



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática

Rol del factor de transcripción SALL2 en la Migración celular, un nuevo regulador de las adhesiones focales

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

ELIZABETH NATALIA RIFFO CONTRERAS

CONCEPCIÓN-CHILE

2017

Profesor Guía: Roxana Pincheira Barrera
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

Profesor tutor

Dra. Roxana Pincheira Barrera
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-tutor

Dra. Marcela Torrejón Quezada
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Teresa Caprile Elola-Olaso
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Vicente Torres Gómez
Facultad de Odontología
Universidad de Chile

Director de Programa

Dra. Violeta Morín Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Dra. Roxana Pincheira y cotutora Dra. Marcela Torrejón por su guía y todo su apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Vicente Torres y Pablo Mendoza por su apoyo y conocimientos brindados durante el desarrollo de esta tesis y en mi estadía en su laboratorio perteneciente a la Universidad de Chile.

Miembros del laboratorio TSC de la Universidad de Concepción, por la ayuda y conocimientos que siempre estuvieron dispuestos a brindarme.

Centro de Microscopía avanzada – CMA Biobío; Germán Osorio y Gustavo Cerda, por toda la ayuda brindada.

A mi familia por toda su comprensión, compañía y amor en este largo camino, mis logros son gracias a ustedes.

A Jorge, Irene y tío Humberto por su apoyo incondicional y ser mis fans número uno.

A mis amigos por su compañía y cariño en los momentos buenos y malos.

A Mario por ser mi compañero de vida y mi colaborador incondicional en el laboratorio.

Tesis de postgrado financiada por:

FONDECYT regular 1151031 de la Dra. Roxana Pincheira Barrera.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv



TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Migración celular.....	1
1.1.1 Etapas del proceso migratorio.....	1
1.1.2 Remodelación del citoesqueleto de actina.....	2
1.1.3 Adhesiones focales: maduración y dinámica.....	4
1.1.4 GTPasas pequeñas en la migración celular.....	8
1.2 Factor de transcripción SALL2.....	10
1.2.1 Genes <i>SPALT-LIKE</i>	10
1.2.2 Estructura de las proteínas <i>SPALT-LIKE</i>	10
1.2.3 Funciones de las proteínas <i>SPALT-LIKE</i>	11
1.2.4 Gen <i>SALL2/Sall2</i>	12
1.2.5 Funciones de SALL2.....	13
1.2.5.1 En la fisiología del sistema nervioso.....	13
1.2.5.2 En cáncer.....	13
1.3 SALL2 y migración celular.....	14
1.4 Modelo de estudio.....	18
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
2.1 Hipótesis.....	19
2.2 Objetivo general.....	19
2.3 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Materiales.....	20
3.2 Métodos.....	21
3.2.1 Aislamiento de Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF).....	21
3.2.2 Inmortalización de MEFs utilizando Antígeno “large T” del virus de Polioma Simio (SV40).....	22
3.2.3 Generación de modelos estables.....	22
3.2.3.1 Generación de las partículas virales.....	23

3.2.3.2 Infección.....	23
3.2.3.3 Selección.....	23
3.2.4 Técnicas de proteínas.....	24
3.2.4.1 Obtención de extractos totales de proteínas y preparación de muestras.....	24
3.2.4.2 Separación de proteínas por SDS-PAGE.....	24
3.2.4.3 <i>Western blot</i>	25
3.2.5 Ensayos de migración celular.....	25
3.2.5.1 Cierre de herida.....	25
3.2.5.2 Cuantificación de la migración celular a través de insertos <i>Transwell</i>	26
3.2.6 Inmunocitoquímica.....	26
3.2.7 Ensayo de “spreading” celular.....	27
3.2.8 Ensayos de adhesión celular.....	28
3.2.8.1 Previo expansión celular.....	28
3.2.8.2 Tratamiento con solución de EDTA.....	28
3.2.9 Análisis de la dinámica de adhesiones focales.....	29
3.2.10 Detección de fosfo-FAK y FAK total durante la expansión celular.....	29
3.2.11 Análisis estadístico.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Objetivo1: Determinar el efecto de la deficiencia de SALL2 en la migración celular.....	31
4.2 Objetivo 2: Determinar el rol de SALL2 en las diferentes etapas de la migración celular.....	35
4.2.1 Analizar el rol de SALL2 en la polaridad celular.....	35
4.2.2 Analizar el rol de SALL2 en la formación de estructuras migratorias (lamelipodios y filopodios).....	40
4.2.3 Analizar el rol de SALL2 en el “spreading” o expansión celular.....	44
4.2.4 Analizar el rol de SALL2 en la adhesión celular.....	46
4.2.5 Analizar el rol de SALL2 en la dinámica de las adhesiones focales.....	50

4.3 Objetivo 3: Determinar posibles blancos transcripcionales de SALL2 que medien su efecto en la migración celular.....	61
5. DISCUSIÓN.....	65
6. CONCLUSIONES.....	78
7. REFERENCIAS.....	79
ANEXOS.....	79
Anexo 1 Determinación de isoforma predominante de SALL2 en MEFs.....	87
Anexo 2 Evaluación de viabilidad celular frente a condiciones de privación de suero.....	88



ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Fig. 1. Etapas de la migración celular.....	2
Fig. 2. Estructuras celulares que presentan una restructuración del citoesqueleto de actina diferencial.....	4
Fig. 3. Estructura de las adhesiones célula-matriz.....	7
Fig. 4. Distribución de los dominios conservados de las proteínas <i>Sall</i>	11
Fig. 5. Organización genómica de <i>SALL2</i>	13
Fig. 6. Deficiencia de <i>SALL2/Sall2</i> genera Coloboma ocular.....	15
Fig. 7. <i>SALL2</i> regula el desarrollo de neuritas en células neuronales.....	16

RESULTADOS

Fig. 8. Análisis de los niveles de expresión de <i>SALL2</i> en células MEFs inmortalizadas.....	31
Fig. 9. <i>SALL2</i> es requerido para la migración celular.....	33
Fig. 10. <i>SALL2</i> favorece estados altamente polarizados a horas tardías.....	37
Fig. 11. <i>SALL2</i> no favorece estados altamente polarizados a horas tempranas.....	39
Fig. 12. <i>SALL2</i> no afecta la formación de las protrusiones membranosas a las 16 horas post-realización de herida.....	42
Fig. 13. <i>SALL2</i> regula el “spreading” celular a tiempos tardíos.....	45
Fig. 14. <i>SALL2</i> promueve la adhesión celular.....	49
Fig. 15. <i>SALL2</i> no afecta el número y direccionalidad de las adhesiones focales a las 16 horas post-realización de herida.....	53
Fig. 16. <i>SALL2</i> promueve la dinámica de desensamblaje y ensamblaje de las adhesiones focales.....	57
Fig. 17. <i>SALL2</i> podría regular la activación de la quinasa FAK, en un contexto de “spreading” celular temprano.....	60
Fig. 18. Posibles sitios de unión para <i>SALL2</i> en diferentes promotores de genes de ratón.....	64

ANEXOS

Fig. 19. E1A es la isoforma de SALL2 predominante en MEFs.....	87
Fig. 20. Viabilidad celular frente a privación de suero.....	88



ÍNDICE DE TABLAS

DISCUSIÓN

Tabla 1. Porcentajes de células MEFs en G1, G2 y G1 + G2 posteriores a la inducción de la migración.....	70
--	----



ABREVIATURAS

APS, Persulfato amónico

BSA, Albúmina de suero bovino

CIL, Inhibición de la locomoción por contacto

CCN, Células de la Cresta neural

CoA, Co-atracción

COMT, Centro organizador de microtúbulos

DMEM, "Dulbecco's Modified Eagle Medium"

DMSO, Dimetilsulfóxido

DTT, Ditiotreitól

DZF, Doble Dedos de Zinc

EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético

FAK, Quinasa de adhesión focal

FBS, Suero Fetal de Bovino

FN, Fibronectina

GAP, Proteína activadora de actividad GTPasa

GAPDH, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GDI, Inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina

