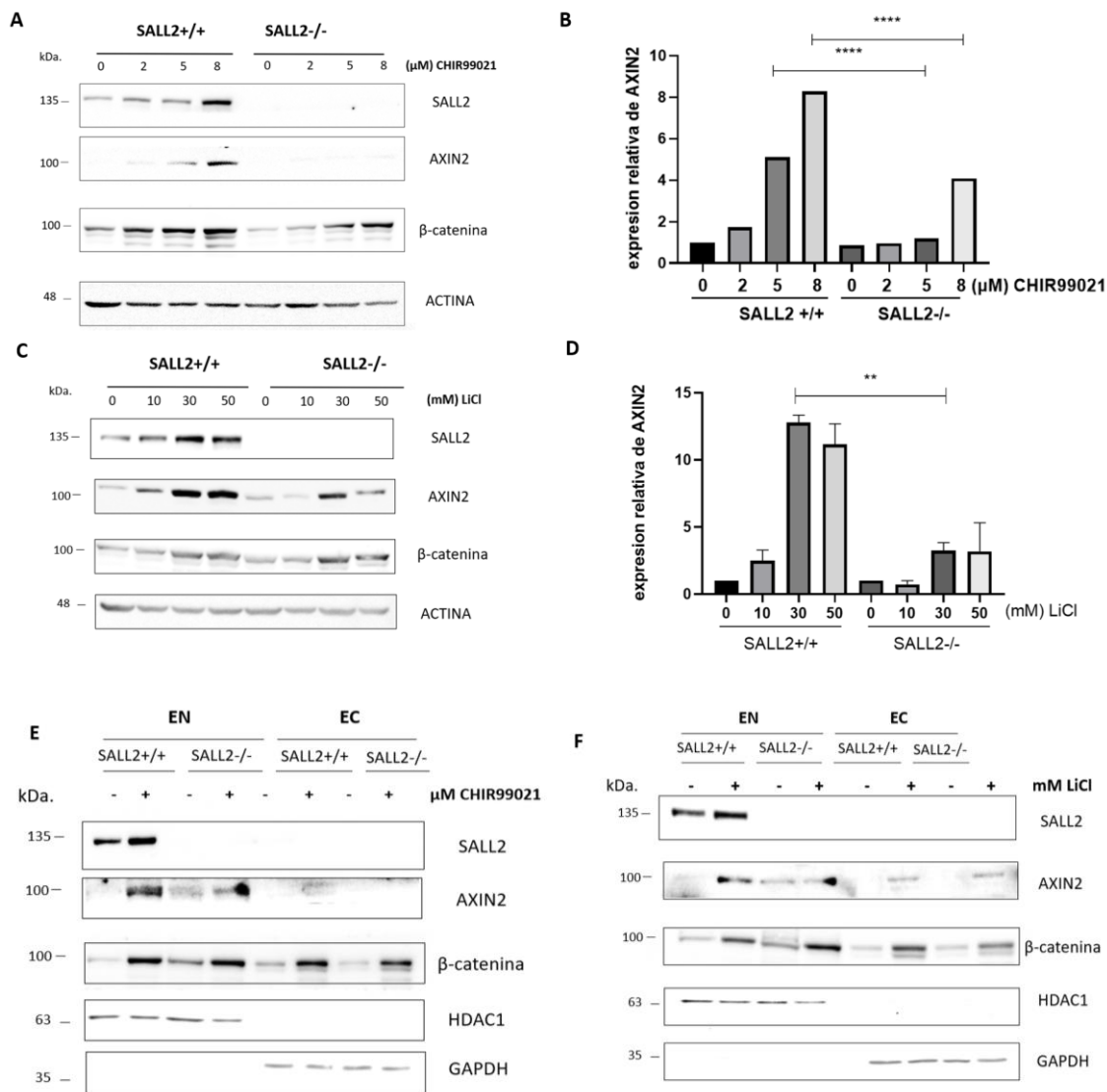


Figura 36: El aumento de AXIN2 por activación de la vía (CHIR99021 o LiCl) depende de la expresión de SALL2. Tratamiento a diferentes concentraciones del activador CHIR99021 (**A**) y LiCl (**C**) de la vía Wnt en células CCD-841-CoN muestran relación positiva con AXIN2 en células que expresan SALL2. **B**) Histograma de la densitometría en A (N=3) (****=p<0,001). **D**) Histograma de la densitometría en C (****=p<0,001). **E-F**) Fraccionamiento subcelular muestra incremento de AXIN2 nuclear en células que expresan SALL2 en el tratamiento con CHIR99021 (E) o LiCl (F) en células CCD-841-CoN.

Para confirmar si los cambios de *AXIN2* dependientes de *SALL2* son transcripcionales, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa. Resultados indican que existe un incremento de los niveles del ARNm de *AXIN2* en presencia de CHIR99021 por 4 h, que coincide con la inducción de *SALL2* (**Figura 37A**). Este incremento en los niveles del ARNm de *AXIN2* fue dependiente de *SALL2*. Estos resultados también fueron replicados en células SW480 de cáncer de colon utilizando LiCl (**Figura 37B**) y previamente CHIR99021 (Tesis de pregrado Bioingeniería, José Navarrete., 2022).

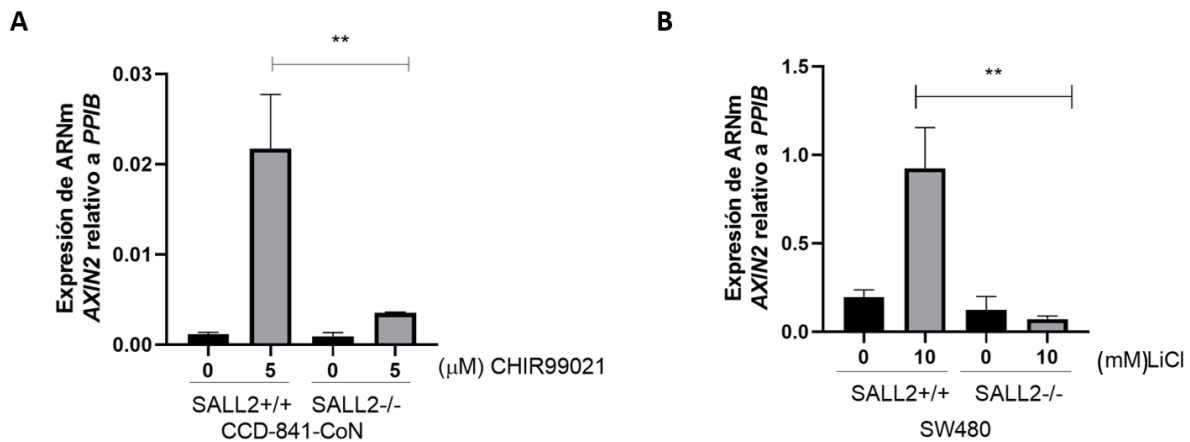


Figura 37: Células *SALL2*^{+/+} expresan mayores niveles de *AXIN2* en presencia de CHIR99021 o LiCl. A) Expresión relativa del ARNm de *AXIN2* en células CCD-841-CoN *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-} con tratamiento con 5μM CHIR99021 (n=3) (= $p < 0,01$). B) Expresión relativa del ARNm de *AXIN2* en células SW480 *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-} con el tratamiento con 10mM de LiCl por 4 h (n=3) (**= $p < 0,01$).**

Con el objetivo de evaluar si *SALL2* regula la actividad del promotor de *AXIN2*, se realizó el ensayo reportero de luciferasa. Evaluamos la capacidad de respuesta del promotor de *AXIN2* humano de 1 Kb a la isoforma *SALL2* E1A. Para ello se utilizó el modelo HEK *SALL2* E1A inducible (DOX) y se realizó tratamiento con 5μM CHIR99021 por 4 horas. Resultados indican que *SALL2* E1A aumenta significativamente la actividad del promotor *AXIN2*, tanto en condiciones basales como frente a activación de la vía Wnt por CHIR99021 (**Figura 38B**), lo que indica que la isoforma *SALL2* E1A aumenta la actividad del promotor *AXIN2*. Como control negativo se utilizó el promotor *AXIN2* 1kb mutado en 200pb. En la **figura 38A** se muestra la secuencia silvestre (25701) y la mutada del promotor (25704), nótese que en la región mutada se pierden los sitios de unión para *SALL2* (rojo) y TCF/LEF (azul). Por lo que este control no permite dilucidar si el aumento de la actividad del promotor

Se estandarizaron las condiciones del PCR para la ChIP usando PCR convencional a modo de verificar los tamaños esperados de los amplicones. En **Anexo 6** muestra que la mejor condición para la amplificación de las regiones de interés del promotor de *AXIN2* corresponden a 0% DMSO para el set 1, 5% DMSO para el set 2 y 10% DMSO para el set 3. Se muestran controles negativos y positivos respectivos. Por otro lado, la temperatura de melting que mejor resultados dió fue de 60°C. Se muestran las curvas de amplificación con sus respectivos ct (ciclo threshold) en donde se observa sólo una curva sigmoidea de amplificación y sólo un peak de temperatura de melting, estos datos demuestran que no existen productos de amplificación inespecíficos (**Anexo 6**).

La **figura 39B-D** muestra que SALL2 E1A se une a la región proximal de *AXIN2*. Específicamente existe mayor unión de SALL2 en el set3, correspondiente a la región más proximal al sitio de inicio de la transcripción (-108/-112) (**Figura 39 D**). Se confirmó mediante un gel de agarosa, que los amplicones provenientes del ChIP-qPCR correspondían al tamaño esperado (**Figura 39 E**).

Además, a modo de confirmar que la cromatina sufre cambios significativos en la apertura de esta, es que se evaluó la unión de histona H3 y su forma acetilada (H3K27ac) (Karantzali et al., 2008; Pasini et al., 2010). Resultados indican que, en la región proximal (set 3), en donde se uniría SALL2, existe un cambio significativo en la apertura de la cromatina (**Figura 39 F**). Sin embargo, al utilizar partidores generados previamente en el laboratorio para una región que no tiene sitios de unión a SALL2, llamada “región no relacionada”, no se observan cambios (Riffo et al., 2022) (**Figura 39 G**). Juntos, estos resultados demuestran que SALL2 se une al promotor de *AXIN2*.

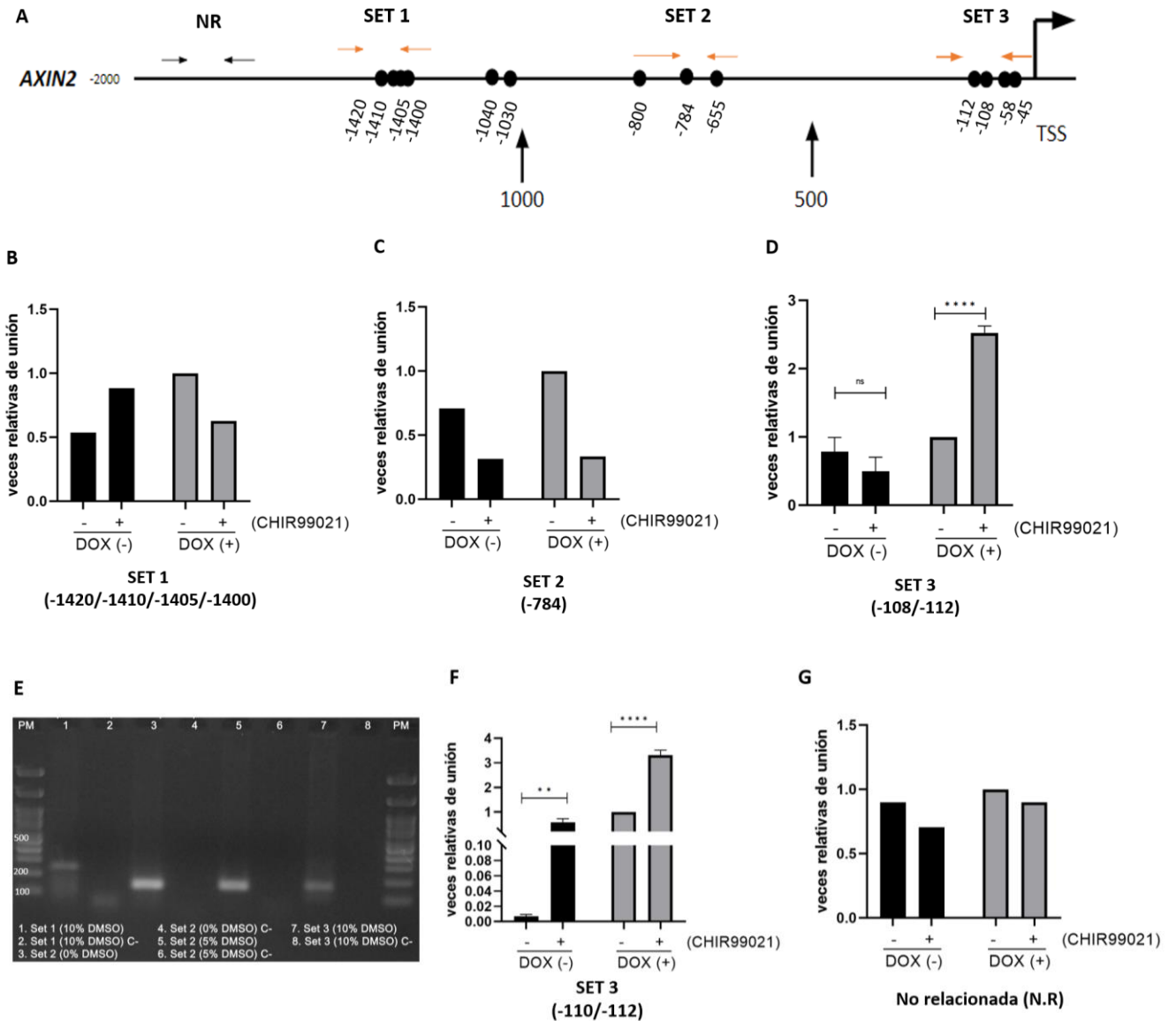


Figura 39: SALL2 E1A se une al promotor de *AXIN2* humano. Células HEK293 SALL2 EA1 inducibles fueron sometidas a 1 μ g/mL de doxiciclina (DOX) por 48 h y posteriormente fueron sometidas a 4 h de tratamiento con 5 μ M de CHIR99021. Esquema del promotor de *AXIN2* mostrando los set de partidores diseñados para los sitios de unión para SALL2 (**A**). Inmunoprecipitación de cromatina de la región proximal del promotor de *AXIN2*. Los resultados fueron normalizados respecto al input utilizando los partidores correspondientes al set 1 (**B**), set 2 (**C**) y set 3 (N=3) (**D**). Valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes (***)= $p < 0,03$). **E**) Gel de agarosa (2%) para confirmar el tamaño del amplicón

del set 1, 2 y 3. **F)** PCR cuantitativa de H3K27ac respecto al total de H3, en set 3. **G)** PCR cuantitativa de región no relacionada (N.R), ver tabla 2.

Para dilucidar si la relación positiva entre SALL2 y AXIN2 se mantiene en otros modelos celulares, se evaluó ARNm y proteína de ambos en células normales de epitelio de colon CCD-841-CoN, y en modelos de cáncer de colon SALL2 E1A inducibles, que incluye células SW480, HT29, SW48 y SW620. Como se evidencia en la **Figura 40** la relación positiva en la expresión de SALL2 y AXIN2 se mantiene en todos los modelos analizados. En los modelos de pérdida de función de SALL2, AXIN2 disminuye los niveles proteicos. Mientras que en los modelos de ganancia de función se revierte el fenotipo, en donde AXIN2 aumenta los niveles de proteína (**Figura 40, arriba**) y ARNm (**Figura 40, abajo**). Estos resultados fueron confirmados por inmunofluorescencia. Encontrándose una significativa correlación positiva SALL2-AXIN2 en células SW480 (**Figura 41A**), SW480 (**Figura 41B**) y HT29 (**Figura 41C**).

En conjunto estos resultados indican que SALL2 regula de manera positiva al modulador inhibitorio de la vía Wnt: AXIN2. Este mecanismo es conservado en células de epitelio de colon normal CCD-841-CoN y células de cáncer (SW480, SW620, HT-29 y SW48).