GEF, Factor intercambiador de nucleótidos de guanina

HDAC, Histona Deacetilasa

MEC, Matriz extracelular

MEF, Fibroblastos de embriones de ratón

MLCP, Fosfatasa de la cadena liviana de miosina

MT, Microtúbulos

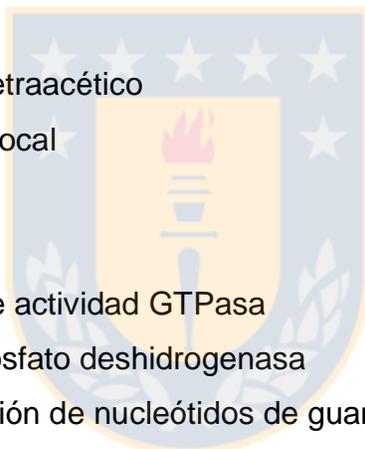
NGF, Factor de crecimiento nervioso

Par3, Partición defectiva 3

Par6, Partición defectiva 6

PBS, Solución salina tamponada con fosfato

PFA, Paraformaldehido



PI3K, Fosfoinositol 3 quinasa
PIP2, Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PIP₁, Quinasa fosfatidilinositol fosfato tipo 1
PLC, Fosfolipasa C
PVDF, Difluoruro de polivinilo
p75-NTR, Receptor Neurotrofina p75
ROCK, Quinasa asociada a Rho
SDS, Dodecil sulfato sódico
TBS, Tris salino buffereado
TEM, Transición epitelio mesenquimal
TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TrKA, Receptor de Tropomiosina-Tirosina quinasa



RESUMEN

SALL2 es un factor de transcripción pobremente caracterizado, miembro de la familia *Spalt-like*, implicado en neurogénesis y diferenciación. Interesantemente, SALL2 está desregulado en varios tipos de cáncer, siendo su rol en esta patología aparentemente discordante. En relación a las funciones descritas para SALL2, se ha observado que la carencia de SALL2 conlleva a fallas en el cierre de la fisura óptica y en la generación de neuritas. Fallas en estos procesos permiten sugerir defectos en la migración celular, siendo el factor en común la carencia de SALL2. La migración celular es un proceso clave en el desarrollo y el mantenimiento de los organismos pluricelulares, conformada por una serie de etapas que incluye polarización celular, generación de protrusiones membranosas y adhesiones focales, desensamblaje de adhesiones focales previamente existentes y tracción celular.

La presente tesis abordó el estudio del rol de SALL2 en la migración celular y su efecto en cada una de las etapas que conforman el proceso migratorio. Para llevar a cabo este estudio se utilizó fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) *Sall2 wild type* y *Sall2 null* y se realizaron ensayos de cierre de herida, de migración con *transwell*, ensayos de adhesión, inmunofluorescencia, *Western blot* y análisis bioinformáticos. Nuestros resultados revelan que **SALL2 es requerido para la migración celular, regulando la dinámica de las adhesiones focales, el “spreading” o expansión celular y favoreciendo estados altamente polarizados**. Asimismo, se encontraron varios genes candidatos para convertirse en blancos transcripcionales de SALL2 que medien su efecto en la migración celular. Desregulaciones en el proceso migratorio conlleva a serias consecuencias, siendo una de estas la formación de tumores y su posterior propagación. SALL2 ha sido vinculado con cáncer y por consiguiente un estudio más profundo de su función en la migración celular extrapolándola a un contexto de cáncer, podría ser clave para dilucidar su rol en esta patología.

ABSTRACT

Sall2 is a poorly characterized transcription factor member of the *Spalt* gene family involved in neurogenesis and differentiation. SALL2 is dysregulated in several types of cancer. However, SALL2 role in cancer is controversial. SALL2 deficiency promotes failure in the optic fissure closure and in neurite outgrowth. Failure in these processes suggest defects on cell migration. These evidences suggested that SALL2 is a new regulator of cell migration. Cell migration is a multistep process involved in development, the maintenance of multicellular organisms and cancer. The first step involve cellular polarization, followed by the generation of membranous protrusions and focal adhesions, disassembly of previously existing focal adhesions and finally cell traction.

This study was focused on determining the role of SALL2 in cell migration. To determine how SALL2 affects migratory process we used *Sall2*-deficient and wild type Mouse Embryo Fibroblasts (MEFs). We performed wound healing assay, transwell migration assay, adhesion assays, immunofluorescence, Western blot analysis and bioinformatics analysis. **Our results determined that SALL2 is require for cell migration, regulating focal adhesion dynamics, cell spreading and promoting highly polarized states.** In addition, using bioinformatic analysis we found several transcriptional candidate targets of SALL2 that could mediate its effects on cell migration. Deregulation on cell migration promotes several diseases such as, tumor formation and spread to others tissues. Therefore, Sall2 role in migration process could be related to the cancer.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MIGRACIÓN CELULAR.-

La migración celular es un proceso clave en el desarrollo y el mantenimiento de los organismos pluricelulares. Por ejemplo la cicatrización de heridas, angiogénesis, la formación de tejido en etapas embrionarias y la respuesta inmune requieren de movimientos celulares sincronizados en una dirección particular y hacia sitios específicos. Errores durante la migración celular tiene serias consecuencias tales como: defectos funcionales a nivel de diferentes órganos, patologías asociadas al sistema inmune, formación de tumores y posterior metástasis, entre otras (Rodríguez L. y Schneider I.C., 2013).

1.1.1 ETAPAS DEL PROCESO MIGRATORIO.-

Para que la migración celular se lleve a cabo, deben ocurrir una serie de etapas de forma organizada que en conjunto permitirán la movilidad de las células (Figura 1). El primer paso es la polarización celular, proceso dependiente de una organización asimétrica de los componentes celulares que está dada por la acción del citoesqueleto de actina y los microtúbulos (Li R. y Gundersen G., 2008). La polaridad celular permitirá establecer un frente migratorio y una región posterior que se diferencian en estructura y función. A continuación, desde el frente migratorio de la célula, se forman extensiones membranosas denominadas filopodios y lamelipodios cuyas funciones son sensor, direccionar y extender la membrana celular, respectivamente (Etienne-Manneville S., 2004).

Posterior a la formación de protrusiones, comienza la generación de adhesiones focales que corresponde a puntos de contacto entre el citoesqueleto de actina y el sustrato de adhesión en respuesta a factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular (MEC). Las adhesiones focales maduras cuentan con más de

150 componentes, donde encontramos: integrinas; proteínas citoplasmáticas como talina, vinculina, paxilina, entre otras; moléculas adaptadoras y quinasas como FAK (quinasa de adhesión focal) y Src (tirosina quinasa protooncogén) (Wozniak M. *et al.*, 2004 y Wehrle-Haller B., 2011). Finalmente, ocurre la tracción celular que se basa en la acción de dos fuerzas: la polimerización de actina en el frente migratorio que genera la fuerza para extender la membrana celular y la fuerza contráctil que depende de motores moleculares como la miosina, que actúa sobre fibras de actina antiparalelas, generando así la fuerza para mover el cuerpo celular (Ridley AJ. *et al.*, 2003 y Kirfel G. *et al.*, 2004).

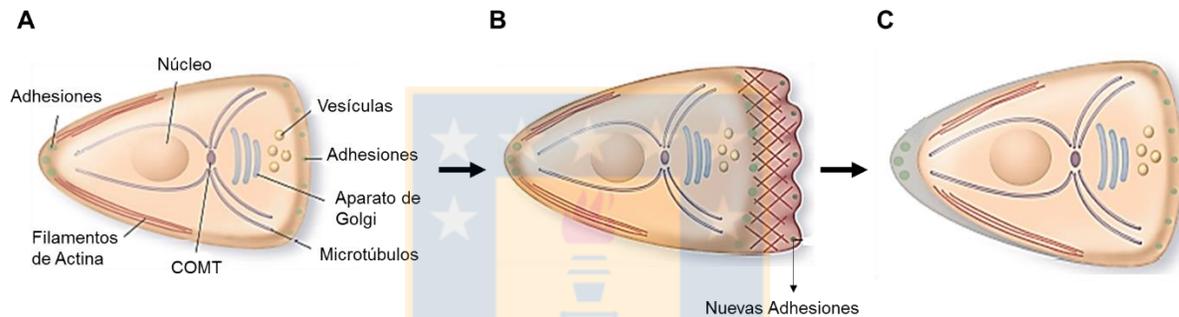


Figura 1: Etapas de la migración celular. Representación esquemática de una célula en movimiento transitando por los distintos pasos del proceso migratorio, comenzando con el establecimiento de la polaridad celular (A), formación de extensiones membranas y adhesiones focales en el frente migratorio (B), desensamblado de las adhesiones focales en la región posterior y tracción celular (C). Fuente: Modificado de Ridley AJ. *et al.*, 2003.

1.1.2 REMODELACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA.-

Cabe destacar que la capacidad de las células para dividirse, cambiar de forma y moverse se basa en el ensamblaje de proteínas, específicamente la actina, una proteína globular de 42 kDa que polimeriza a la forma de filamentos. La polimerización de actina consta de tres etapas: nucleación, elongación e hidrólisis de ATP y la participación de diversas proteínas accesorias tales como: el complejo

nucleante Arp2/3 que es activado por proteínas de la familia WASP/WAVE, la proteína profilina importante para el reciclaje de los monómeros de actina, formina, proteína clave para la elongación del filamento en crecimiento y Cofilina que actúa como un factor de desensamblaje que promueve la fragmentación o desramificación de los filamentos ya existentes (Le Clainche C. y Carlier MF., 2008).

Los filamentos de actina forman parte de diferentes tipos de organización como lo son las fibras de estrés, corteza, lamelipodios y filopodios, que se diferencian por su estructura y función (Figura 2). La corteza por ejemplo, se caracteriza por presentar una red ramificada de filamentos de actina cuya principal función es dar forma a la célula. Las fibras de estrés son importantes para la generación de adhesiones focales, presentan una estructura contráctil antiparalela. Por otro lado, los lamelipodios, estructuras que se caracterizan por presentar una red bidimensional de fibras de actina ramificadas y entrecruzadas, empujan la membrana celular promoviendo el avance de ésta, y los filopodios, estructuras digitiformes que presentan fibras de actina paralelas, son importantes para generar una respuesta direccional (Blanchoin L. *et al.*, 2014).

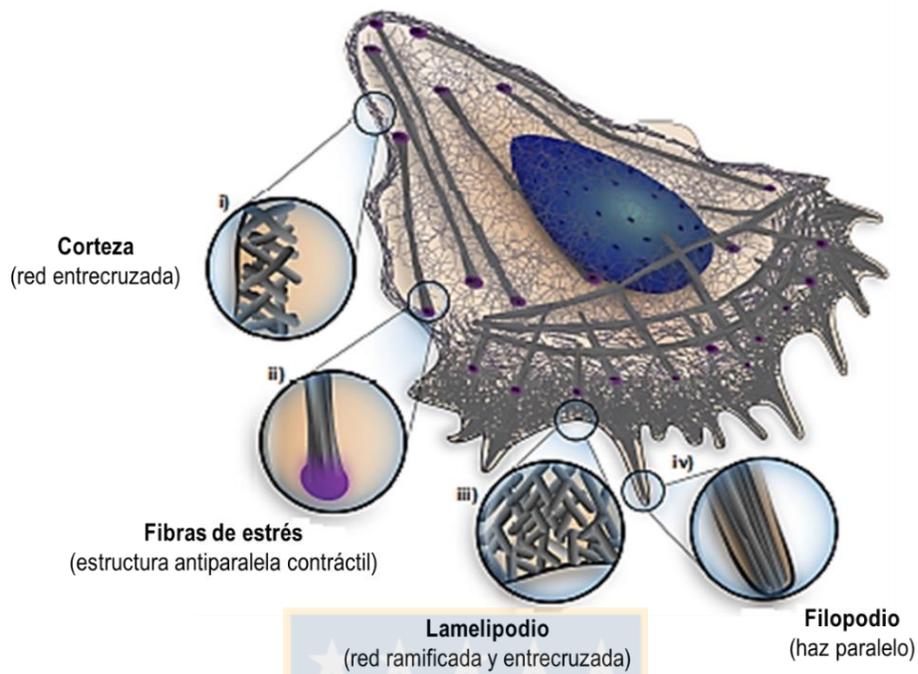


Figura 2: Estructuras celulares que presentan una reestructuración del citoesqueleto de actina diferencial. Representación esquemática de distintas regiones de la célula y su arquitectura de actina característica: i) Corteza celular, ii) Fibra de estrés, iii) Lamelipodio y iv) Filopodio. Fuente: Modificado de Blanchoin L. *et al.*, 2014.

1.1.3 ADHESIONES FOCALES: MADURACIÓN Y DINÁMICA.-

La adhesión célula-matriz es la forma de adhesión más importante durante la migración celular y requiere de un ciclo dinámico de ensamblaje y desensamblaje, altamente regulado. Durante el proceso migratorio, las protrusiones se extienden desde el frente migratorio y sus receptores de adhesión, las integrinas, entran en contacto con la matriz extracelular a través de ligandos específicos, lo que envía una cascada de señales para el reclutamiento de proteínas adaptadoras que formarán parte del complejo de adhesión focal (Gardel M. *et al.*, 2010 y Huttenlocher A. y Horwitz A., 2011).

Las integrinas son receptores *trans*-membrana de moléculas de la matriz extracelular, constituidas por un heterodímero formado por una subunidad α y una β . Estos receptores presentan dos conformaciones alostéricas: una inactiva, de baja afinidad por el ligando y una activa, de alta afinidad por el ligando. Las integrinas son reguladas principalmente por cationes divalentes como el calcio, magnesio y manganeso, por lípidos como el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) y por la unión de adaptadores (Huttenlocher A. y Horwitz A., 2011). La unión de la proteína adaptadora talina al dominio citoplasmático de la β -integrina induce un cambio conformacional que se propaga a lo largo de su estructura y favorece su forma activa, reclutando a proteínas con actividad tirosina quinasa, como la quinasa de adhesión focal (FAK). Una vez reclutada a la adhesión, se autofosforila en la tirosina 397 para reclutar a Src, la cual fosforila a paxilina y vuelve a fosforilar a FAK en otros residuos tirosina como 576 y 577, generándose así una cadena de eventos de fosforilaciones sucesivas que modulan la dinámica de ensamblaje (Wehrle-Haller B., 2011 y Huttenlocher A. y Horwitz A., 2011).

Cabe destacar que existen varios niveles de maduración de las adhesiones célula-matriz, comenzando con las adhesiones nacientes que corresponden a las primeras estructuras adhesivas que se forman desde el lamelipodio y se caracterizan por ser pequeñas ($< 0,25\mu\text{m}$), transitorias (alta actividad de ensamblaje y desensamblaje) y por lo tanto difíciles de observar. El siguiente nivel de maduración corresponde a los complejos focales, estos son de un mayor tamaño que las adhesiones focales nacientes ($0,5\mu\text{m}$) y dependen de la acción de la miosina II para su formación y mantenimiento, residen en el borde del lamelipodio, al igual que las adhesiones nacientes. Los complejos focales presentan una alta tasa de dinámica de ensamblaje y desensamblaje (Gardel M. *et al.*, 2010).

Posteriormente los complejos focales maduran hacia adhesiones focales, las que son de un mayor tamaño ($1-5\mu\text{m}$) y más estables, anclándose a las fibras de estrés. Además de los componentes ya mencionados, otras proteínas

citoplasmáticas son incorporadas a las adhesiones focales como lo son vinculina, tensina, α -actinina, zyxina, filamina, actopaxina, entre otras (Gardel M. *et al.*, 2010).

Asimismo, la participación de proteínas como la isoforma de PIPK1 γ (quinasa fosfatidilinositol fosfato tipo1 γ), PIPK1- γ 661 controla la incorporación de talina y vinculina gracias a la síntesis de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato, que a su vez sirve como sustrato para PI3K (fosfoinositol 3 quinasa) (Wehrle-Haller B., 2011 y 2012). Aquí también encontramos la participación de moléculas adaptadoras como p130Cas que se une a Crk, otro ejemplo de proteína adaptadora, aumentando la actividad de las integrinas y la adhesión celular (Gardel M. *et al.*, 2010).

El último nivel de maduración de las adhesiones célula-matriz corresponde a las adhesiones fibrilares que se caracterizan por su gran tamaño ($> 5\mu\text{m}$), por no estar asociadas a las fibras de estrés y por tener más bien un rol en la remodelación de la matriz extracelular (Gardel M. *et al.*, 2010).

Adicionalmente a los diferentes niveles de maduración de las adhesiones y sus respectivas características y componentes (Figura 3), las adhesiones focales poseen un ciclo muy dinámico de ensamblaje y desensamblaje (Le Clairche C. y Carlier MF., 2008 y Gardel M. *et al.*, 2010). El desensamblaje de este tipo de adhesiones es mediante diversos mecanismos como por ejemplo: 1) fosforilación de PIPK1- γ 661 por parte de la quinasa Src lo que se traduce a la unión de PIPK1- γ 661 con talina y como consecuencia de esta interacción, se impide la unión de talina con integrina (Wozniak M. *et al.*, 2004), 2) clivaje de las proteínas FAK, talina, Src, α -actinina y paxilina mediado por Calpaínas (tiolproteasa dependiente de Ca^{+2}), 3) defectos en el reciclaje de integrinas y 4) degradación de la matriz extracelular (Huttenlocher A. y Horwitz A., 2011 y Wehrle-Haller B., 2011).