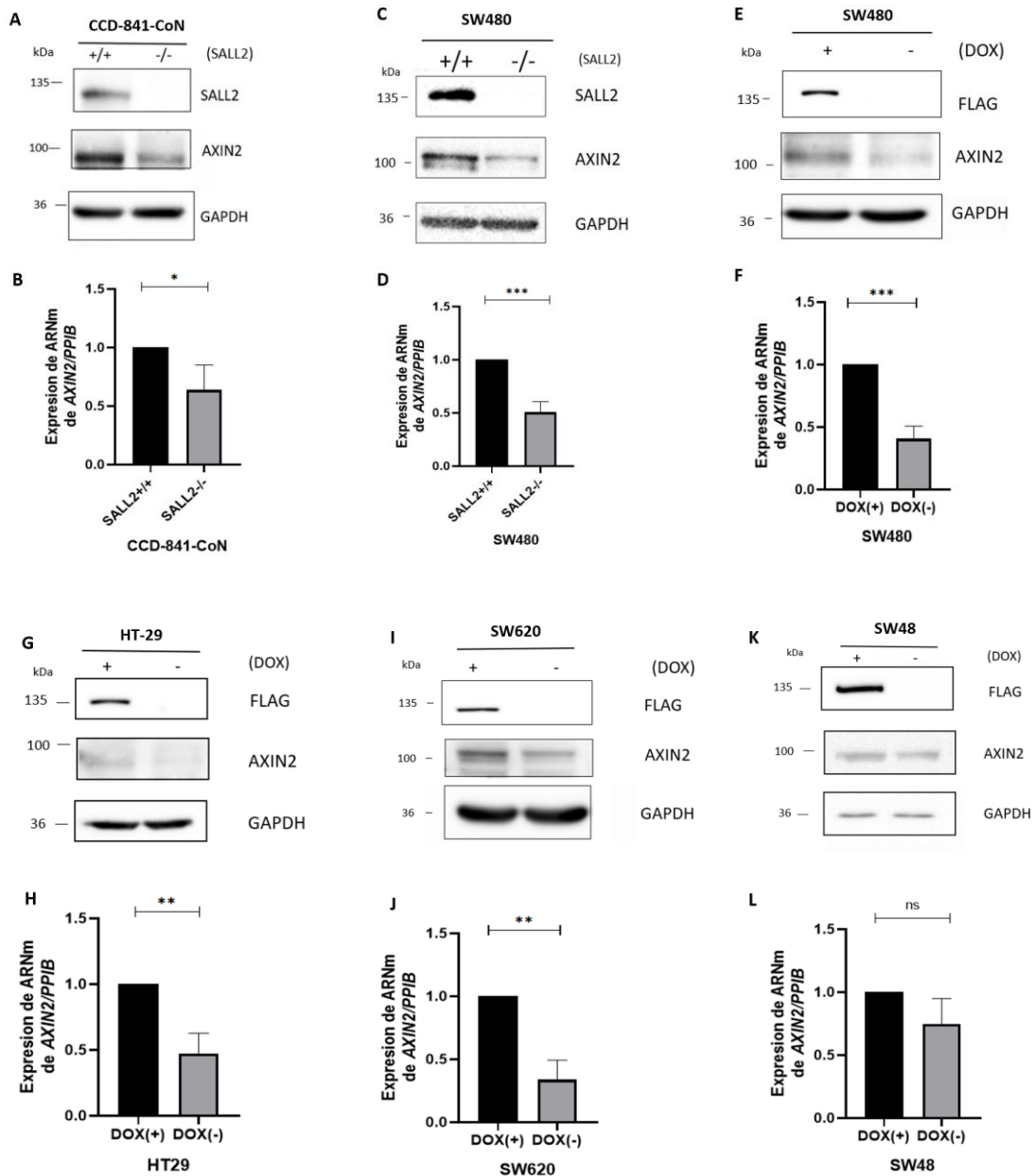
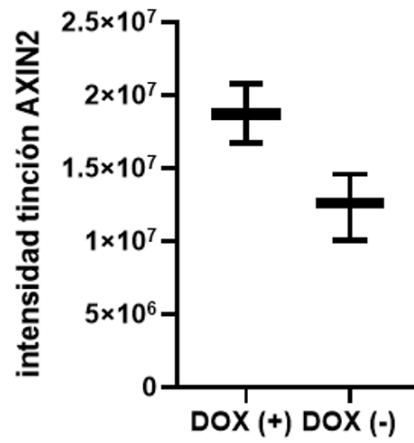
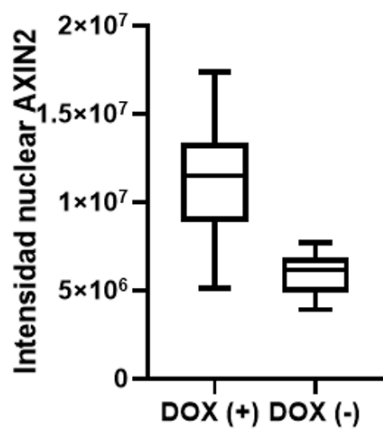
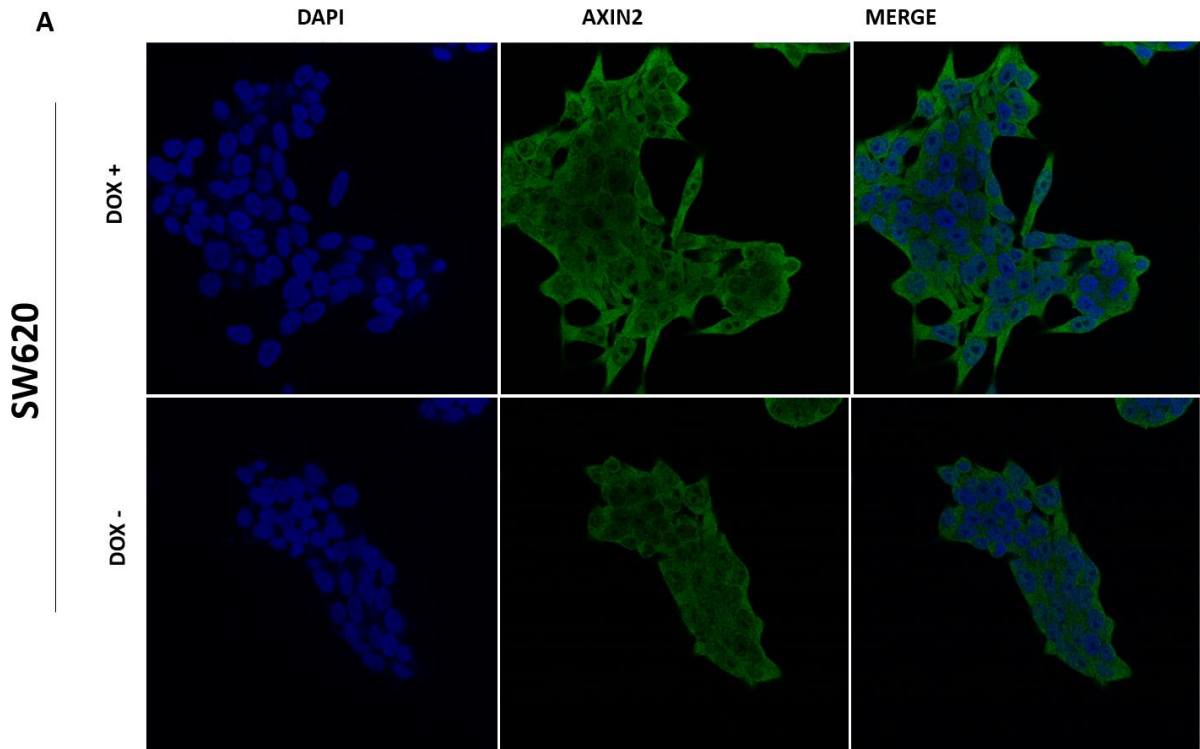
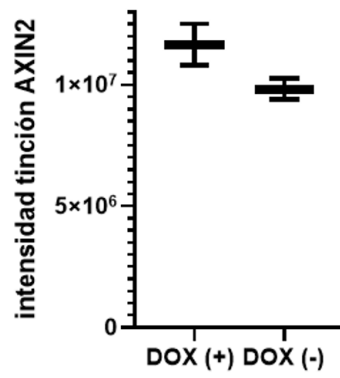
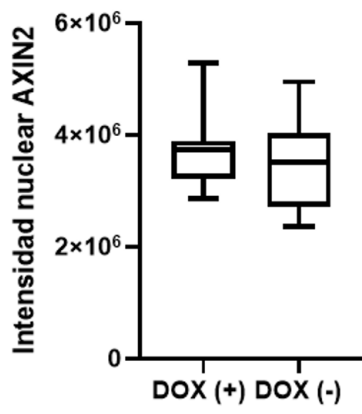
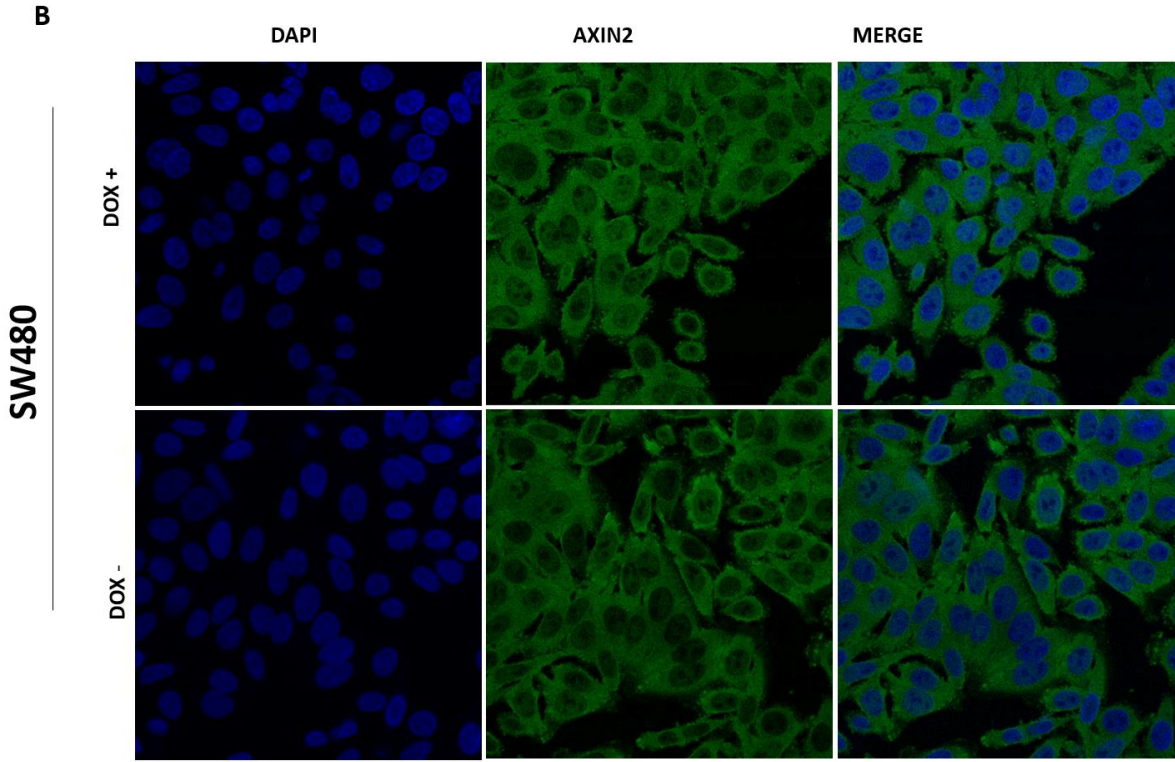


Figura 40: La expresión de SALL2, incrementa los niveles proteicos y de ARNm de AXIN2 en células normales de colon y de cáncer de colon. Se utilizó el modelo CRISPR-Cas9 CCD-841-CoN y SW480. También se realizó el análisis en modelos inducibles SALL2 E1A, las células SW480, SW620, SW48 y HT-29 fueron tratadas por 48 h con 1ug/ml de Doxiciclina. Se realizó inmunoblot y qPCR, utilizando GAPDH y *PPIB* como normalizadores, respectivamente. **A-B)** Células CCD-841-CoN **C-D)** SW480, modelo CRISPR-Cas9 **E-F)** SW480 SALL2 E1A inducible **G-H)** HT-29 SALL2 E1A inducible. **I-J)** SW620 SALL2 E1A inducible. **K-L)** SW48 SALL2 E1A inducible. (N=3).





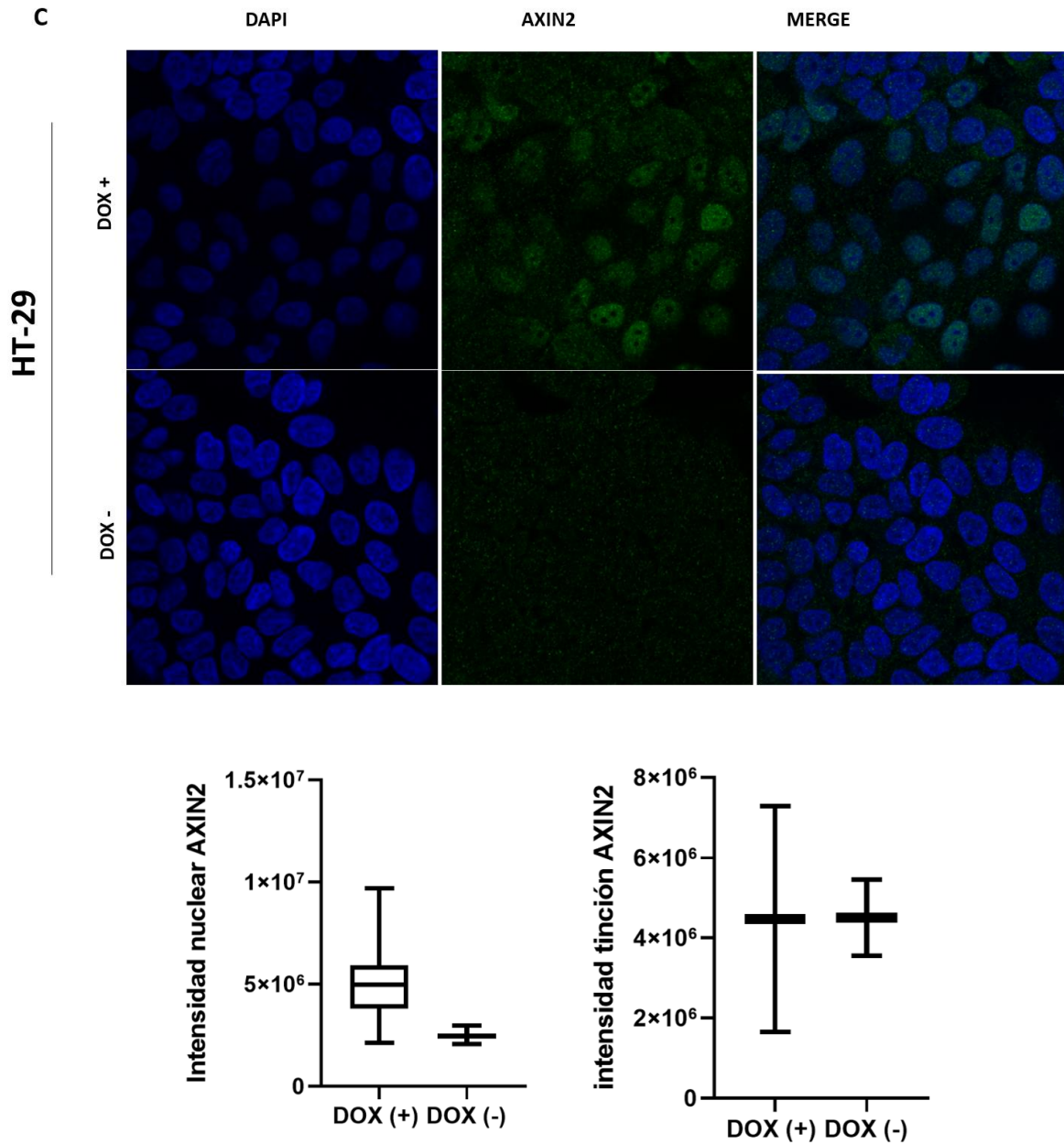


Figura 41: La inducción de SALL2 incrementa los niveles de AXIN2. Inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal LMS780, aumento 63X. Se muestra en verde la tinción de AXIN2 y en azul los núcleos (DAPI). El análisis de intensidad de fluorescencia (mean) fue realizado utilizando segmentación manual (wand tool) o segmentación usando Threshold en Fiji, cada experimento cuenta con 100 células analizadas (N=1). **A)** SW620 **B)** SW480 **C)** HT-29.