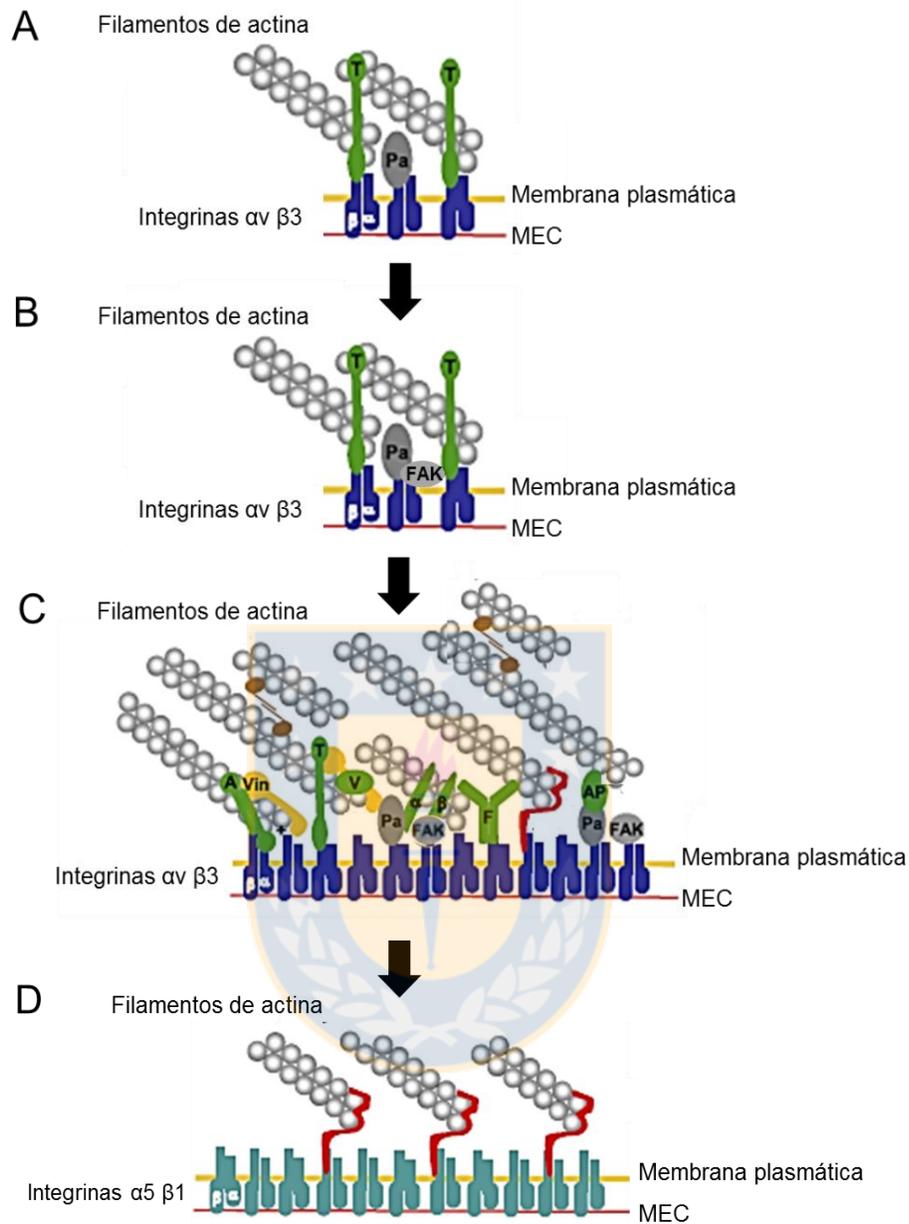


Figura 3: Estructura de las adhesiones célula-matriz. Representación esquemática de estructura y componentes que conforman los diferentes grados de maduración de las adhesiones célula-matriz. (A) Adhesión naciente compuesta de filamentos de actina, paxilina, talina e integrina $\alpha v \beta 3$ (B) Complejo focal compuesto por filamentos de actina, paxilina, talina, integrina $\alpha v \beta 3$ y FAK (C) Adhesión focal formada por filamentos de actina, paxilina, talina, filamina, tensina, vinculina, miosina, integrina $\alpha v \beta 3$, FAK y (D) Adhesión fibrilar compuesta de filamentos de actina, tensina e integrinas $\alpha 5 \beta 1$. Fuente: Modificado de Le Clairche C. y Carlier MF., 2008 y Gardel M. *et al.*, 2010.

1.1.4 GTPASAS PEQUEÑAS EN LA MIGRACIÓN CELULAR.-

El establecimiento de la polaridad celular, la generación de protrusiones y el ensamblaje de adhesiones focales, se encuentra regulado por proteínas GTPasas pequeñas de la familia Rho. Dichas proteínas se caracterizan por funcionar como un interruptor, pudiendo pasar de un estado inactivo (unidas a GDP) a un estado activo (unidas a GTP), proceso mediado por una familia de proteínas llamadas GEFs (factor intercambiador de nucleótido de guanina). Por otro lado, existen proteínas anexas aparte de los GEFs, que regulan el estado "ON/OFF" de las GTPasas: proteínas con actividad GAP (proteína activadora de GTPasa) y proteínas con actividad GDI (Inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina). Dentro de estas GTPasas; RhoA, Rac1 y Cdc42 han sido ampliamente descritas como reguladoras del proceso de migración celular (Raftopoulou M. y Hall A., 2004; Sadok A. y Marshall C., 2014).

Cdc42 es considerado el regulador maestro de la polaridad celular, por un lado regula el citoesqueleto de actina a través de la unión y activación de las proteínas WASP/WAVE que a su vez activan al complejo nucleante Arp2/3 para la formación de filopodios. Asimismo ejerce un rol sobre la organización de microtúbulos por medio del reclutamiento y activación del complejo Par6/Par3/aPKC, encargado del establecimiento del centro organizador de microtúbulos (COMT) y del aparato de Golgi, frente al núcleo en dirección hacia al punto de migración, facilitando además el tráfico de membrana, específicamente la liberación de vesículas provenientes del Golgi hasta el borde director. Por otro lado, Cdc42 también es capaz de activar la GTPasa Rac1 (Etienne-Manneville, S., 2004).

Similar a Cdc42, Rac1 ejerce un rol sobre la polimerización de actina a través de la activación del complejo nucleante Arp2/3 y el factor de desensamblaje Cofilina para la formación de lamelipodios (Spiering D. y Hodgson L., 2011). Por otro lado, participa en la formación de adhesiones nacientes y complejos focales favoreciendo el reclutamiento y agrupación de las integrinas en el borde del

lamelipodio (Lawson C. y Burridge K., 2014). Además favorece un fenotipo invasivo promoviendo la activación de metaloproteinasas (MMP) (Parri M. y Chiarugi P., 2010).

A diferencia de Cdc42 y Rac1, la forma activa de RhoA se localiza en la región posterior de la célula en movimiento (Spiering D. y Hodgson L., 2011). RhoA tiene un rol en la formación de fibras de estrés y en la estabilización de los microtúbulos (MT) a través de su efector mDia (proteína miembro de la familia de las Forminas) (Spiering D. y Hodgson L., 2011). Por otro lado, RhoA participa en la generación de la fuerza contráctil, mediante la activación de la serina treonina quinasa ROCK que conlleva a la inhibición de la fosfatasa de la cadena liviana de miosina (MLCP), incrementando los niveles de fosforilación de ésta, permitiendo que actúe sobre los filamentos de actina (ensamblaje de fibras de actina/miosina) para generar así la fuerza de contracción (Guilluy C. *et al.*, 2011 y Lawson C. y Burridge K., 2014).

Si bien la migración celular se encuentra finamente regulada por la acción en conjunto de estas GTPasas pequeñas, cabe mencionar que la actividad y funciones de Rac1 y RhoA presentan una relación opuesta, es decir, cuando Rac1 se encuentra en un estado activo y ejerce sus funciones, la actividad y funciones de RhoA se encuentran inhibidas y viceversa. Esta inhibición se debe principalmente a la regulación de GEFs y GAPs por parte de ambas GTPasas. Por otro lado, existen evidencias de una relación positiva entre la actividad y función de Rac1 y RhoA en contexto celulares específicos, como en el caso de células de cáncer de mama en donde la activación de RhoA va acompañada de la activación de Rac1 (Guilluy C. *et al.*, 2011 y Lawson C. y Burridge K., 2014).

1.2 FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SALL2.-

1.2.1- GENES SPALT-LIKE.-

Los genes *Spalt* pertenecen a la familia *Spalt-like* (*Sall*), una familia de genes evolutivamente muy conservados cuyos miembros codifican factores de transcripción, estos se caracterizan por la presencia de múltiples dominios dedos de zinc. La existencia de estos genes ha sido descrita en diversas especies desde nemátodos hasta vertebrados, identificándose en estos últimos cuatro ortólogos como por ejemplo, en el caso de humanos (*SALL1-4*) y (*Sall1-4*) en el caso de ratones (Sweetman D. y Münsterberg A., 2006; De Celis J.F. y Barrio R., 2009).

1.2.2 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS SPALT-LIKE.-

Las proteínas pertenecientes a esta familia están en un rango de tamaño de 105 a 140 KDa y se caracterizan por presentar múltiples dominios de Doble Dedos de Zinc (DZF) a lo largo de toda su estructura (figura 3). El dominio número 1, conservado sólo entre los homólogos de vertebrados, se compone de un único dedo de zinc del tipo C₂HC, los dominios restantes (2-5) corresponden a dominios del tipo C₂H₂ organizados en pares. El tercer par de dedos de zinc, contiene además un dedo de zinc adicional, también altamente conservado entre los ortólogos presentes en vertebrados (Sweetman D. y Münsterberg A., 2006; De Celis J.F. y Barrio R., 2009).

Los ortólogos de vertebrados, presentan diferencias en la distribución de los dedos de zinc, así, las proteínas SALL2 y SALL4, presentan ausencia del cuarto dominio (Figura 4) y SALL2 además, presenta diferencias en su extremo C-terminal, razón por la que se considera el miembro más distante de la familia (De Celis y Barrio, 2009). Cabe destacar que las proteínas SALL en vertebrados, poseen adicionalmente en el extremo N-terminal un dominio represor, correspondiente a

los 10 primeros aminoácidos, que favorece la represión de ciertos genes, por unión y reclutamiento de proteínas modificadoras de la estructura de la cromatina, las histonas deacetilasas (HDAC), actuando de esta manera como potenciales represores transcripcionales (Kiefer *et al.*, 2002). Otro dominio característico es una región rica en residuos de Glutamina (polyQ) (figura 4) y que podría estar involucrada en la interacción proteína-proteína entre miembros de la familia *Sall*, así como en la interacción con otras proteínas, pudiendo ser importante para su actividad biológica (De Celis J.F. y Barrio R., 2009).

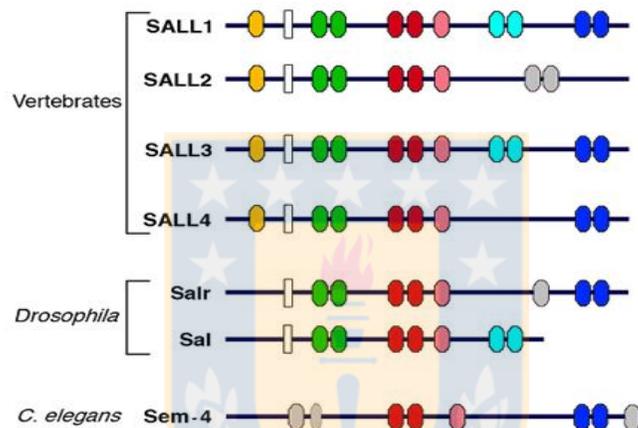


Figura 4: Distribución de los dominios conservados de las proteínas SALL. Los óvalos coloreados representan los dominios dedos de zinc (DZF), mientras que los rectángulos blancos representan regiones ricas en residuos de glutamina (PolyQ). Fuente: Modificado de De Celis J.F. y Barrio R., 2009.

1.2.3 FUNCIÓN DE LOS GENES SPALT-LIKE.-

Los primeros antecedentes en relación a la función de los genes *Sall*, fueron descritos en *Drosophila melanogaster*, observándose que mutaciones en estos genes eran responsables de transformaciones homeóticas en la cabeza y la cola de este organismo (Kühnlein R. *et al.*, 1994). Actualmente se ha demostrado que los genes *Spalt* participan en diversos procesos tales como: la formación de

extremidades, desarrollo del sistema límbico, desarrollo de órganos como el corazón y riñones, participan en el desarrollo neuronal; siendo un aspecto relevante, la asociación que existe entre mutaciones de estos genes con síndromes congénitos que afectan el desarrollo de dichos órganos (Sweetman D. y Münsterberg A., 2006).

1.2.4 GEN *SALL2/Sall2*.-

El gen *SALL2* ubicado en el brazo largo del cromosoma 14, fue identificado y caracterizado en el año 1996 (Kohlhase J. *et al.*, 1996). Estudios posteriores permitieron aislar y caracterizar el gen *Sall2* murino, estudio que evidenció la existencia de un exón 5' adicional, con la posibilidad de obtener dos diferentes transcritos (isoformas) para este gen (Kohlhase J. *et al.*, 2000).

Más tarde, se reportó la existencia de dos promotores distintos para *SALL2*. P1, un promotor proximal (corriente arriba del exón 1) y P2, un promotor distal (corriente arriba del exón 1A) (Figura 5), demostrándose que en humanos y en ratones existen dos isoformas E1 y E1A, las cuales comparten el segundo exón y se diferencian en el primer exón. Dichas isoformas se originan por un mecanismo de *splicing* alternativo, específicamente selección de promotores alternativos P1 o P2 (Ma Y. *et al.*, 2001). La isoforma E1 se encuentra constituida por el exón E1 y el exón 2 y se caracteriza por presentar la secuencia de localización nuclear MSRRK y el dominio represor en su extremo N-terminal. Su expresión es de forma selectiva, encontrándose en altos niveles en cerebro y en riñón y en menores niveles en pulmón, testículo e intestino. Por otro lado la isoforma E1A está constituida por el exón E1A y el exón 2 y se caracteriza por la ausencia de cajas TATA, de la secuencia de localización nuclear y el dominio represor. La expresión de la isoforma E1A es ubicua (Ma Y. *et al.*, 2001 y Hermosilla V. *et al.*, 2017).

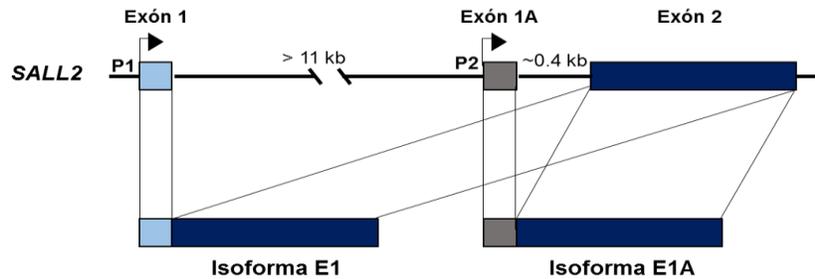


Figura 5: Organización genómica de SALL2. Esquema de la distribución de los diferentes exones que constituyen a SALL2 humano y su respectivos transcritos a ARN mensajero. P1: promotor proximal, P2: promotor distal. Fuente: Modificado de Ma Y. *et al.*, 2001.

1.2.5 FUNCIONES DE SALL2.-

1.2.5.1 EN LA FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA NERVIOSO.-

La alta expresión de SALL2 murino y humano detectada en el cerebro, sugirió una posible función de esta proteína en el desarrollo de este órgano (Kohlhase J. *et al.*, 2000). En relación a esta hipótesis, investigaciones de Böhm *et al.*, mostraron que ratones homocigotos que carecen de la proteína SALL2 presentaban anomalías en el cierre del tubo neural. En este estudio se generaron tres líneas mutantes distintas y dos de ellas mostraron deficiencias en el cierre del tubo neural, datos que indican que SALL2 es esencial en el proceso de neurulación (Böhm J. *et al.*, 2008).

Por otro lado, ensayos de doble híbrido en levadura identificaron que SALL2 se une al dominio de muerte del receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR), donde se demostró que en ausencia de NGF (Factor de crecimiento neuronal), SALL2 está constitutivamente asociado con p75NTR, mientras que en presencia de esta neurotrofina el complejo Sall2-p75NTR se disocia y activa a TrkA (Receptor de Tropomiosina-Tirosina quinasa), favoreciendo la translocación nuclear de SALL2.

Una vez en el núcleo, SALL2 aumenta la expresión del inhibidor ciclina-CDK, p21, deteniéndose el ciclo celular y por consiguiente promoviendo la diferenciación y el desarrollo de neuritas en células neuronales (Pincheira R. *et al.*, 2009).

1.2.5.2 EN CÁNCER.-

Interesantemente, la ganancia o pérdida de la expresión de SALL2 se ha asociado con la progresión tumoral, siendo su rol en esta patología aparentemente discordante. Por un lado existen evidencias que lo apuntan como un supresor de tumores (Li *et al.*, 2004; Chai L., 2011; Sung C. *et al.*, 2012), mientras que datos clínicos demuestran que esta proteína está sobreexpresada en varios cánceres, datos que sugieren a SALL2 más bien un rol oncogénico (Li C-M. *et al.*, 2002; Nielsen T.O. *et al.*, 2003; Alagaratnam S. *et al.*, 2011).