7.3.2.- Relación funcional entre SALL2-AXIN2.

Datos del objetivo número dos muestran que el tratamiento con XAV939 incrementa los niveles proteicos de SALL2 y AXIN2 (**Ver figura 32**). Por otro lado, XAV939 se ha vuelto un blanco importante de estudio, ya que logra disminuir los niveles de β -catenina nuclear en células de CCR que portan mutaciones en *APC*, como por ejemplo en las células SW480. Adicionalmente, dentro de las respuestas celulares, XAV939 se ha relacionado con la inhibición de la proliferación y la apoptosis (Huang et al., 2009; Stakheev et al., 2019; Zhang et al., 2021). El mecanismo de acción del XAV939 es principalmente estabilizar post-traduccionamente a AXIN2, inhibiendo a Tankyrasa 1 y 2. Se demostró que las tankyrasa interactúan con un dominio altamente conservado de AXIN2 y promueven la ubiquitinación y degradación de AXIN2 de una manera dependiente de la PARsilación (Bao et al., 2012). Por este motivo, intentando disminuir la activación de la vía Wnt en células de CCR con mutaciones en *APC*, se hace relevante utilizar fármacos como el XAV939, que estabilicen reguladores negativos como AXIN2 o incrementen los niveles de supresores tumorales como SALL2. Además, considerando que SALL2 activa la transcripción de *AXIN2*, se hace necesario conocer si en los cambios de AXIN2 frente al estabilizador existe una dependencia de SALL2. Por ello células SW480 *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-} fueron tratadas con el inhibidor de la vía XAV939 por 24 horas. Se observó que efectivamente β -catenina disminuyó sus niveles proteicos en las condiciones con el tratamiento. Células *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-}, aumentaron los niveles de AXIN2 frente a XAV939, sin embargo, en células deficientes de SALL2 los niveles de AXIN2 fueron menores en comparación con células *SALL2*^{+/+} (**Figura 42 A-B**).

Análisis de qPCR indican que no existen cambios en los niveles de ARNm de *AXIN2* frente al tratamiento con XAV939. Sin embargo, existen mayores niveles basales de *AXIN2* en células *SALL2*^{+/+} respecto a células *SALL2*^{-/-} (**Figura 42 C**).

En los últimos años se ha demostrado que AXIN2 no sólo tiene funciones en el degradosoma como inhibidor de la vía Wnt, si no que puede actuar a nivel nuclear como proteína de andamiaje participando en la regulación de la transcripción de genes Wnt (Renoll et al., 2014). Por este motivo evaluamos si en presencia de XAV939 existen cambios en los niveles nucleares de AXIN2 dependiente de SALL2. Ensayos de inmunofluorescencia de la proteína AXIN2 endógena indican que los niveles totales y nucleares de AXIN2 en presencia de XAV939 fueron menores en células *SALL2*^{-/-} en comparación con células *SALL2*^{+/+} (**Figura 42D-F**).

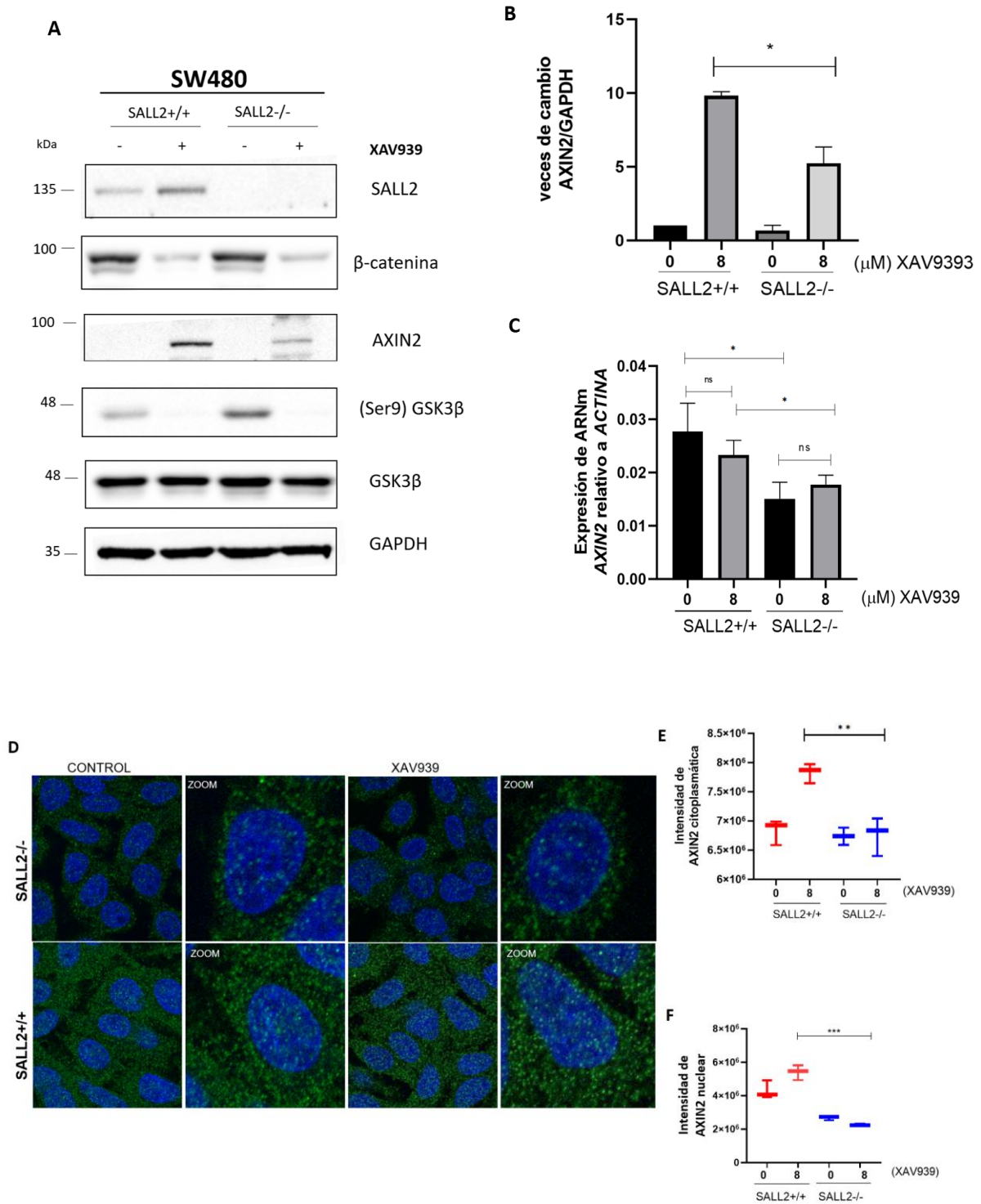


Figura 42: El aumento de AXIN2 por inhibición de tankyrasa (XAV939) depende de la expresión de SALL2. A-B) Western blot de células SW480 tratadas con 8μM XAV939 por 24 h. Se usó como control de inhibición de la vía Wnt a β-catenina y (Ser9)-GSK3β. En **B**

se muestra el histograma de la densitometría de **A**. Se graficó la representación de 3 experimentos independientes mostrando las veces de cambio respecto al control silvestre ($p < 0,05$). **C**) PCR cuantitativa de *AXIN2*, usando como gen normalizador a *ACTINA*. **D**) Inmunofluorescencia de *AXIN2* en células SW480. Se evaluaron 100 células por experimento en 3 réplicas independientes. **E**) Cuantificación de *AXIN2* total usando Fiji y segmentación por threshold. **F**) Cuantificación de *AXIN2* nuclear usando Fiji y segmentación manual (*wand tool*).

Como se ha mencionado anteriormente, XAV939 inhibe la proliferación y/o aumenta la apoptosis en células de cáncer (Stakheev et al., 2019; Kim et al., 2019; Wu et al., 2016b)). Por este motivo, evaluaremos cambios en la tasa de proliferación celular dependiente de SALL2.

Se realizó un ensayo de proliferación en células SW480 y HT29 con pérdida y ganancia de función de SALL2 respectivamente. Resultados indican que en células SW480 XAV939 disminuye la proliferación celular de manera dependiente de SALL2. Sin embargo, este efecto no fue evidenciado en células HT-29 (**Figura 43**).

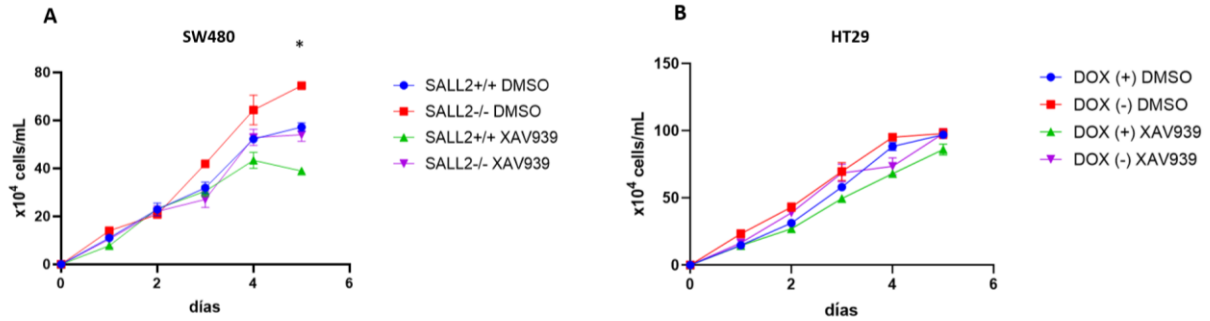


Figura 43: La proliferación disminuye por el inhibidor XAV939, dependiente de SALL2. Ensayo de proliferación utilizando células CCR y tratamiento con XAV939 (N=2). **A)** SW480 *SALL2*^{+/+} y *SALL2*^{-/-} ($p < 0,05$) **B)** HT29 *SALL2* *E1A* inducibles.

Considerando que la vía Wnt canónica se ha relacionado con la quimioresistencia en CCR, también evaluamos el efecto de XAV939 y SALL2 en la respuesta de muerte. Células SW480 *SALL2*^{-/-} y *SALL2*^{+/+} fueron tratadas con XAV939 por 24 h, para luego evaluar por western blot la expresión de proteínas involucradas en apoptosis (Caspasa 3 y PARP-clivado). P21 se utilizó como marcador de arresto de proliferación y AXIN2 como control positivo de efectividad de la droga.

La **figura 44** indica que la inhibición de la vía Wnt por XAV939 genera un aumento de SALL2 e induce apoptosis evidenciada por el aumento en PARP-Clivado y caspasa 3-clivada. La ausencia de SALL2 disminuye la respuesta apoptótica. Como era esperado la inhibición de la tankyrasa por XAV939 aumenta los niveles de AXIN2 y P21, los cuales también se vieron disminuidos en células *SALL2*^{-/-}.

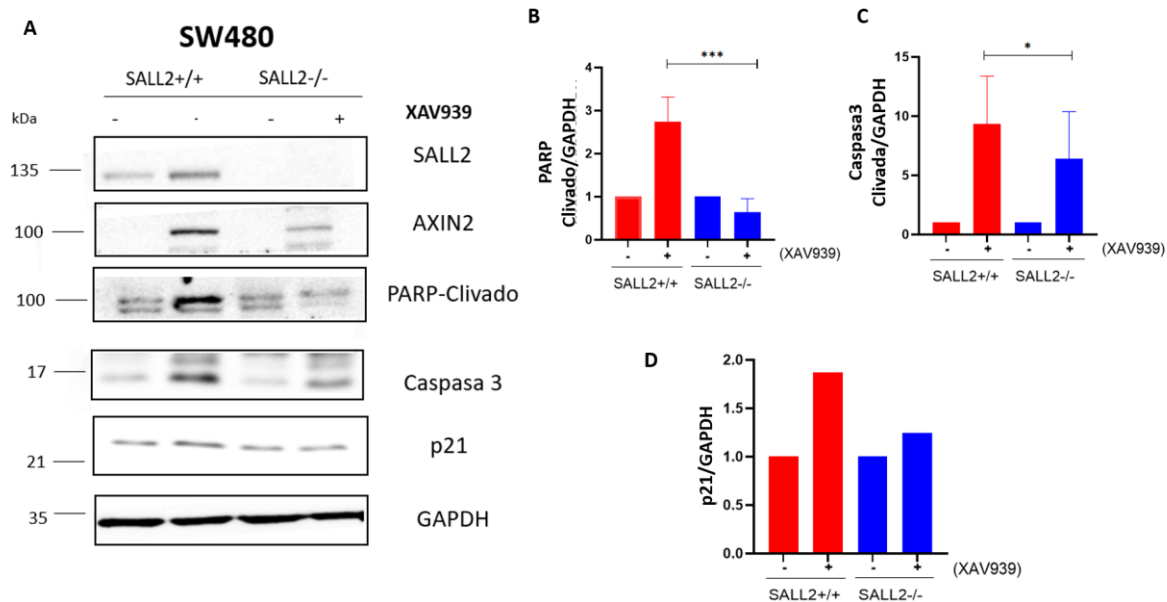


Figura 44: El tratamiento con XAV939 incrementa la expresión de proteínas apoptóticas en células SALL2+/+. **A)** Inmunoblot de proteínas apoptóticas como caspasa clivada 3, caspasa clivada 9, PARP clivado y la proteína de arresto celular p21. Se utilizó como control de carga GAPDH (N=3). **B)** Histograma de la densitometría en A para PARP Clivado ($P<0,001$). **C)** Histograma de la densitometría en A para caspasa 3 clivada ($P<0,05$). **D)** Histograma de la densitometría en A para P21.

Estos resultados sugieren que SALL2 es requerido para el efecto antiproliferativo y de muerte celular inducido por XAV939. Considerando nuestros resultados, SALL2 actuaría como un supresor tumoral en contexto CCR y su expresión favorecería la respuesta a la inhibición de la vía Wnt.

8.DISCUSIÓN:

8.1.- OBJETIVO 1: Determinar la expresión espacio-temporal de SALL2 en la progresión del cáncer de colon.

SALL2 es un factor de transcripción que ha sido relacionado con el desarrollo embrionario, proliferación, apoptosis y cáncer (Hermosilla et al., 2017). Las funciones caracterizadas indican que SALL2 regula negativamente la proliferación celular, y en contexto de daño genotóxico induce apoptosis, lo que sugiere una función de supresor tumoral. Estas funciones estarían relacionadas con sus blancos transcripcionales, ya que induce la expresión de *CDKN1A*, *CDKN2A*, *PTEN*, *BAX*, *PMAIP1* y *ESR1* (Escobar et al., 2015; Li et al., 2004; Wu et al., 2015; Ye et al., 2019a), y reprime la expresión de oncogenes como *CCND1*, *CCNE1* y *c-MYC* (Hermosilla et al., 2018; Sung et al., 2012). Estos blancos de SALL2 han sido caracterizados y validados en varios contextos genéticos, incluyendo fibroblastos embrionarios, células de cáncer de mama, esófago y ovario (Hermosilla et al., 2017).

Usando la plataforma MiPanda (<http://mipanda.org>), que corresponde a una base de datos masivos de expresión de ARNm en cáncer, se determinó que los niveles de expresión de *SALL2* se encuentran disminuidos en diferentes contextos de cáncer, encontrando la mayor significancia en el cáncer de colon comparado con el tejido normal (Farkas et al., 2021). No obstante, no existen estudios previos de la expresión proteica de SALL2, o de su localización subcelular en contexto de colon normal o tumoral. Acorde con el resultado esperado en base a los análisis bioinformáticos, nuestro estudio indica que la expresión de SALL2 disminuye significativamente hacia la progresión del adenocarcinoma de colon constituyéndose en el primer análisis de los niveles proteicos de SALL2 en un contexto de cáncer de colon en pacientes chilenos.

Nuestros estudios indican que SALL2 se expresa en la mucosa de colon normal, con una localización nuclear y citoplasmática. Se encontró una mayor proporción de SALL2 nuclear en el estroma (23,3%) que en las glándulas (15,4%), siendo la tinción citoplasmática la más predominante. Estudios previos de localización subcelular de SALL2 en otros contextos tumorales indican que puede variar dependiendo del tejido y contexto celular. En tejido de ovario normal SALL2 se localiza principalmente en el núcleo, y pierde su expresión en los distintos subtipos histológicos de cáncer de ovario (Sung et al., 2013). Por otro lado, en contexto de cáncer de mama, SALL2 presenta un patrón nuclear y citoplasmático en el tumor primario, el cual se pierde en estados más avanzados como metástasis linfáticas, de

pulmón y óseas (Ye et al., 2019). Aparentemente estas diferencias no se relacionan con el anticuerpo usado, ya que tanto los estudios mencionados como el nuestro, se usó el mismo anticuerpo (#HPA004162; Sigma-Aldrich). Sin embargo, sugieren que además de encontrarse activo en el núcleo, SALL2 podría también estar latente en el citoplasma, como ha sido reportado previamente en células neuronales, donde la localización de SALL2 cambia de citoplasma a núcleo, en presencia de neurotrofinas (Pincheira et al., 2009).

El resultado de nuestro estudio de IHQ cromogénica indica que SALL2 se expresa en el estroma. Acorde a la morfología fusada de las células positivas al anticuerpo se sugiere que se expresa en fibroblastos. Esto concuerda con estudios previos, que confirman la expresión de SALL2 en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y fibroblastos de dermis humana (HSFs) (Hermosilla et al., 2018; Riffo et al., 2022; Sung et al., 2011).

Los fibroblastos de la cripta de colon normal son un componente importante porque cumplen un rol regulatorio en el nicho de células madre. Este nicho corresponde a la región basal en las criptas de Lieberkühn, y contiene a las células madre, células de Paneth-*like* y fibroblastos estromales adyacentes. Nuestro estudio usando IHQ multiplex confirma que SALL2 se expresa en los fibroblastos estromales adyacentes de la cripta de colon normal con localización principalmente nuclear. Esto sugiere que SALL2 regula blancos transcripcionales asociados a la proliferación/renovación del nicho de células madre. Consecuente con esto, nuestros resultados del objetivo 2 indican una correlación positiva de SALL2 con los ligandos *WNT3A* o *WNT7B*. Considerando que ambos genes tienen sitios de unión a SALL2 en sus promotores, esto los convierte en un atractivo blanco de estudio. Como proyección queda pendiente analizar si la transcripción y posterior secreción de estos ligandos es dependiente de SALL2. La regulación de *WNT3A* o *WNT7B* por SALL2 podría relacionarse con el control de la proliferación en el nicho de células madre, ya que el mantenimiento de estas células depende de la activación de la vía Wnt (Colozza et al., 2022).

De manera interesante otros estudios han relacionado a SALL2 con el funcionamiento de células madre en contexto tumoral de glioblastoma (GBM). Se demostró que SALL2, junto a los factores POU3F2, SOX2 y OLIG2 son esenciales para la reprogramación de células de GBM diferenciadas a células madre propagadoras de tumor (Suva et al., 2014). Estos datos nos llevan a hipotetizar que SALL2 tiene un rol regulatorio de las células madre tanto en contexto normal como en cáncer. Sin embargo, queda pendiente determinar si SALL2 además de los fibroblastos estromales se expresa en las

células madre del colon normal y/o de cáncer. Con este fin, se podría realizar doble marcación, utilizando el anticuerpo de SALL2 y de LGR5, receptor de R-Spondina, agonista de la vía Wnt que se utiliza como marcador de células madre (Gjorevski & Ordóñez-Morán, 2017; Norum et al., 2018; Sato et al., 2011; Zhu et al., 2021).

El microambiente tumoral corresponde a la vecindad que rodea a las células tumorales e involucra fibroblastos estromales, células endoteliales y células inmunitarias como macrófagos y linfocitos. Además, se incluye en esta definición a los componentes no celulares de la matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, ácido hialurónico y laminina (Baghban et al., 2020). Recientemente se publicó una serie de análisis bioinformáticos que asocian a la familia SALL con el microambiente tumoral. Acorde con nuestros estudios se encontró que la expresión de SALL2 correlaciona con la expresión diferencial de genes estromales en adenocarcinoma de colon y recto. Sin embargo, el estudio no detalla las estirpes celulares en los cuales SALL2 estaría presente (Ma et al., 2021).

Utilizando IHQ multiplex, encontramos que SALL2 se expresa en macrófagos, pero no en linfocitos. Es importante destacar que los macrófagos presentan dos tipos de polarización, M1 y M2. Los macrófagos M1, son positivos a marcadores como CD40 y CD68 y secretan interleuquinas proinflamatorias como IL-1, IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF), además se han caracterizado por su rol antitumoral. Por otro lado, los macrófagos M2, juegan un rol opuesto a los macrófagos M1, promoviendo el crecimiento tumoral y metástasis. Los marcadores de macrófagos M2 incluye a las proteínas CD163 y CD206. En nuestro estudio encontramos que SALL2 se localiza en células CD68+, lo que nos indicaría que SALL2 se expresa en macrófagos de polarización M1, lo que concuerda con un rol supresor tumoral de SALL2 en CCR (Loh & Ma, 2021; Luo et al., 2022). La expresión de SALL2 en macrófagos anti-tumorales (M1), sugiere que cumple un rol en la regulación transcripcional de citoquinas proinflamatorias, lo cual quedaría pendiente por determinar en estudios posteriores. Por otra parte, queda también pendiente determinar si SALL2 se expresa en macrófagos M2, o si su expresión es exclusiva a macrófagos M1.

Estudios previos indican que la pérdida de expresión de SALL2 favorecería la progresión de diferentes contextos tumorales (Álvarez & Quiroz et al., 2021; Hermosilla et al., 2017). Por ejemplo, un estudio publicado el año 2019, correlaciona la alta expresión de SALL2 con una mejora en la sobrevida general de los pacientes con cáncer de mama positivos a receptor de estrógeno (RE). Los pacientes SALL2+ respondían de mejor manera al tratamiento con Tamoxifeno, porque SALL2 induce transcripcionalmente la expresión del

RE (Ye et al., 2019). En contexto de colon, nuestro estudio también indica una asociación entre la alta expresión de SALL2 y una mejora en la sobrevida general de los pacientes, sin embargo, la asociación encontrada no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, hay que considerar que el número de pacientes de nuestro estudio era limitado, por lo que queda pendiente aumentar el número de pacientes para confirmar esta asociación. Otro resultado relevante de la tesis relacionado como factor pronóstico y que podría explicar la relación de los niveles de SALL2 con la sobrevida de los pacientes es que se encontró una relación inversa entre la expresión de SALL2 y la expresión de β -catenina nuclear en el frente migratorio. Esto último es importante porque β -catenina nuclear en el frente migratorio se ha correlacionado con peor pronóstico de pacientes con CCR (Gao et al., 2014). La pérdida de SALL2 entonces se asociaría con la presencia de β -catenina nuclear en el frente migratorio y peor sobrevida.

Existen algunos estudios que relacionan a otros miembros de la familia SALL, específicamente SALL1 y SALL4, con el CCR. El promotor de *SALL1* se encuentra altamente metilado en CCR comparado con el tejido de colon normal lo que sugiere pérdida de su función en cáncer (Hill et al., 2010). Respecto a SALL4 su rol en CCR es aún controversial. Análisis de Kaplan-Meier de 135 pacientes con CCR muestran una sobrevida menor en el grupo de pacientes con SALL4(+), en comparación con pacientes SALL4(-) (Wu et al., 2017). Además, se describió que el ARNm de *SALL4* está altamente expresado en suero de pacientes con CCR y fue propuesto como marcador pronóstico (Khales et al., 2014; Wu et al., 2017). Sin embargo, un análisis de 149 pacientes reveló que la expresión de SALL4 disminuye en CCR (46,3 %), comparado con hiperplasia atípica (68,0 %) y tejido normal (78,9%) (SALL4-Santa Cruz) (Hao et al., 2016). En nuestro estudio, SALL4 no fue detectado en el tejido normal, ni en el adenoma o carcinoma. Considerando que el anticuerpo de SALL4 (SALL4 -Cell-marque (6E3)) utilizado en nuestro estudio detectó a SALL4 en un tejido control (disgerminoma), se descarta un problema de sensibilidad o especificidad del anticuerpo. La diferencia entre nuestros resultados y estudios previos podría deberse al background genético de la población estudiada o el anticuerpo utilizado entre otras. Nuestro estudio sugiere que a diferencia de SALL2, SALL4 no cumple un rol en CCR de pacientes chilenos.

8.2.- OBJETIVO II: Definir la relación funcional entre SALL2 y la vía Wnt y OBJETIVO III: Definir blancos transcripcionales de SALL2 con impacto en la vía Wnt/ β -catenina.

Análisis de ChIP-seq realizados previamente en el laboratorio indicaban que el factor de transcripción SALL2 podría estar involucrado en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina. En específico, los datos sugerían que SALL2 regula la expresión de reguladores negativos de la vía como *AXIN2*, y también la de genes que regulan positivamente a la vía como *WNT7B* (Tesis de pregrado Bioingeniería, José Navarrete., 2022). Sin embargo, quedaba por determinar si SALL2 se relaciona con la expresión de otros blancos de la vía Wnt, confirmar el mecanismo de regulación transcripcional y la relevancia de esta posible regulación en el contexto patológico.

Al momento de estudiar la vía Wnt/ β -catenina, es muy importante determinar cuáles son los niveles nucleares de β -catenina, ya que esto se relaciona directamente con la actividad transcripcional de la vía, además de ser considerado como un factor pronóstico en la progresión del cáncer (Gao et al., 2014). Nuestros resultados en modelos celulares de CCR SW480 indicaron que los niveles de β -catenina nuclear observados en células SW480 *SALL2* $-/-$ son mayores respecto a la condición silvestre (*SALL2* $+/+$). Por otra parte, en comparación con células HT29 con ganancia de *SALL2* (doxiciclina inducible) los niveles de β -catenina nuclear fueron menores respecto a la condición control sin doxiciclina (*SALL2* $-/-$). Además, la asociación negativa entre *SALL2* y β -catenina *in vitro*, es acorde con datos obtenidos desde tejidos humanos en donde se observó que *SALL2* y β -catenina en el frente migratorio correlacionan de manera negativa. De manera interesante, esta asociación negativa entre *SALL2* y la vía Wnt sería un mecanismo conservado entre células de mamíferos y xenopus. Estudios del ortólogo *SALL2* en Xenopus, *XsalF* demuestran que regula negativamente la vía Wnt/ β -catenina a través de la activación transcripcional de reguladores negativos de la vía como es: *tcf3* y *gsk3- β* (Onai et al., 2004).

Con el objetivo de conocer blancos transcripcionales de *SALL2* en contexto de activación de la vía Wnt, que puedan estar interviniendo en la modulación de β -catenina nuclear, se estimuló la vía con los activadores CHIR99021 o LiCl, que actúan inhibiendo a GSK3- β (Galli et al., 2013a; Tapia-rojas et al., 2015). Esto permite que los factores de transcripción TCF-LEF se unan al elemento de respuesta, activando o inhibiendo la transcripción de genes blanco (Ring et al., 2014). Nuestros datos indican que, tanto en células normales como de cáncer, el aumento en los niveles de *AXIN2* en respuesta a estos

activadores es dependiente de SALL2. De igual forma, observamos dependencia de SALL2 en la expresión de otros genes incluyendo *ARID1B* y *FBXW11*, todos, reguladores negativos de la vía. Además, en nuestro estudio encontramos una correlación negativa entre SALL2 y el ligando WNT3A. En conjunto, resultados indican que SALL2 estaría regulando positivamente a reguladores negativos y negativamente a reguladores positivos de la vía Wnt.

AXIN2 es una proteína de andamiaje que permite la fosforilación de β -catenina por CK1 y GSK-3 β , siendo parte del complejo de destrucción o degradosoma. En este complejo se pueden encontrar los parálogos AXIN1 y AXIN2/Conductin (Thorvaldsen et al., 2017). Aunque estructuralmente son proteínas con dominios muy conservados que cumplen la misma función, no tienen roles redundantes. Embriones murinos *AXIN1*^{-/-} son letales, no así los modelos *AXIN2*^{-/-} (Moshkovsky & Kirschner, 2022). AXIN2 además juega un papel predominante en la degradación de β -catenina, ya que frente al silenciamiento de *AXIN2*, β -catenina no se logra degradar. No así frente al silenciamiento de *AXIN1*. Entonces AXIN2 es la proteína limitante para el correcto funcionamiento del degradosoma y no AXIN1 (Wang et al., 2021). Por esta razón, en el contexto de los reguladores negativos asociados a SALL2 profundizamos el estudio en la regulación de AXIN2,

La relevancia de AXIN2 en cáncer también se sustenta con la identificación de los polimorfismos rs11079571, rs1133683 y rs35285779, que tienen correlaciones significativas con el riesgo de cáncer de mama y colon (Li et al., 2021; Otero et al., 2019). Esto último puede explicarse porque AXIN2 además de tener funciones de andamiaje en el citoplasma, tiene funciones nucleares relevantes en la vía Wnt. Participa en la regulación negativa de *C-MYC* a nivel nuclear actuando como proteína de andamiaje en el complejo represor TCF4/ β -catenina (Rennoll, 2014). Relacionado con las funciones de C-Myc, se publicó que el sh-*AXIN2* reduce la respuesta apoptótica en células madre embrionarias (Fu et al., 2020). Así también, el silenciamiento de *AXIN2*, lleva a la formación incrementada de colonias, favoreciendo el crecimiento independiente de anclaje (Huang et al., 2009).

Nuestros estudios indican que SALL2 se une al promotor proximal de *AXIN2*. Sin embargo, queda por determinar si SALL2 se une directamente a la secuencia de unión consenso (GGG(C/T)GGG), o si su unión al promotor de *AXIN2* es indirecta similar a lo que ocurre con SALL1 quien regula la vía Wnt canónica pero no se une directamente a la cromatina. SALL1 se une a β -catenina y en presencia de activadores de la vía provenientes del medio condicionado de células L (WNT3a), sinérgicamente activa la vía Wnt actuando

como un co-regulador (Sato et al, 2004). Esto quedaría pendiente de resolver con un ensayo de movilidad electroforética, ya que estudios de ChIP-PCR no permiten descartar que SALL2 se una al promotor de *AXIN2* de manera indirecta.

El programa transcripcional inducido por activación de la vía Wnt se caracteriza por dos fases: una fase temprana (0-3 horas) y una tardía (3-24 horas) (Gujral & Macbeath, 2010). En la fase temprana, los antagonistas de la vía son regulados de manera negativa. Esto va acompañado de un aumento en la expresión de genes reguladores positivos, como *c-MYC*. En la fase tardía, los antagonistas de la vía, incrementan sus niveles a partir de las 3 horas para establecer el feedback negativo, como *AXIN2* (Gujral & Macbeath, 2010). Nuestros datos sugieren que SALL2 es a su vez regulado por la vía Wnt, observando en su expresión una cinética clásica de genes de respuesta de la vía. Tanto en células normales CCD-841-CoN como en células de cáncer SW480 tratadas con agonistas de la vía, fue posible observar el incremento de los niveles de SALL2 en la segunda fase (4 horas), lo que sugiere que SALL2 es inducido por la vía para establecer el posterior *feedback* negativo, mediante la regulación transcripcional de *AXIN2*. Observamos que el aumento en los niveles nucleares de SALL2 coincide con la inducción del ARNm de *AXIN2* a las 4 h de tratamiento con CHIR99021 o LiCl. La hipótesis de que SALL2 sea un blanco transcripcional de la vía Wnt podría explicarse por la presencia de sitios de unión a factores de transcripción TCF-LEF en su promotor (Kelbermann et al., 2014).

En cuanto a los mecanismos que pueden regular los niveles de SALL2, se han descrito varios como, por ejemplo: Epigenéticos (Ye et al., 2019), transcripcionales (Farkas et al., 2013), traduccionales (Huang et al., 2023) y post-traduccionales (tesis doctorado Viviana Hermosilla, 2017), sin embargo, la única evidencia experimental que existe de una posible regulación SALL2 por la vía Wnt es la identificada en esa tesis.