1.3 SALL2 Y MIGRACIÓN CELULAR.-

Con respecto al rol de SALL2 en la migración celular, solo existen dos estudios que permiten sugerir un rol de esta proteína en este importante proceso. Uno de estos estudios corresponde a la investigación llevada a cabo por Kelberman y colaboradores, quienes identificaron una mutación homocigota en el gen *SALL2/Sall2* (humano y murino, respectivamente) que conlleva al defecto congénito de Coloboma ocular, caracterizado por fallas del cierre de la fisura óptica durante el desarrollo embrionario del ojo, provocando ceguera (Figura 6). Demostrándose que SALL2 tiene un rol en la morfogénesis de este órgano (Kelberman D. *et al.*, 2014).

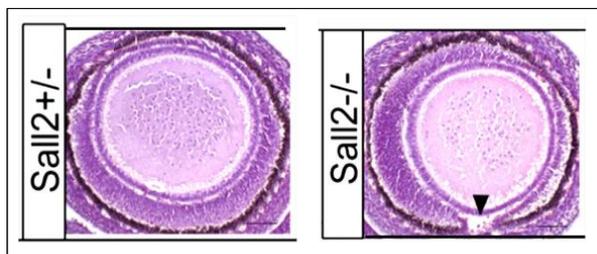


Figura 6: Deficiencia de *SALL2/Sall2* genera Coloboma ocular. Secciones coronales del ojo de embriones de ratón *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} de estadio E14.5 que muestran cierre de la fisura óptica en la región anterior. Punta de flecha negra indica cierre de fisura óptica defectuoso. Fuente: Modificado de Kelberman D. *et al.*, 2014.

Fallas en el cierre de la fisura óptica se pueden asociar de manera indirecta con defectos en la migración celular, ya que procesos implicados en la formación de este órgano previos a la formación y cierre de esta fisura dependen de una efectiva migración de las células que aquí participan. Centrándonos en este último punto, un ejemplo es el movimiento colectivo de las células de la cresta neural (CCN) que dan origen a diferentes linajes celulares y estructuras, incluyendo estructuras oculares y peri-oculares, contribuyendo así al desarrollo del ojo y orbita ocular durante el desarrollo embrionario (Langenberg T. *et al.*, 2009; Williams A. y Bohnsack B., 2015). Otro ejemplo es la evaginación bilateral del prosencéfalo (porción anterior del cerebro primitivo) formando la vesícula óptica primaria, que tras una invaginación local se transforma en el cáliz óptico. El proceso de evaginación requiere de la migración individual activa de las células progenitoras de la retina (RPCs), mediando todos los pasos de este proceso (Rembold M. *et al.*, 2006). En relación a los ejemplos mencionados anteriormente, a la fecha no existen estudios acerca si *SALL2* pudiese regular dichos procesos directamente.

El segundo estudio que permite vincular a *SALL2* con la migración celular es la investigación realizada por Pincheira R. y colaboradores en donde experimentos de silenciamiento del gen *Sall2*, en células PC12 (línea celular derivada a partir de un Feocromocitoma de la medula suprarrenal de rata) y células primarias de

hipocampo (Figura 7), permitieron demostrar que SALL2 era necesario para la extensión de neuritas en respuesta a NGF (Pincheira R. *et al.* 2009).

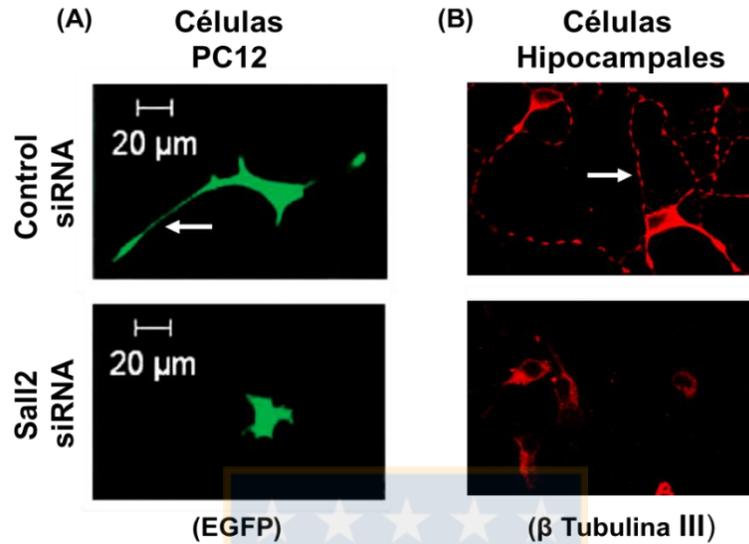


Figura 7: SALL2 regula el desarrollo de neuritas en células neuronales. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, (A) células PC12 fueron transfectadas con siRNA control o siRNA Sall2 y EGFP, células fueron tratadas con NGF por 2 días. (B) Células Hipocampales fueron transfectadas con siRNA control o siRNA Sall2 y tratadas por 16 horas con NGF, células fueron visualizadas usando el anticuerpo anti β-tubulina III. Flechas blancas señalan extensión de neuritas. Fuente: Modificado de Pincheira R. *et al.*, 2009.

El rol de SALL2 en el desarrollo de neuritas vincula de manera más directa a este factor de transcripción con el proceso migratorio debido a diferentes razones. Una de ellas es que similar a lo que ocurre en células que se encuentran en movimiento, en primera instancia deben polarizarse para que la migración sea efectiva, en el caso de las neuronas estas deben encontrarse altamente polarizadas para que la extensión de sus procesos (axones y dendritas) sea efectiva (Li R. y Gundersen G., 2008). Siguiendo con la misma idea, el establecimiento de la polaridad requiere de una ruptura de la simetría celular que

está dada por la acción de los microtúbulos (MT). La regulación de la dinámica de los microtúbulos está dada a través de la acción de las GTPasas pequeñas Cdc42, Rac1 y RhoA al igual que en el caso de células que están en movimiento (Fukata M. *et al.*, 2003). Describiéndose que Cdc42 y Rac1 llevan a cabo esta función inhibiendo a Estatmina, una proteína desestabilizadora de los MT, mientras que RhoA estabiliza los MT mediante su efector mDia (Fukata M. *et al.*, 2003).

Otro punto a considerar es que cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina provee la fuerza mecánica necesaria para la extensión de procesos y la migración de las células neuronales. Más aun la migración neuronal depende de la extensión de neuritas (Mokalled M. *et al.*, 2010). Considerándose la formación y extensión de neuritas como la primera etapa de la migración neuronal seguido de la translocación somal. En términos generales la migración neuronal comparte etapas y mecanismos muy similares con la migración de células tipo fibroblastos (Marín O. *et al.*, 2006)

Apartándonos de SALL2, otros miembros de la familia *Sall* como SALL1 y SALL4 han sido vinculados con la migración celular. Estudios realizados en líneas de cáncer de mama permitieron evidenciar que la inhibición SALL1 se correlaciona con la disminución la expresión de la cadherina 1 (CDH1), proteína que favorece la transición epitelio mesenquimal. Asimismo el silenciamiento de SALL1 conlleva a un incremento en la migración celular en las células testeadas (Wolf J. y col., 2014). Por otro lado, la expresión de SALL4 se ha asociado directamente con un incremento en la migración celular e invasión en líneas de cáncer gástrico y en células de osteosarcoma, favoreciendo así la progresión de estos tumores (Yuan X. y col., 2016 y Zhang D. y col., 2017).

Estos hallazgos en conjunto con lo anteriormente mencionado refuerzan la hipótesis de que SALL2 podría tener un rol en la migración celular.

1.4 MODELO DE ESTUDIO

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) son células primarias muy utilizadas, fundamentales en el estudio del efecto de la ablación de genes, estas al ser derivadas de ratones genéticamente modificados, han demostrado ser una herramienta muy valiosa para estudiar una serie de propiedades biológicas, tales como la regulación del ciclo celular, senescencia, proliferación, apoptosis, transformación, diferenciación celular y migración, entre otras (Sun H. y Taneja R., 2007).

Por otro lado, cabe destacar que estas células al poseer un tamaño mayor al de otras líneas celulares, facilita el estudio de la reorganización del citoesqueleto de actina, además de generar grandes protrusiones, razón por la cual células MEFs son ampliamente utilizadas como modelo de estudio en el proceso de migración celular (Yang L. *et al.*, 2006; Miller N. *et al.*, 2012; Goncharova E.A. *et al.*, 2014).

Para abordar la importancia del factor de transcripción SALL2, utilizaremos células MEFs derivadas de un modelo de animal genéticamente modificado, correspondiente a ratones *Sall2*-deficientes, creado por nuestro colaborador el Dr. Nishinakamura (Sato A. *et al.*, 2002).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La información aquí expuesta, nos permite sugerir que el factor de transcripción SALL2 promueve la migración celular, desconociéndose en qué etapa del proceso migratorio y a través de que genes blancos tiene un efecto. En base a estos antecedentes, se propone la siguiente hipótesis: **El factor de transcripción SALL2 promueve la migración celular en fibroblastos embrionarios de ratón.**

2.2 OBJETIVO GENERAL:

Determinar el rol del factor transcripción SALL2 en el proceso migratorio y en las diferentes etapas de la migración celular.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- **Determinar el efecto de la deficiencia de SALL2 en la migración celular.**

2.- **Determinar el rol de SALL2 en las diferentes etapas de la migración celular.**

2.1.- Analizar el rol de SALL2 en la polaridad celular.

2.2.- Analizar el rol de SALL2 en la formación de estructuras migratorias (lamelipodios y filopodios).

2.3.- Analizar el rol de SALL2 en el “spreading” (expansión) celular.

2.4.- Analizar el rol de SALL2 en la adhesión celular.

2.5.- Analizar el rol de SALL2 en la dinámica de las adhesiones focales.

3.- **Determinar posibles blancos transcripcionales de SALL2 que medien su efecto en la migración celular.**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES:

Plásmidos:

- pCMV-dR8.2
- pCMV-VSVG
- pLKO scrambled
- pLKO shSall2 (de secuencia:
CCGGAAGTCATGGATACAGAGCACACTCGAGTG
TGCTGTATCCAT GACTTTTTTTTG)

Anticuerpos y Fluoróforos:

(I: Inmunofluorescencia, WB: *Western Blot*)

- Anticuerpo anti SALL2: HPA004162, Atlas Antibodies (WB: 1:1000)
- Anticuerpo anti fosfo-FAK (Tyr397): cs-3283, Cell Signaling (WB: 1:2000)
- Anticuerpo anti FAK (H-1): sc-1688, Santa Cruz (WB: 1:500)
- Anticuerpo anti GAPDH: sc-32233, Santa Cruz (WB: 1:40000)
- Anticuerpo anti β -Actina (AC-15): sc-69879, Santa Cruz (WB: 1:20000)
- Anti-conejo-HRP: sc-2314, Santa Cruz (WB: 1:10000)
- Anti-ratón-HRP: sc-2004, Santa Cruz (WB: 1:10000)
- Anticuerpo anti Vinculina (Clon VIN-11-5): V4505, Sigma-Aldrich (I: 1:100)
- Anticuerpo anti fosfo-Paxilina (Tyr118): 44-722G, Invitrogen (I: 1:20)
- Anticuerpo anti γ -Tubulina (Clon GTU-88): T6557, Sigma-Aldrich (I: 1:500)
- Anticuerpo anti mouse Alexa fluor 546, Life Technologies (I: 1:500)
- Anticuerpo anti rabbit Alexa fluor 546, Life Technologies (I: 1:500)
- Anticuerpo anti mouse Alexa fluor 633, Life Technologies (I: 1:500)
- Anticuerpo anti α -Tubulina (Clon DM1A): T9026, Sigma-Aldrich (I: 1:100)
- Faloidina Alexa 488, Life Technologies (I: 1:80)
- Hoechst, Thermo Fisher Scientific. (1:500)

3.2 MÉTODOS:

3.2.1 Aislamiento de Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).-

La obtención de células MEFs se realizó en base al protocolo descrito por Sun H. *et al.*, 2007, comenzando con la cruce entre macho y hembra ambos heterocigotos para *Sall2*, provenientes de ratones genéticamente modificados, modelo creado por el Dr. Nishinakamura (Sato A. *et al.*, 2003), generando una descendencia en la razón 1:2:1 correspondientes a ratones homocigotos *null*: heterocigotos: homocigotos *wild type* respectivamente. Posteriormente se aislaron fibroblastos a partir de embriones entre los estadíos E12.5- E14 del desarrollo embrionario. Los embriones una vez extraídos, se vertieron en una placa con 5 mL de solución de PBS 1X estéril (del inglés Phosphate Buffered Saline; stock 10X: NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ • 2 H₂O 10 mM; KH₂PO₄ 2.0 mM; agua ultrapura; pH 7.4) y fueron separados del tejido de la placenta, luego se le extrajeron y eliminaron los órganos rojos. El cuerpo de los embriones fue disgregado mediante tracción mecánica con un bisturí estéril y lavado con PBS 1X. Después el tejido triturado fue colocado en un tubo falcon de 15 mL con 5 mL de PBS 1X y centrifugado a temperatura ambiente a 1000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue eliminado y el pellet celular fue tratado con 2 ml de tripsina 0,25% con EDTA (Hyclone) e incubados a 37° C durante aproximadamente 60 minutos con agitación manual cada 15 minutos, hasta la obtención de células en suspensión.

En el paso siguiente, se adicionaron 1.5 mL de medio de cultivo DMEM completo (Hyclone; del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium con alta glucosa; al 10% FBS del inglés Fetal Bovine Serum (HyClone); 2mM L-glutamina (Hyclone) y penicilina/estreptomicina (HyClone)) resuspendiendo suavemente, luego se adicionaron 5 mL de DMEM completo, resuspendiendo nuevamente y se dejó reposar por 2 minutos. Se tomó el sobrenadante (que contiene las células) y se traspasó a placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro con DMEM completo e incubaron a 37°C y 5% CO₂ en una estufa de cultivo (Nuaire). Una vez que los

fibroblastos obtenidos llegaron a un 90% de confluencia, fueron tripsinizados y resuspendidos en medio de congelamiento compuesto de suero fetal bovino (FBS) y 10% DMSO (Santa Cruz; del inglés Dimethyl sulfoxide) y almacenados en nitrógeno líquido en pasaje cero (P0).

3.2.2 Inmortalización de MEFs utilizando Antígeno “large T” del virus de Polioma de Simio (SV40).-

La inmortalización de MEFs primarias en pasaje 4 (P4) *wild type* (*Sall2^{+/+}*) y *null* (*Sall2^{-/-}*) se llevó a cabo en base al protocolo modificado de Zhu J. *et al.*, 1991. Dentro de las modificaciones se incluyó como vector de expresión del Antígeno large T de virus de Polioma de simio, el vector pBsSVD2005 (Addgene) y como reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen). 6 horas post-transfección se realizó un cambio de medio con DMEM completo. Una vez transfectadas las MEFs primarias de ambos genotipos se procedió a seleccionar por baja densidad aquellos clones que incorporaron el antígeno large T, este procedimiento se llevó a cabo 5-6 pasajes post-transfección, de manera completar el proceso de inmortalización.

3.2.3 Generación de modelos celulares estables.-

Para la generación de un modelo celular estable que tuviese SALL2 silenciado, células MEFs (*Sall2^{+/+}*) inmortalizadas fueron sembradas en dos grupos, uno para ser transducido con un shRNA contra *Sall2* y otro con su respectivo control (shCtrl). El empaquetamiento viral se realizó a través del sistema lentiviral pLKO en base al protocolo descrito por Song B. *et al.*, 2010, que consta de tres etapas: la generación de las partículas virales, la infección y la selección.

3.2.3.1 Generación de las partículas virales.-

Para la obtención de las partículas virales se utilizaron células HEK293T como células empaquetadoras. Para la generación de MEFs inmortalizadas con SALL2 silenciado, células HEK293T fueron cotransfectadas con 2 plásmidos para el empaquetamiento viral pCMV-dR8.2 y pCMV-VSVG (Addgene) y otro portador del shRNA (pLKO shSall2). Para el caso del control, células HEK293T fueron cotransfectadas con los plásmidos para el empaquetamiento viral y otro portador del shRNA control (pLKO scrambled). La cotransfección para cada uno de los casos se realizó en una relación 3:1:1. Luego de 12 horas de la transfección se realizó cambio de medio DMEM completo con la finalidad de producir partículas virales, para realizar nuevas rondas de infección.

3.2.3.2 Infección.-

La infección se realizó 24 horas después de la transfección. En dicha etapa se colectó y se filtró el medio de las células HEK293T transfectadas, con filtros de 0.45 μm . Luego el medio filtrado se traspasó a un tubo falcón de 15 ml, donde se agregó Polibreno 8ug/ml (Sigma-Aldrich), con la finalidad de favorecer la transducción viral. Luego a las células blanco (MEFs inmortalizadas) se le cambió el medio agregando el medio filtrado que contenía las partículas virales + polibreno para la infección. La etapa de infección se repitió tres veces siguiendo la metodología descrita.

3.2.3.3 Selección.-

La etapa de selección se realizó después de 24 horas de la última infección. Para ello, se cambió el medio de infección, por medio DMEM completo + 50ug/ml de Puomicina (CalbioChem). Esta droga se utilizó como marcador de selección de

aquellas células que habían sido infectas, durante cuatro días. Después de la selección se evaluó el silenciamiento a través de *western blot*.