Como se mencionó anteriormente la presencia de sitios de unión a TCF/LEF en el promotor de *SALL2* sugiere una regulación transcripcional (Kelbermann et al., 2014). Sin embargo, como los activadores utilizados; CHIR99021 y LiCl, actúan inhibiendo a GSK3- β otro posible mecanismo es regulación post-traduccional. Datos no publicados del laboratorio demuestran que caseína quinasa 2 (CK2) fosforila a SALL2 y afecta su estabilidad por degradación proteosómica (tesis doctorado Viviana Hermosilla, 2017). Adicionalmente, ha sido reportado que CK2 y GSK3- β tienen sustratos en común y que pueden modificar la estabilidad de sus sustratos en conjunto (Gowda et al., 2017). En este contexto, una búsqueda bioinformática previa estableció que SALL2 tiene múltiples sitios

putativos de fosforilación para CK2 y GSK3- β . Específicamente, los sitios putativos para GSK3- β corresponderían a los residuos S299 y T303 (tesis doctorado Viviana Hermosilla, 2017). Por este motivo queda pendiente estudiar la relación entre SALL2 y GSK3- β , determinar si estas proteínas interactúan y si GSK3- β logra fosforilar a SALL2 *in vitro*.

Utilizar el sobrenadante de L-WRN, medio condicionado enriquecido en ligandos WNT3A, R-Spondina y Noggin, agonistas de la vía a nivel de los receptores Frizzled y LGR5 (Vandussen et al., 2019), nos permitió estudiar si la vía Wnt independiente de GSK3- β , induce la expresión de SALL2. Observamos una cinética de expresión de SALL2 similar a la del tratamiento con los inhibidores de GSK-3 β , con un incremento de sus niveles a las 4 horas. Estos datos permiten hipotetizar que SALL2 es regulado por la vía Wnt, independiente de GSK3- β , pero no permiten descartar que el mecanismo involucrado en esta regulación sea transcripcional y/o post-traducciona.

En conclusión, consistentemente con una proteína supresora tumoral, los resultados expuestos en esta tesis permiten confirmar la disminución significativa de los niveles de SALL2 hacia la progresión del cáncer de colon en muestras humanas provenientes de pacientes chilenos. De gran importancia, este estudio, ha caracterizado la localización de la proteína SALL2 en el tejido de colon por primera vez, encontrándose presente en células epiteliales y mayormente en células del estroma. Esto, permitirá enfocar estudios funcionales de SALL2 a este tipo de células, y a como la pérdida de su función contribuye a la progresión de la patología. Además, se validó a *AXIN2* como un nuevo blanco transcripcional de SALL2, lo que lo sitúa como un regulador negativo de la vía Wnt. Nuestros estudios con muestras de pacientes e *in vitro* sugieren que la pérdida de SALL2 en CCR, se correlaciona con un aumento de β -catenina nuclear, lo que podría ser mediado por la pérdida de regulación negativa de la vía por *AXIN2*.

En los últimos años *AXIN2* se ha vuelto un blanco terapéutico atractivo en un contexto genético en donde *APC* se encuentra mutado. (Stakheev et al., 2019; Thorvaldsen et al., 2017; Waaler et al., 2012; Wu et al., 2016a). Mecanísticamente las proteínas *AXIN1/2* son constitutivamente degradadas por Tankyrasa, una ADP-ribosilasa. Por este motivo, se ha propuesto inhibir las Tankyrasas para estabilizar a *AXIN2*, generando una fuerte inhibición de la vía Wnt. En nuestro estudio observamos que la presencia de SALL2 en células SW480 correlaciona con una mayor respuesta antiproliferativa y de muerte frente a XAV939 comparado a células que no expresan SALL2. Esto sugiere que SALL2 favorece

o potencia el efecto del inhibidor de la vía Wnt. Considerando un estudio que demuestra que XAV939 induce apoptosis en células SW480, generando sensibilidad de las células frente al tratamiento con 5-Fluoracilo o Cisplatino (Wu et al., 2016a) queda pendiente evaluar la dependencia de SALL2 en el proceso de apoptosis usando terapias combinadas de XAV939 con agentes quimioterapéuticos como 5-FU u Oxaliplatino/Cisplatino (**Anexo 7 y 8**). Entonces, se espera que futuros estudios puedan determinar si el eje SALL2-AXIN2 identificado en este proyecto, incrementa la quimiosensibilidad a 5-FU en células de CCR, mejorando la sobrevida de los pacientes con la patología.

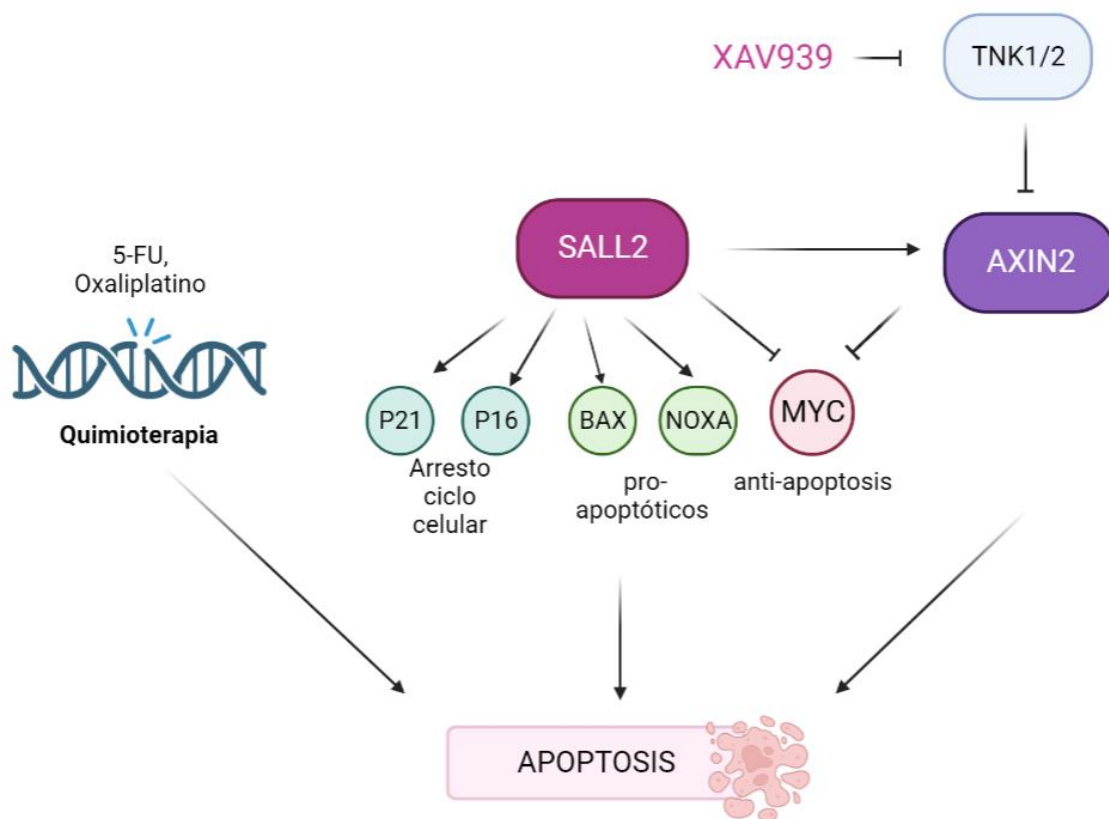


Figura 45: Proyección del estudio: Sensibilización al proceso de apoptosis por agentes quimioterapéuticos (5-FU o Oxaliplatino) en células *SALL2*^{+/+} frente a la inducción de expresión de ARN mensajero de *AXIN2* y posterior estabilización post-traducciona de *AXIN2* usando inhibidores de la tankyrasa (XAV939). Fuente: Propia.

9. CONCLUSIONES:

OBJETIVO 1:

- SALL2 se expresa en el tejido humano normal de colon, con una localización nuclear y citoplasmática. Específicamente, se encuentra expresado en las glándulas y en el estroma. Durante la progresión del cáncer de colon, desde adenoma hacia carcinoma invasor la expresión de SALL2 se va perdiendo. Se ve disminuida la intensidad y número de células con localización nuclear o citoplasmática.
- La expresión de SALL2 en la cripta de Lieberkühn se concentra principalmente en el estroma que bordea la base, correspondiendo al nicho de células madre. Específicamente, corresponderían a células de estirpe fibroblastos.
- Existe una relación negativa entre la expresión de SALL2 - permeación linfovascular, y β -catenina nuclear en el frente migratorio en tejidos de cáncer de colon humanos.
- En el grupo de CCR SALL2+, esta proteína se encuentra mayoritariamente en el estroma, específicamente en macrófagos M1.
- Existe una tendencia de mayor sobrevida en pacientes SALL2+ respecto a aquellos SALL2-.

OBJETIVO 2:

- Existe una relación negativa entre los niveles nucleares de β -catenina y SALL2. Además, existe una relación positiva entre SALL2 y reguladores negativos de la vía como *FBXW7-11*, *AXIN2* y *ARID1A-B*. Por lo que SALL2 estaría actuando como un regulador negativo de la vía Wnt.
- SALL2 incrementa sus niveles proteicos a nivel nuclear en presencia de agonistas como L-WRN, CHIR99021 o LiCl, indicando que es regulado positivamente a tiempos tempranos de activación de la vía. Lo que corresponde a la clásica respuesta de genes reguladores negativos de la vía.

OBJETIVO 3:

- SALL2 se une al promotor de *AXIN2*, activa la actividad transcripcional, incrementando los niveles de ARNm y proteína, tanto en condiciones basales, como en presencia de CHIR99021 o LiCl.
- La estabilización de *AXIN2*, usando el inhibidor de tankyrasas XAV939, disminuye la proliferación y aumenta la respuesta de muerte celular en modelos CCR de manera dependiente de SALL2.

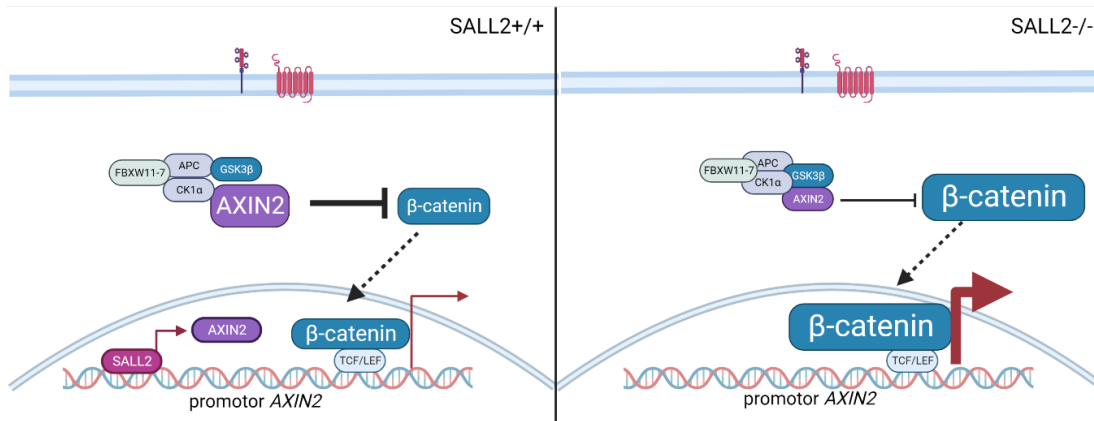


Figura 46: Modelo Final: SALL2 induce la expresión del regulador negativo de la vía AXIN2, disminuyendo los niveles nucleares del activador de la vía Wnt, β -catenina. **Izquierda:** Células que expresan SALL2, tendrían menores niveles de β -catenina nuclear. SALL2 se uniría al promotor de *AXIN2*, induciendo su transcripción y aumentando los niveles proteicos del regulador negativo de la vía. **Derecha:** En cambio, en células *SALL2*^{-/-}, la regulación de *AXIN2* por SALL2 se pierde, lo que se traduce en un incremento de los niveles de β -catenina nuclear.

10.AGRADECIMIENTOS:

-Primero, quisiera agradecer a mi tutora, la Dra. Roxana Pincheira y Laboratorio de Transducción de Señales y Cáncer por el apoyo y la confianza durante todos estos años, especialmente en el difícil contexto vivido desde octubre 2019 y la pandemia COVID-19. Al Dr. Ariel Castro, que a pesar de no ser mi tutor siempre ha estado dispuesto a cooperar con mi proyecto.

-A los proyectos FONDECYT N° 1191172 de la doctora Roxana Pincheira y FONDECYT N° 1201215 del doctor Ariel Castro.

- También quiero agradecer al financiamiento estatal de mis estudios, gracias a la beca ANID Doctorado Nacional, folio 21181183 y a la dirección de postgrado de la Universidad de Concepción por financiar el décimo semestre del programa.

-A la beca UCO1866, por los fondos obtenidos para poder asistir al congreso 34th ENA 2022), Barcelona, España.

-Al Hospital Guillermo Grant Benavente, especialmente a la Dra. Carolina Delgado y Silvia Vidal, por todo el apoyo y ayuda para permitir utilizar las dependencias de la Unidad de Anatomía Patológica. También a MSc. BQ. Susana Pineda y todo su equipo por sus palabras de ánimo y por permitirme usar Laboratorio Diagnóstico Clínico Molecular cuando lo necesité.

-Al Dr. Matías Hepp, por abrir las puertas del Laboratorio de Ciencias Biomédicas, Universidad Católica Santísima Concepción.

-A la Fundación Arturo López Pérez y especialmente al Dr. Franz Villarroel por todo el conocimiento transferido y la disposición a ayudarnos.

- Agradezco también a los profesores que iniciaron como parte de mi comisión, al Dr. Giancarlo De Ferrari (Q.E.P.D) y Dr. Juan Pablo Henríquez por todas sus buenas ideas y discusiones científicas. También a la Dra. Violeta Morín por todo su apoyo y a mi comisión actual (Dra. Vivina Torres y Dra. Carmen Ili) por acceder a revisar y acompañarme en esta etapa final.

-Finalmente y lo más importante a Dios, mis familia y pareja, que fueron mi sostén y apoyo incondicional con todo lo que significa hacer un doctorado.

11.REFERENCIAS:

- Ahmad Fauzi, M. F., Wan Ahmad, W. S. H. M., Jamaluddin, M. F., Lee, J. T. H., Khor, S. Y., Looi, L. M., Abas, F. S., & Aldahoul, N. (2022). Allred Scoring of ER-IHC Stained Whole-Slide Images for Hormone Receptor Status in Breast Carcinoma. *Diagnostics*, *12*(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12123093>
- Al-Mulla, F., AlFadhli, S., Al-Hakim, A. H., Going, J. J., & Bitar, M. S. (2006). Metastatic recurrence of early-stage colorectal cancer is linked to loss of heterozygosity on chromosomes 4 and 14q. *Journal of Clinical Pathology*, *59*(6), 624–630. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.033167>
- Álvarez, C., Quiroz, A., Benítez-Riquelme, D., Pincheira, R., Riffo, E., & Castro, A. F. (2021). SALL proteins; common and antagonistic roles in cancer. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13246292>
- Bao, R., Christova, T., Song, S., Angers, S., Yan, X., & Attisano, L. (2012). Inhibition of Tankyrases Induces Axin Stabilization and Blocks Wnt Signalling in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, *7*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048670>
- Bernkopf, D. B., Brückner, M., Hadjihannas, M. V., & Behrens, J. (2019). An aggregon in conductin/axin2 regulates Wnt/ β -catenin signaling and holds potential for cancer therapy. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12203-8>
- Beumer, J., Puschhof, J., Yengej, F. Y., Zhao, L., Martinez-Silgado, A., Blotenburg, M., Begthel, H., Boot, C., van Oudenaarden, A., Chen, Y. G., & Clevers, H. (2022). BMP gradient along the intestinal villus axis controls zoned enterocyte and goblet cell states. *Cell Reports*, *38*(9), 110438. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110438>
- Cereceda, K., Bravo, N., Jorquera, R., Gonz, R., & Villarroel-esp, F. (2022). Simultaneous and Spatially-Resolved Analysis of T-Lymphocytes, Macrophages and PD-L1 Immune Checkpoint in Rare Cancers. *Cancer*, *14*, 1–14.
- Chen, M., Li, L., & Zheng, P. (2019). SALL4 promotes the tumorigenicity of cervical cancer cells through activation of the Wnt/ β -catenin pathway via CTNNB1. *Cancer Science*, *110*(9), 2794–2805. <https://doi.org/10.1111/cas.14140>
- Clevers, H. C., & Bevins, C. L. (2013). Paneth cells: Maestros of the small intestinal crypts. *Annual Review of Physiology*, *75*, 289–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol->

- Colozza, G., Park, S. Y., & Koo, B. K. (2022). Clone wars: From molecules to cell competition in intestinal stem cell homeostasis and disease. *Experimental and Molecular Medicine*, 54(9), 1367–1378. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00854-5>
- Cotran., Robbins., Kumar, V. (2010). *Patología Estructural y Funcional* (El sevier (ed.); 8va ed.).
- Dedeurwaerdere, F., Claes, K. B., Van Dorpe, J., Rottiers, I., Van der Meulen, J., Breyne, J., Swaerts, K., & Martens, G. (2021). Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91974-x>
- DeVito, N. C., Sturdivant, M., Thievanthiran, B., Xiao, C., Plebanek, M. P., Salama, A. K. S., Beasley, G. M., Holtzhausen, A., Novotny-Diermayr, V., Strickler, J. H., & Hanks, B. A. (2021). Pharmacological Wnt ligand inhibition overcomes key tumor-mediated resistance pathways to anti-PD-1 immunotherapy. *Cell Reports*, 35(5), 109071. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109071>
- Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Campos, T., Sodik, N. M., Morales, M., Álvarez, C. I., Swigart, L., Evan, G. I., Gutiérrez, J. L., & Nishinakamura, R. (2015). Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin. *Cell Death and Disease*, 1816(6), 1–14. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.165>
- Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Campos, T., Sodik, N. M., Morales, M., Álvarez, C. I., Swigart, L., Evan, G. I., Gutiérrez, J. L., Nishinakamura, R., Castro, a F., & Pincheira, R. (2015). Sall2 is required for proapoptotic Noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin. *Cell Death and Disease*, 6(7), e1816. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.165>
- ESMO. (2022). *FDA Grants Accelerated Approval to Adagrasib for KRAS G12C-Mutated NSCLC*. Oncology News.
- Farkas, C., Martins, C. P., Escobar, D., Hepp, M. I., Donner, D. B., Castro, A. F., Evan, G., Gutiérrez, J. L., Warren, R., & Pincheira, R. (2013). Wild Type p53 Transcriptionally Represses the SALL2 Transcription Factor under Genotoxic Stress. *PLoS ONE*, 8(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073817>

- Farkas, C., Quiroz, A., Alvarez, C., Hermosilla, V., Aylwin, C. F., Lomniczi, A., Castro, A. F., Hepp, M. I., & Pincheira, R. (2021). Characterization of SALL2 Gene Isoforms and Targets Across Cell Types Reveals Highly Conserved Networks. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.613808>
- Fu, F., Deng, Q., Li, R., Wang, D., Yu, Q. X., Yang, X., Lei, T. Y., Han, J., Pan, M., Zhen, L., Li, J., Li, F. T., Zhang, Y. L., Li, D. Z., & Liao, C. (2020). AXIN2 gene silencing reduces apoptosis through regulating mitochondria-associated apoptosis signaling pathway and enhances proliferation of ESCs by modulating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(1), 418–427. https://doi.org/10.26355/eurrev_202001_19940
- Galli, C., Piemontese, M., Lumetti, S., Manfredi, E., Macaluso, G. M., & Passeri, G. (2013). GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 24(8), 921–927. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02488.x>
- Gao, Z. H., Lu, C., Wang, M. X., Han, Y., & Guo, L. J. (2014). Differential β -catenin expression levels are associated with morphological features and prognosis of colorectal cancer. *Oncology Letters*, 8(5), 2069–2076. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2433>
- Gjorevski, N., & Ordóñez-Morán, P. (2017). Intestinal Stem Cell Niche Insights Gathered from Both in Vivo and Novel in Vitro Models. In *Stem Cells International* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/8387297>
- Gowda, C., Soliman, M., Kapadia, M., Ding, Y., Payne, K., & Dovat, S. (2017). Casein Kinase II (CK2), Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) and Ikaros mediated regulation of leukemia. *Advances in Biological Regulation*, 65, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.06.001>
- Gujral, T. S., & Macbeath, G. (2010). A system-wide investigation of the dynamics of wnt signaling reveals novel phases of transcriptional regulation. *PLoS ONE*, 5(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010024>
- Hermosilla, V. (2017). *Regulación post-traducional del factor de transcripción SALL2 por Caseína Quinasa II*. Tesis Doctorado Ciencias Biológicas mención en Biología Celular y Molecular.

- Hermosilla, V., Hepp, M., Escobar, D., Farkas, C., Riffo, E., Castro, A. F., & Pincheira, R. (2017). Developmental SALL2 transcription factor; a new player in cancer. *Carcinogenesis*, 2, 1–40. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx036>
- Hermosilla, V., Salgado, G., & Riffo, E. (2018). SALL2 represses cyclins D1 and E1 expression, and restrains G1/S cell cycle transition and cancer-related phenotype. *Molecular Oncology*, 12(7), 1026–1046. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12308>
- Huang, J., Guo, X., Li, W., & Zhang, H. (2017). Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep40716>
- Huang, S. M. A., Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. A., Charlat, O., Wiellette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., Hild, M., Shi, X., Wilson, C. J., Mickanin, C., Myer, V., Fazal, A., Tomlinson, R., Serluca, F., Shao, W., ... Cong, F. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*, 461(7264), 614–620. <https://doi.org/10.1038/nature08356>
- Huang, R., Yamamoto T., Nakata T., Ozaki T., Kurozumi H., Wei F. (2023) CDKAL1 Drives the Maintenance of Cancer Stem-Like Cells by Assembling the eIF4F Translation initiation Complex. 42(7), 1-17 DOI: 10.1002/adv.202206542
- Karantzali, E., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., Hatzopoulos, A. K., & Kretsovali, A. (2008). Histone deacetylase inhibition accelerates the early events of stem cell differentiation: Transcriptomic and epigenetic analysis. *Genome Biology*, 9(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r65>
- Kelberman, D., Islam, L., Lakowski, J., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., Patel, A., Stupka, E., Buck, A., Wolf, S., Beales, P. L., Jacques, T. S., Bitner-Glindzicz, M., Liasis, A., Lehmann, O. J., Kohlhase, J., Nischal, K. K., & Sowden, J. C. (2014). Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(10), 2511–2526. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt643>
- Kim, D., Koh, B., Kim, K. R., Kim, K. Y., Jung, W. H., Kim, H. Y., Kim, S., & Rhee, S. D. (2019). Anticancer effect of xav939 is observed by inhibiting lactose dehydrogenase a in a 3-dimensional culture of colorectal cancer cells. *Oncology Letters*, 18(5), 4858–4864. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10813>

- Kim, S., & Jeong, S. (2019). Mutation hotspots in the β -catenin gene: Lessons from the human cancer genome databases. *Molecules and Cells*, *42*(1), 8–16. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0436>
- Kullmann, F., Strissel, P. L., Strick, R., Stoehr, R., Eckstein, M., Bertz, S., Wullich, B., Sikic, D., Wach, S., Taubert, H., Olbert, P., Heers, H., Lara, M. F., Macias, M. L., Matas-Rico, E., Lozano, M. J., Prieto, D., Hierro, I., van Doeveren, T., ... Weyerer, V. (2023). Frequency of microsatellite instability (MSI) in upper tract urothelial carcinoma: comparison of the Bethesda panel and the Idylla MSI assay in a consecutively collected, multi-institutional cohort. *Journal of Clinical Pathology*, *76*(2), 126–132. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207855>
- Kundu, A., Sen, A., Choudhury, S., Mandal, T. K., Guha, D., & Lahiry, S. (2021). Immunohistochemical analysis of beta-catenin expression: a probable prognostic marker and potential therapeutic target in renal cell carcinoma. *Medicine and Pharmacy Reports*, *94*(1), 65–72. <https://doi.org/10.15386/mpr-1767>
- Li, D., Tian, Y., Ma, Y., & Benjamin, T. (2004). p150^{Sal2} Is a p53-Independent regulator of p21. *Society*, *24*(9), 3885–3893. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.9.3885>
- Li, J., Guo, B. C., Sun, L. R., Wang, J. W., Fu, X. H., Zhang, S. Z., Poston, G., & Ding, K. F. (2014). TNM staging of colorectal cancer should be reconsidered by T stage weighting. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(17), 5104–5112. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i17.5104>
- Li, X., Li, Y., Liu, G., & Wu, W. (2021). New insights of the correlation between AXIN2 polymorphism and cancer risk and susceptibility: evidence from 72 studies. *BMC Cancer*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08092-0>
- Loh, J. J., & Ma, S. (2021). The Role of Cancer-Associated Fibroblast as a Dynamic Player in Mediating Cancer Stemness in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.727640>
- Luo, S., Yang, G., Ye, P., Cao, N., Chi, X., Yang, W. H., & Yan, X. (2022). Macrophages Are a Double-Edged Sword: Molecular Crosstalk between Tumor-Associated Macrophages and Cancer Stem Cells. *Biomolecules*, *12*(6), 1–35. <https://doi.org/10.3390/biom12060850>
- Ma, T., Shi, S., Jiang, H., Chen, X., Xu, D., Ding, X., Zhang, H., & Xi, Y. (2021). A pan-

- cancer study of spalt-like transcription factors 1/2/3/4 as therapeutic targets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 711. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109016>
- Ma, X., Zhao, X., Yan, W., Yang, J., Zhao, X., Zhang, H., Hui, Y., & Zhang, S. (2018). Tumor-infiltrating lymphocytes are associated with β -catenin overexpression in breast cancer. *Cancer Biomarkers*, 21(3), 639–650. <https://doi.org/10.3233/CBM-170708>
- Mario Palma. (2019). *NUAK1 y cáncer: elucidando los mecanismos moleculares involucrados en la regulación y función de la quinasa NUAK1*. <http://repositorio.udec.cl/xmlui/handle/11594/1000> Tesis Doctorado Ciencias Biológicas mención en Biología Celular y Molecular.
- Mazzoni, S., & Eric, F. (2014). AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers. *Cancer Letters*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nature08365>.Reconstructing
- Mei, K., Liu, A., Allan, R. W., Wang, P., Lane, Z., Abel, T. W., Wei, L., Cheng, H., Guo, S., Peng, Y., Rakheja, D., Wang, M., Ma, J., Rodriguez, M. M., Li, J., & Cao, D. (2009). Diagnostic utility of SALL4 in primary germ cell tumors of the central nervous system: A study of 77 cases. *Modern Pathology*, 22(12), 1628–1636. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.148>
- Navarrete, J., Caro, N., Guía, P., Jacqueline, R., & Barrera, P. (2022). *"Regulación de SALL2 sobre genes asociados a la vía de señalización Wnt β -catenina en Cáncer"*. Tesis pregrado Bioingeniería.
- Neiheisel, A., Kaur, M., Ma, N., Havard, P., & Shenoy, A. K. (2022). Wnt pathway modulators in cancer therapeutics: An update on completed and ongoing clinical trials. *International Journal of Cancer*, 150(5), 727–740. <https://doi.org/10.1002/ijc.33811>
- Nie, X., Liu, H., Liu, L., Wang, Y. D., & Chen, W. D. (2020). Emerging Roles of Wnt Ligands in Human Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10(August), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01341>
- Norum, J. H., Skarpen, E., Brech, A., Kuiper, R., Waaler, J., Krauss, S., & Sørli, T. (2018). The tankyrase inhibitor G007-LK inhibits small intestine LGR5+ stem cell proliferation without altering tissue morphology. *Biological Research*, 51(1). <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0151-6>
- Olivares-Hernández, A., del Barco Morillo, E., Miramontes-González, J. P., Figuero-Pérez,

- L., Pérez-Belmonte, L., Martín-Vallejo, J., Martín-Gómez, T., Escala-Cornejo, R., Vidal-Tocino, R., Hernández, L. B., Sarmiento, R. G., de la Cruz, M. D. L., Cruz-Hernández, J. J., & Pérez, C. P. (2022). Immunohistochemical Assessment of the P53 Protein as a Predictor of Non-Small Cell Lung Cancer Response to Immunotherapy. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 27(3). <https://doi.org/10.31083/j.fbl2703088>
- Onai, T., Sasai, N., Matsui, M., & Sasai, Y. (2004). Xenopus Xsa1F: Anterior Neuroectodermal Specification by Attenuating Cellular Responsiveness to Wnt Signaling. *Developmental Cell*, 7, 95–106.
- Osawa, H., Takahashi, H., Nishimura, J., Ohta, K., Haraguchi, N., Hata, T., Yamamoto, H., Mizushima, T., Takemasa, I., Doki, Y., & Mori, M. (2016). Full-length LGR5-positive cells have chemoresistant characteristics in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 114(11), 1251–1260. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.112>
- Otero, L., Lacunza, E., Vasquez, V., Arbelaez, V., Cardier, F., & González, F. (2019). Variations in AXIN2 predict risk and prognosis of colorectal cancer. *BDJ Open*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41405-019-0022-z>
- Parroche, P., Touka, M., Mansour, M., Bouvard, V., Thépot, A., Accardi, R., Carreira, C., Roblot, G. G., Sylla, B. S., Hasan, U., & Tommasino, M. (2011). Human papillomavirus type 16 E6 inhibits p21(WAF1) transcription independently of p53 by inactivating p150(Sal2). *Virology*, 417(2), 443–448. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.016>
- Parslow, T. G., Adsay, N. V., Krasinskas, A. M., & Roback, J. D. (2017). Impacts of New Concepts and Technologies on the Practice of Diagnostic Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(3), 325–328. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0357-ED>
- Pasini, D., Malatesta, M., Jung, H. R., Walfridsson, J., Willer, A., Olsson, L., Skotte, J., Wutz, A., Porse, B., Jensen, O. N., & Helin, K. (2010). Characterization of an antagonistic switch between histone H3 lysine 27 methylation and acetylation in the transcriptional regulation of Polycomb group target genes. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 4958–4969. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq244>
- Pastor, D. M., & Schlom, J. (2021). Immunology of Lynch Syndrome. *Current Oncology Reports*, 23(8), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01085-z>
- Peduto, L., Sansonetti, P. J., & Nigro, G. (2018). Intestinal Stem Cells and Their Niche at

- Homeostasis and Under Stress. In *Intestinal Stem Cell Niche* (1st ed., Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.asn.2017.12.002>
- Pincheira, R., Baerwald, M., Dunbar, J. D., & Donner, D. B. (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO Journal*, *28*(3), 261–273. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.274>
- Ram, S., Vizcarra, P., Whalen, P., Deng, S., Painter, C. L., Jackson-Fisher, A., Pirie-Shepherd, S., Xia, X., & Powell, E. L. (2021). Pixelwise H-score: A novel digital image analysis-based metric to quantify membrane biomarker expression from immunohistochemistry images. *PLoS ONE*, *16*(9 September), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245638>
- Ratajczak-Wielgomas, K., Grzegorzolka, J., Piotrowska, A., Matkowski, R., Wojnar, A., Rys, J., Ugorski, M., & Dziegiel, P. (2017). Expression of periostin in breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, *51*(4), 1300–1310. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4109>
- Rennoll, S. (2014). Nuclear AXIN2 represses MYC gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.089>. Nuclear
- Riffo, E., Palma, M., Hepp, M. I., Benítez-Riquelme, D., Torres, V. A., Castro, A. F., & Pincheira, R. (2022). The Sall2 transcription factor promotes cell migration regulating focal adhesion turnover and integrin β 1 expression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1031262>
- Rim, E. Y., Clevers, H., & Nusse, R. (2022). *The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-040320>
- Ring, A., Kim, Y. M., & Kahn, M. (2014). Wnt/Catenin Signaling in Adult Stem Cell Physiology and Disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, *10*(4), 512–525. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9515-2>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, *43*(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Ross, P. (2008). *Histología* (Editorial Panamericana (ed.); 3ra ed., pp. 13–19).
- Sato, T., Van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., Van Den Born, M., Barker,

- N., Shroyer, N. F., Van De Wetering, M., & Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*(7330), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature09637>
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., Van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Stakheev, D., Taborska, P., Strizova, Z., Podrazil, M., Bartunkova, J., & Smrz, D. (2019). The WNT/ β -catenin signaling inhibitor XAV939 enhances the elimination of LNCaP and PC-3 prostate cancer cells by prostate cancer patient lymphocytes in vitro. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41182-5>
- Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007898>
- Sung. (2011). Transcriptional and post-translational regulation of the quiescence factor and putative tumor suppressor p150(Sal2). *FASEB J.*, *25*(4), 1275-83.
- Sung, C. K., Li, D., Andrews, E., Drapkin, R., & Benjamin, T. (2013). Promoter methylation of the SALL2 tumor suppressor gene in ovarian cancers. *Molecular Oncology*, *7*(3), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.11.005>
- Sung, C. K., Yim, H., Gu, H., Li, D., Andrews, E., Duraisamy, S., Li, C., Drapkin, R., & Benjamin, T. (2012). The Polyoma Virus Large T Binding Protein p150 Is a Transcriptional Repressor of c-MYC. *PLoS ONE*, *7*(9), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046486>
- Suvà, M. L., Rheinbay, E., Gillespie, S. M., Patel, A. P., Wakimoto, H., Rabkin, S. D., Riggi, N., Chi, A. S., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Rivera, M. N., Rossetti, N., Kasif, S., Beik, S., Kadri, S., Tirosh, I., Wortman, I., ... Bernstein, B. E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, *157*(3), 580–594. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.030>
- Suwinska, A., & Ciemerych, M. A. (2011). Factors Regulating Pluripotency and Differentiation in Early Mammalian Embryos and Embryo-derived Stem Cells. In *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 87). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978->

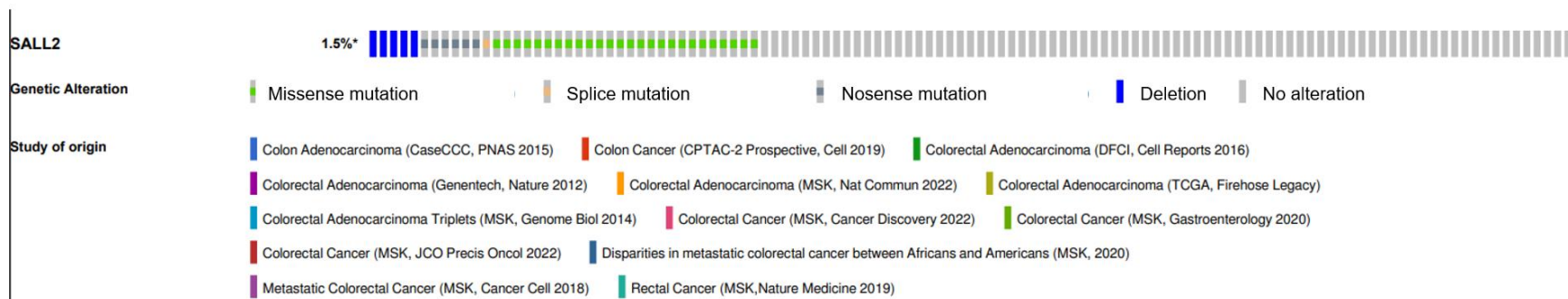
- Tapia-Rojas, C., Schüller, A., Lindsay, C. B., Ureta, R. C., Mejías-Reyes, C., Hancke, J., Melo, F., & Inestrosa, N. C. (2015). Andrographolide activates the canonical Wnt signalling pathway by a mechanism that implicates the non-ATP competitive inhibition of GSK-3 β : Autoregulation of GSK-3 β in vivo. *Biochemical Journal*, *466*, 415–430. <https://doi.org/10.1042/BJ20140207>
- Thorvaldsen, T. E., Pedersen, N. M., Wenzel, E. M., & Stenmark, H. (2017). Differential roles of AXIN1 and AXIN2 in tankyrase inhibitor-induced formation of degradasomes and β -catenin degradation. *PLoS ONE*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170508>
- Ukkola, I., Nummela, P., Pasanen, A., Kero, M., Lepistö, A., Kytölä, S., Bützow, R., & Ristimäki, A. (2021). Detection of microsatellite instability with Idylla MSI assay in colorectal and endometrial cancer. *Virchows Archiv*, *479*(3), 471–479. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03082-w>
- Vandussen, K. L., Sonnek, N. M., & Stappenbeck, T. S. (2019). *L-WRN conditioned medium for gastrointestinal epithelial stem cell culture shows replicable batch-to-batch activity levels across multiple research teams*. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101430>. L-WRN
- Vasileiou, G., Ekici, A. B., Uebe, S., Zweier, C., Hoyer, J., Engels, H., Behrens, J., Reis, A., & Hadjihannas, M. V. (2015). Chromatin-Remodeling-Factor ARID1B Represses Wnt/ β -Catenin Signaling. *American Journal of Human Genetics*, *97*(3), 445–456. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.08.002>
- Villarroel-Espindola, F., Xiaoqing, Y., Illa, D., & Nikita, M. (2017). Spatially resolved and quantitative analysis of VISTA/PD-1H as a novel immunotherapy target in human non-small cell lung cancer. *Physiology & Behavior*, *176*(5), 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.03.072>. Cortical
- Waalder, J., Machon, O., Tumova, L., Dinh, H., Korinek, V., Wilson, S. R., Paulsen, J. E., Pedersen, N. M., Eide, T. J., Machonova, O., Gradl, D., Voronkov, A., Von Kries, J. P., & Krauss, S. (2012). A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Research*, *72*(11), 2822–2832. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11->

- Wang, W., Liu, P., Lavrijsen, M., Li, S., Zhang, R., Li, S., van de Geer, W. S., van de Werken, H. J. G., Peppelenbosch, M. P., & Smits, R. (2021). Evaluation of AXIN1 and AXIN2 as targets of tankyrase inhibition in hepatocellular carcinoma cell lines. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87091-4>
- Wang, Z., Tacchelly-Benites, O., Yang, E., & Ahmed, Y. (2016). Dual Roles for Membrane Association of Drosophila Axin in Wnt Signaling. *PLoS Genetics*, 12(12), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006494>
- Wu, S., Zheng, S. Di, Huang, H. L., Yan, L. C., Yin, X. F., Xu, H. N., Zhang, K. J., Gui, J. H., Chu, L., & Liu, X. Y. (2013). Lithium down-regulates histone deacetylase 1 (HDAC1) and induces degradation of mutant huntingtin. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49), 35604–35616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.479865>
- Wu, X., Luo, F., Li, J., Zhong, X., & Liu, K. (2016a). Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1333–1340. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3360>
- Wu, X., Luo, F., Li, J., Zhong, X., & Liu, K. (2016b). Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 48(4), 1333–1340. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3360>
- Wu, Z., Cheng, K., Shi, L., Li, Z., Negi, H., Gao, G., Kamle, S., & Li, D. (2015). Sal-like protein 2 upregulates p16 expression through a proximal promoter element. *Cancer Science*, 106(3), 253–261. <https://doi.org/10.1111/cas.12606>
- Ye, L., Lin, C., Wang, X., Li, Q., Li, Y., Wang, M., Zhao, Z., Wu, X., Shi, D., Xiao, Y., Ren, L., Jian, Y., Yang, M., Ou, R., Deng, G., Ouyang, Y., Chen, X., Li, J., & Song, L. (2019). Epigenetic silencing of SALL 2 confers tamoxifen resistance in breast cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 11(12). <https://doi.org/10.15252/emmm.201910638>
- Zhang, R., Yu, S., Shen, Q., Zhao, W., Zhang, J., Wu, X., Zhu, Z., Wu, X., Li, N., Peng, S., & Hua, J. (2021). AXIN2 reduces the survival of porcine induced pluripotent stem cells (PiPSCs). In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312954>

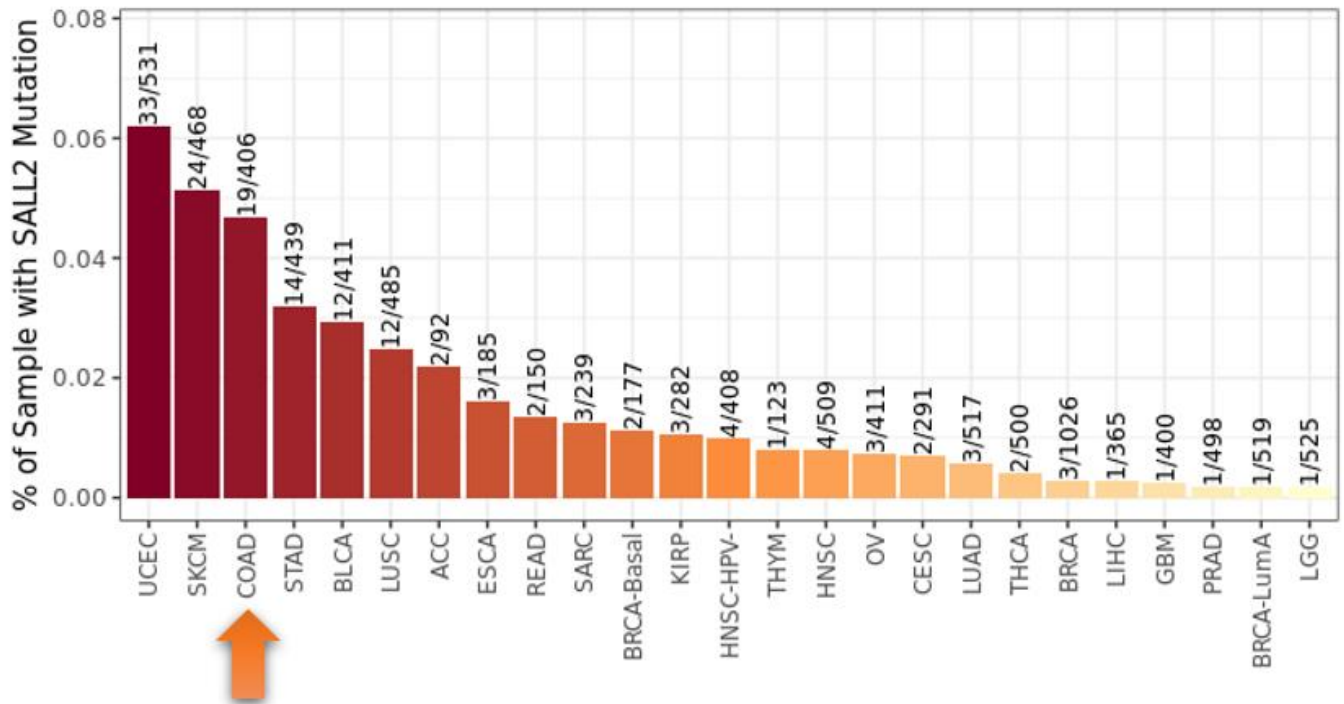
Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology and Oncology*, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3>

Zhu, G., Hu, J., & Xi, R. (2021). The cellular niche for intestinal stem cells: a team effort. *Cell Regeneration*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13619-020-00061-5>

12.ANEXOS



Anexo 1: SALL2 se encuentra mutado en un 1,5% de muestras de CCR (Cbioportal). Análisis de OncoPrint en Cbioportal (<https://www.cbioportal.org/>). Entre las alteraciones genéticas se encuentran deleciones (azul), mutaciones de sentido erróneo (verde) y mutaciones sin sentido (plomo).



Anexo 2: Análisis de frecuencias de mutaciones de *SALL2* en diferentes cánceres (TIMER 2.0). Histograma mostrando frecuencias de mutaciones de *SALL2* en diferentes cáncer usando TIMER 2.0 (<http://timer.cistrome.org/>). En primer lugar, el cáncer con mayor frecuencia (33 de 531 muestras) es Carcinoma Endometrial del Cuerpo Uterino (UCEC), luego le sigue (24 de 468 muestras) el Melanoma maligno (SKCM) y en tercer lugar se encontraría el cáncer de colon (COAD) (19/ 406 muestras).



UNIDAD DE INVESTIGACION Y DESARROLLO.
INT. N°49 06.07.2020

ING. RSE

002335 13.07.2020

ORD. N° / _____

Ant: Trabajo de Investigación

Mat: Autorización Estudio.

Código 20-03-12

**DE: SR. CARLOS CAPURRO DUPRE
DIRECTOR HOSP.GMO.GRANT B.**

**A : SRA. ARACELLY QUIROZ LAGOS
INVESTIGADORA RESPONSABLE**

Junto con saludar, sírvase encontrar adjunto Acta de aprobación del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, de fecha 23.06.2020 en atención a la cual esta Dirección autoriza el desarrollo del estudio titulado; "Asociación de SALL2 y vía Wnt/13-catenina en Cáncer de Colon", bajo su responsabilidad como investigador responsable en este centro.

Cabe hacer mención, que el artículo 11 de la ley 20.120 no aplica, por tener una dispensa del documento de Consentimiento Informado aprobado por el CEC del Servicio del Salud Concepción.

Saluda atentamente,



**SR. CARLOS CAPURRO DUPRE
DIRECTOR
HOSPITAL GUILLERMO GRANT BENAVENTE**

Distribución
TM. Aracelly Quiroz
SDM
Jefe CR Diag. terapéutico
O. Partes
Archivo

Anexo 3: Acta de aprobación de estudio otorgado por el Comité Ético-Científico del Servicio de Salud Concepción.

Concepción, 14 de abril de 2020

INFORME COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD

Comité de Ética y Bioseguridad Secretaría de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción	PROYECTO	Tesis Doctoral
	TÍTULO	"Asociación de SALL2 y vía Wnt/ β -catenina en Cáncer de Colon "
	INVESTIGADOR PRINCIPAL	Srta. Aracelly Quiroz Investigador Responsable: Roxana Pincheira

A solicitud de la Srta. Aracelly Quiroz, se recibe documento (adjunto) con precisiones a la metodología incluida en la postulación al Proyecto Tesis Doctoral antes mencionado, solicitando que este Comité emita una carta de aprobación.

El documento ha sido analizado de acuerdo a las recomendaciones del "Manual de Bioseguridad" editado por CONICYT en 2018.

Los estudios serán desarrollados en el LABORATORIO TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y CÁNCER de nuestra Facultad, donde se encuentran disponibles tanto las facilidades como el equipamiento necesario para este tipo de estudios. El estudio se llevará a cabo considerando los requerimientos de manejo y eliminación de desechos de este material, de acuerdo al citado "Manual de Bioseguridad".

Cabe mencionar que nuestra Facultad cuenta con los servicios de la Unidad de Seguridad MATPEL (www2.udec.cl/matpel), quienes colectan y procesan en forma rutinaria los residuos biológicos y químicos generados por nuestros investigadores, de acuerdo a las indicaciones del "Manual de Bioseguridad" de CONICYT.

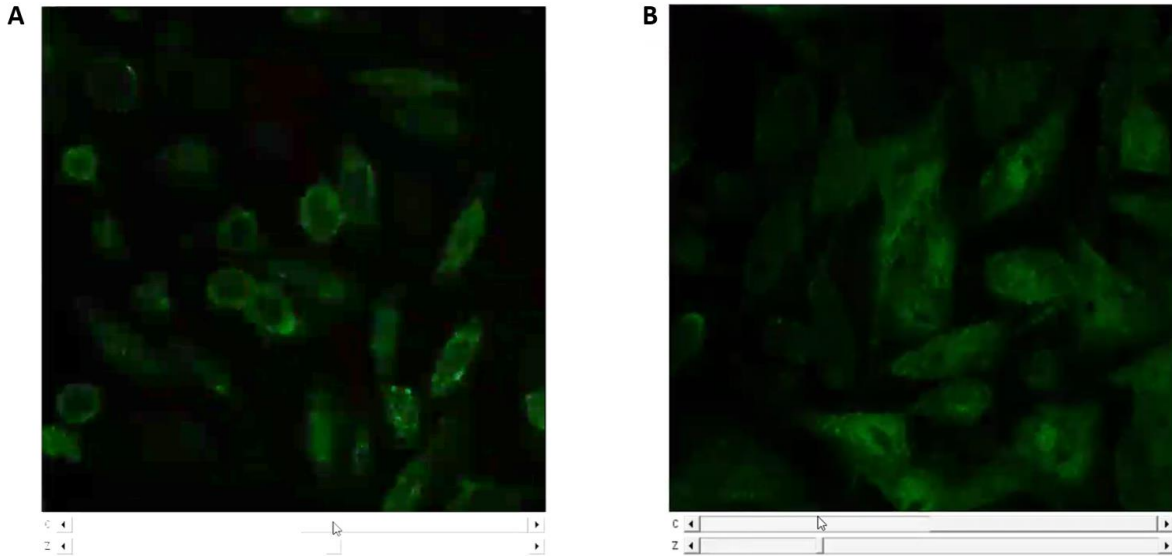
Sin otro particular, les saluda muy atentamente,



Dra. Mafalda Maldonado Villagrán
Presidenta

Comité de Bioética y Bioseguridad
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

**Anexo 4: Acta de aprobación de estudio, comité de Bioética y Bioseguridad.
Facultad Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.**



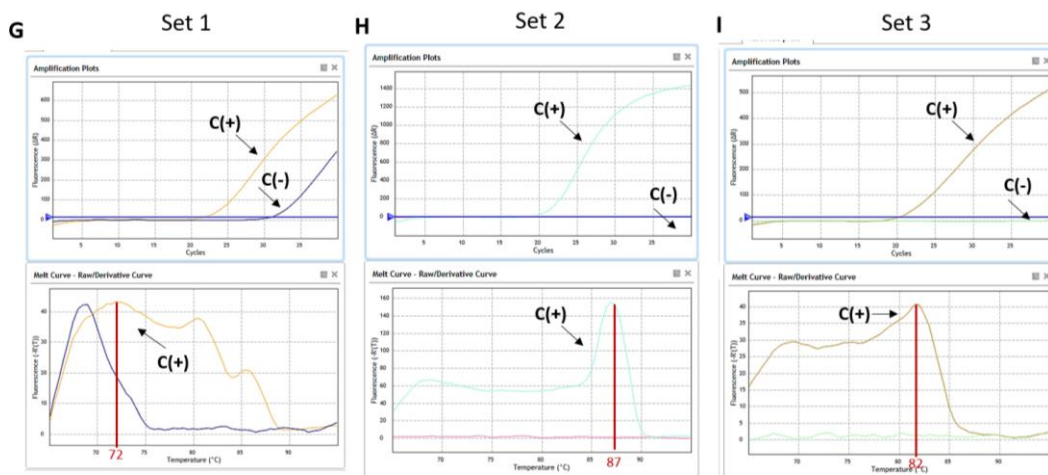
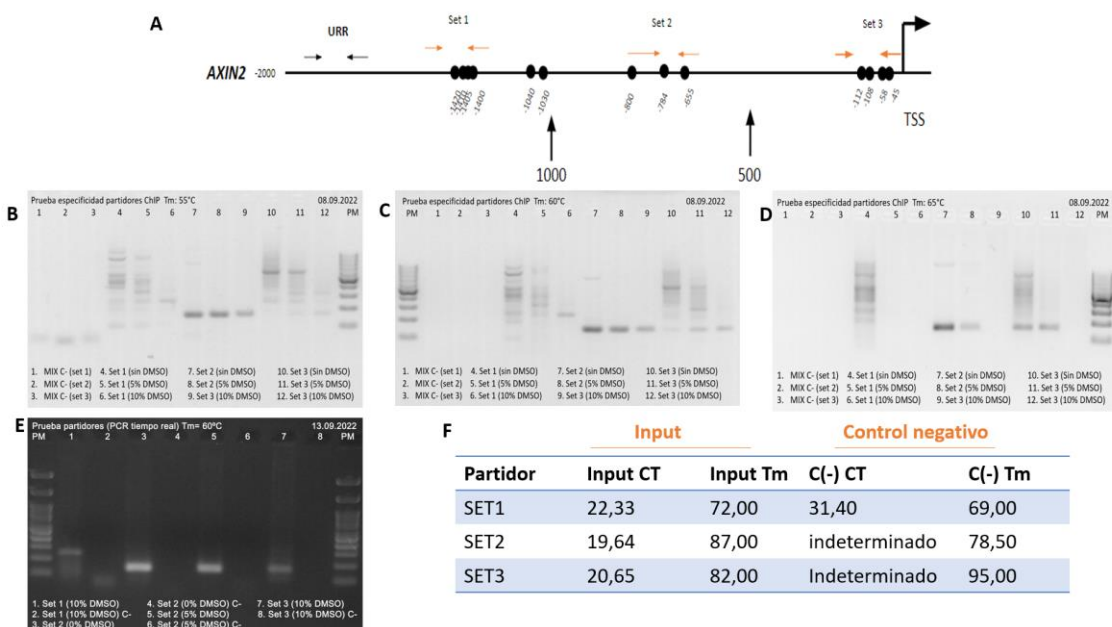
Anexo 5: Células *SALL2*^{-/-} presentan mayores niveles de β -catenina nuclear en comparación con *SALL2*^{+/+} (video). Video de z-stack en el microscopio confocal LMS780 de β -catenina nuclear endógena en células SW480 modelos CRISPR-Cas9. **A)**

Células *SALL2*^{+/+}, enlace:

https://drive.google.com/file/d/1D4Eb04IKqIJ1uiGNgdUTRazIVUs6x7mv/view?usp=share_link.

B) Células *SALL2*^{-/-}, enlace:

https://drive.google.com/file/d/19LHtuCwFjDnazYKrNQkNmIpZm6YRW8ry/view?usp=share_link.



Anexo 6: Diseño y estandarización de los partidores para ChIP-qPCR de AXIN2. A) Esquema representativo del promotor de *AXIN2* en donde se observan los sitios de unión de SALL2. Las flechas de color naranja indican las regiones amplificadas por los diferentes sets de partidores. **B-D)** Barrido de temperaturas de “melting” usando 55, 60 y 65°C.

Además, para mejorar la eficiencia de los partidores se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DMSO, observando el tamaño de los amplicones en gel de agarosa al 2,5%. **E)** Confirmación de las condiciones de PCR para trabajar con los partidores del set 1 -3. **F)** Tabla que involucra el partidador y el CT y Tm de los diferentes sets incluyendo un control negativo por cada uno. **G-I)** Curva de amplificación y temperatura de “melting” de los partidores usados, involucrando control negativo.

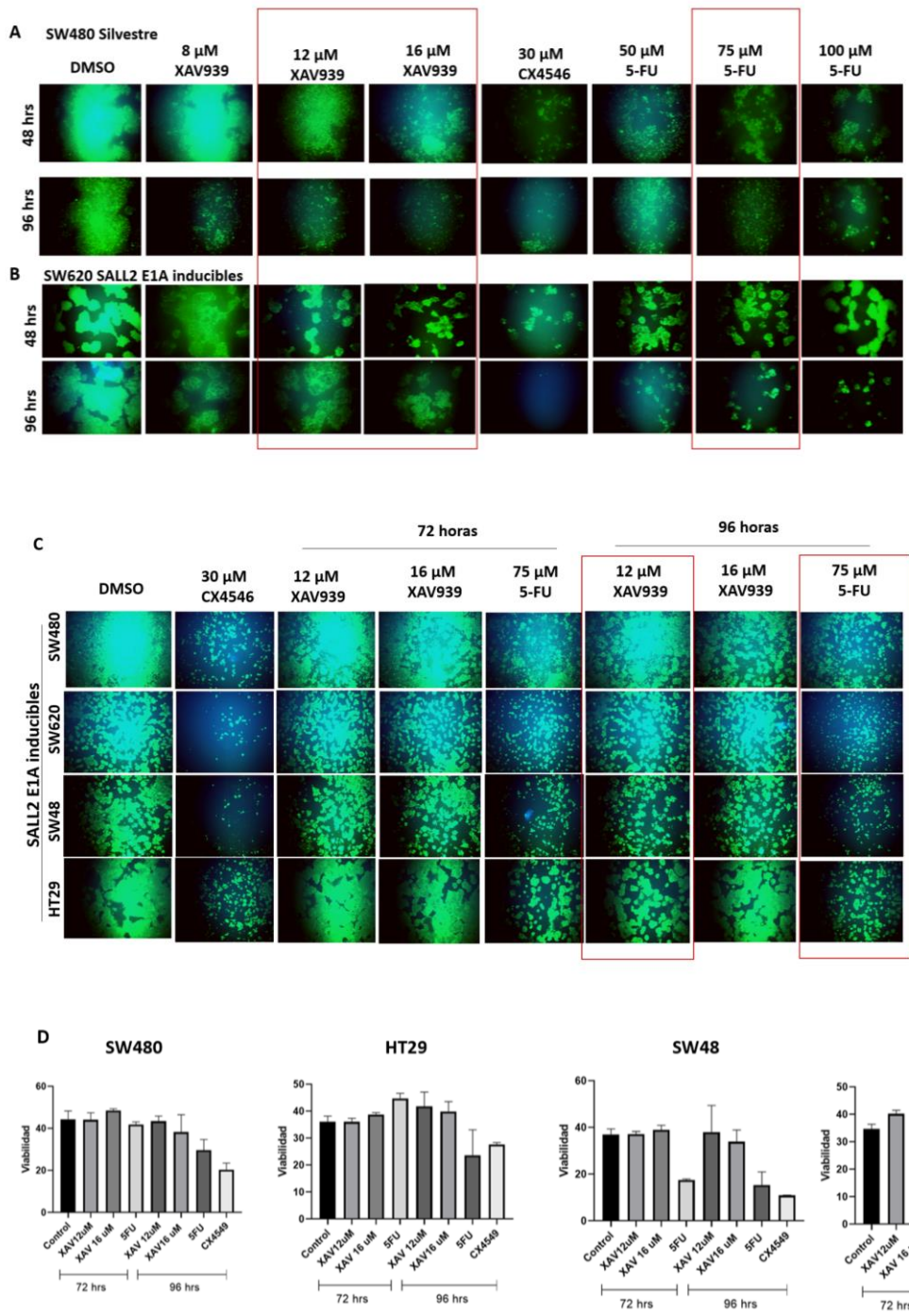
Proyección del estudio:

El inhibidor de la vía Wnt, XAV939, inhibe la proliferación y aumenta la apoptosis (D. Kim et al., 2019). Por otro lado, SALL2 como factor de transcripción cumple un rol similar en estas respuestas, incrementando los niveles de genes como *NOXA* y *BAX* (Hermosilla et al., 2018). Además, como se evidenció en los resultados de la **figura 44**, XAV939 en presencia de SALL2 puede disminuir la proliferación celular e incrementar los niveles de marcadores de respuesta de apoptosis celular como caspasa 3 y PARP Clivado.

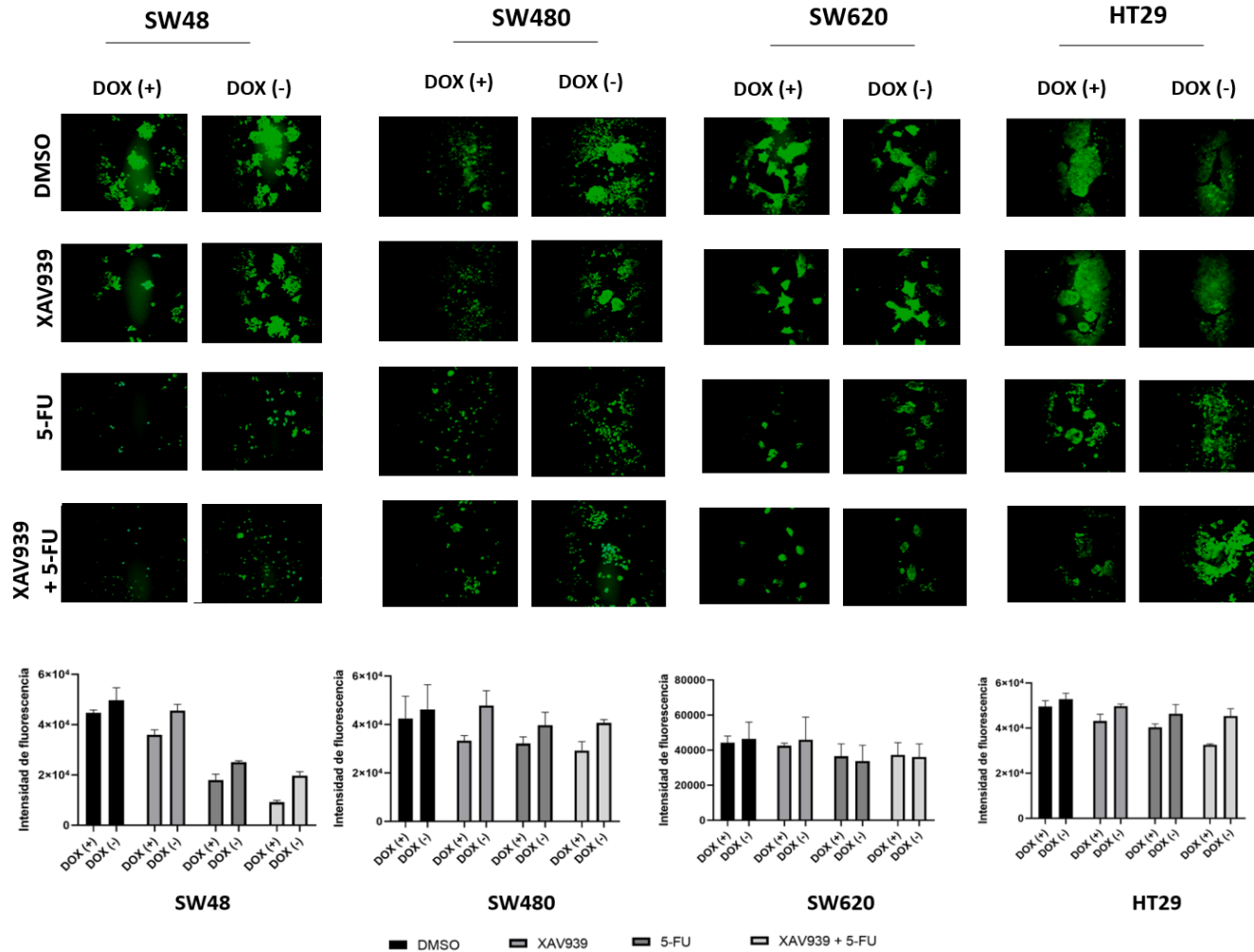
Otras investigaciones indican que XAV939 en presencia de 5-FU o cisplatino logra incrementar la quimiosensibilidad de células de CCR. Entonces una proyección importante sería determinar la dependencia de SALL2 en la apoptosis o proliferación celular en terapias combinadas (5-FU y XAV939) en células de CCR.

Con este fin, se estandarizó las condiciones óptimas (tiempo y concentración) de XAV939 y 5-FU en los modelos de CCR disponibles (SW620, SW48, SW480 y HT-29), y se evaluó la respuesta celular con XTT y tinción con calceína en placas de 96 pocillos, por triplicado. Resultados indican que las células HT29 y SW480 son más resistentes a terapia de XAV939 y 5FU. Se escogieron las condiciones 12 μ M de XAV939 y 75uM de 5-FU por 96 horas, para estudios posteriores (**Anexo 7**).

Como estudio preliminar se utilizaron las condiciones arriba mencionadas y el metodo de calceina para evaluar la respuesta de células con pérdida y ganancia de función de SALL2 en terapia combinada (inhibición de via Wnt y quimioterapia). El resultado indica una tendencia de disminución de la proliferación en presencia de ambos fármacos en todos los modelos. La dependencia de SALL2 en esta respuesta celular es evidenciada en células SW48 y SW480 principalmente. Las células más resistentes fueron HT29 o SW620 (**Anexo 8**).



Anexo 7: Estandarización del tiempo y concentración de 5-FU y XAV939 en células de CCR. Se trabajó con 8, 12 y 16 μ M de XAV939 por 48 y 72 horas. También se utilizó 50, 75 y 100 μ M de 5-FU. Como control positivo de muerte se usó 30 μ M de CX-4945. Este experimento fue realizado en células SW480 (**A**) y células SW620 (**B**). **C**) Finalmente se confirmó que en los modelos inducibles las condiciones seleccionadas también generaban diferencias en la proliferación, 40X. **D**) XTT mostrando los mismos resultados que en C, cada experimento fue realizado por triplicado.



Anexo 8: La expresión de SALL2 E1A disminuye la proliferación frente al tratamiento con XAV939 y 5-FU. Arriba) Células HT-29, SW620, SW48, SW480 SALL2 E1A inducibles, fueron tratadas con 12µM de XAV939 y 75µM de 5-FU por 96 horas. **Abajo)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (N=1) 100X.