3.2.4 Técnicas de proteínas.-

3.2.4.1 Obtención de extractos totales de proteínas y preparación de muestras.-

Para la obtención de proteínas, las células se homogenizaron con tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 10% glicerol; 200 mM NaCl₂; 2,5 mM MgCl₂; 1% Tritón X-100) en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich). Los extractos celulares fueron centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C y luego se determinó la concentración de proteínas totales por el método Bradford (BioRad), (Bradford M., 1976), utilizando el espectrofotómetro Optizen POP. Finalmente las muestras se desnaturalizaron a 100°C por 3 minutos con solución de carga en presencia de DTT (Ditiotreitol).

3.2.4.2 Separación de proteínas por SDS-PAGE.-

Esta fue llevada a cabo por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, compuestos de un gel concentrador (Tris-HCl, 250 mM, dodecil sulfato sódico (SDS) 7mM, 30% acrilamida: 1% bis acrilamida; pH 6,8) y un gel separador (Tris-HCl 375 mM, SDS 3,5 mM; pH 8,8). Para polimerizarlos se adicionó persulfato amónico (APS 10%) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina). La electroforesis se realizó a voltaje constante de 90 volts en tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,05%. Los sistemas de preparación y corrida de geles utilizados fueron Bio-Rad.

3.2.4.3 Western blot.-

Para la detección de proteínas específicas, los geles de poliacrilamida resueltos por SDS-PAGE fueron transferidos a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF, Millipore) usando una solución de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanol). La transferencia se realizó a 4°C durante toda la noche a 30 volts. Los sitios inespecíficos de la membrana se bloquearon con 5% p/v de leche descremada o gelatina (en el caso de fosfo-FAK) en TBS-tween (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% v/v Tween20) durante 1 hora o 4 horas, respectivamente. Posteriormente se incubó por 2 horas con anticuerpo primario, luego las membranas fueron lavadas en TBS-tween e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti IgG de ratón o conejo acoplado a peroxidasa (BioRad), en base al protocolo modificado de Towbin *et al.*, 1979. Finalmente, las proteínas se visualizaron con el sistema quimioluminiscente ECL (GE Healthcare).

3.2.5 Ensayos de Migración celular.-

3.2.5.1 Cierre de herida.-

Con el objetivo de analizar la migración celular, se procedió a la siembra de una densidad subconfluyente de células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} y MEFs shControl y shSall2 en placas de 12 pocillos, respectivamente. Las células MEFs fueron cultivadas en DMEM completo al 10% de FBS e incubadas a 37°C en 5% CO₂. A las 24 horas de cultivo, se procedió a hacer una brecha con una punta de pipeta en la monocapa de células, luego se adicionó medio DMEM sin suero (hora 0) en base al protocolo de Miller N. *et al.*, 2012. Se tomaron fotografías con magnificación 10X a las 24 horas posteriores a la realización de la herida y en paralelo se evaluó, en porcentaje, el cierre de las respectivas heridas para ambos genotipos y del modelo estable con Sall2 silenciado a través de la medición de la

distancia existente entre los bordes que constituyen la herida, para esto se utilizó el programa imageJ.

3.2.5.2 Cuantificación de la migración celular a través de insertos *Transwell*.

Con la finalidad cuantificar el proceso migratorio, se utilizaron insertos permeables *Transwell* de 6.5 mm con poros de membrana de 8µm de tamaño (Corning). Se procedió a cubrir la cara inferior de los insertos con 2 µg/ml de Fibronectina (Sigma-Aldrich) e incubar a 4°C la noche previa del experimento. Al día siguiente, los insertos fueron lavados con PBS 1X y secados por 30 minutos, posteriormente se sembró una concentración de 10⁴ células/mL de MEFs inmortalizadas (*Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-}) en la cara superior de cada inserto en DMEM libre de suero, para luego ser incubadas por 3-4 horas a 37°C en 5% CO₂. El ensayo finalizó con la eliminación de las células que quedaron en la cara superior del inserto, lavando repetidas veces con PBS 1X (Mendoza P. *et al.*, 2015). A continuación, se procedió a fijar y teñir las células ubicadas en la cara inferior de los respectivos insertos adicionando 1 mL de solución fijadora (10% v/v ácido acético, 10% v/v metanol) que se dejó actuar por 10 minutos, luego se incorporó 1 mL de solución cristal violeta al 0.4% p/v por 10 minutos, se lavó el excedente de solución colorante y se dejó secar a temperatura ambiente (Quilliam L. *et al.*, 2001). Finalmente se cuantificó el número de células a través del programa imageJ.

3.2.6 Inmunocitoquímica.-

Para los ensayos de inmunodetección por microscopía de fluorescencia, se sembraron 8 x 10⁴ células MEFs inmortalizadas (*Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-}) sobre vidrios de 15mm contenidos en placas de 12 pocillos, en condiciones de DMEM completo al 10% FBS e incubadas a 37°C y 5% CO₂. A las 24 horas de cultivo, se procedió a hacer una brecha con una punta de pipeta biselada en la monocapa de células, se

adicionó medio DMEM carente de suero (hora 0) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. 16 horas post realización de herida, se procedió a fijar las células en 4% paraformaldehído (PFA) (Merck) /PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente, después se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos. Para permeabilizar las células se trataron con una solución de 0,1% TRITON X-100 (AppliChem) /PBS por 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a realizar 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos. Posteriormente, se bloqueó e incubó con el anticuerpo primario con una solución de BSA 3% (Merck) / PBS 1X por toda la noche a 4°C (o 2 horas a temperatura ambiente).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anticuerpo anti fosfo-Paxilina para estudiar el número y direccionalidad de las adhesiones focales y anticuerpo anti γ -Tubulina usado como marcador de polaridad celular. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario correspondiente en BSA 1% / PBS 1X por 2 horas a temperatura ambiente, en caso de requerir Faloidina y/o Hoechst en el experimento, se incubó en conjunto a este. Finalmente, se montaron las células en medio de montaje fluorescente (Dako) para su posterior análisis bajo microscopía confocal (Microscopio espectral confocal LSM780 NLO Zeiss (objetivo 40X)), protocolo modificado de Campos T. *et al.*, 2016.

3.2.7 Ensayo de “spreading” (expansión) celular.-

Con el objetivo de analizar la expansión celular, se sembraron 7×10^4 células MEFs inmortalizadas *Sal12*^{+/+} y *Sal12*^{-/-} en placas de 6 pocillos, en condiciones de DMEM completo al 10% FBS e incubadas a 37°C y 5% CO₂. Una vez transcurridos 15 minutos de incubación (tiempo inicial), se tomaron registros fotográficos con magnificación 10X a diferentes tiempos: 30-45-60 y 120 minutos con el objetivo de calcular en porcentaje el incremento de área celular en los

diferentes tiempos monitoreados, para esto se utilizó el programa imageJ. Protocolo modificado de Mendoza P. *et al.*, 2013.

3.2.8 Ensayos de adhesión celular.-

3.2.8.1 Previo expansión celular.-

Con la finalidad de evaluar la adherencia celular evitando la expansión de las células, se sembró 8×10^4 células MEFs inmortalizadas *Sall2^{+/+}* y *Sall2^{-/-}* en placas de 12 pocillos, en condiciones de DMEM completo al 10% FBS e incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 20 minutos para permitir la adhesión. Luego, las placas fueron sometidas a agitación por 5 minutos a 50 rpm, se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con PBS 1X (modificado de Liu H. *et al.*, 2016). Finalmente las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta (como se describió anteriormente) y se procedió a solubilizar el colorante con ácido acético al 10% (Merck). Se recuperó la tinción y se midió la absorbancia a 590nm, la absorbancia es proporcional al número de células que se encuentran adheridas. Control positivo: células MEFs incubadas por un periodo de 3 horas, control negativo: sin siembra de células.

3.2.8.2 Tratamiento con solución de EDTA.-

Para llevar a cabo este ensayo, se sembró 8×10^4 células MEFs inmortalizadas *Sall2^{+/+}* y *Sall2^{-/-}* en placas de 12 pocillos en DMEM completo al 10% FBS e incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 24 horas. Luego de este tiempo, las placas fueron lavadas con PBS 1X y tratadas a diferentes intervalos de tiempos con una solución de EDTA (del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid) de concentración 0,05mM, 0,1mM y 0,2mM respectivamente. Posteriormente, se retiró la solución de EDTA y las células adheridas fueron fijadas y teñidas con cristal violeta, tinción que fue recuperada (como se describió anteriormente) y se midió la absorbancia a

590nm utilizando un espectrofotómetro, en base al protocolo de Zagórska A. *et al.*, 2012. Control positivo: células MEFs sin tratamiento, control negativo: sin siembra de células.

3.2.9 Análisis de la dinámica de adhesiones focales.-

Con el objetivo de evaluar el ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales, se procedió a cubrir vidrios de 10mm contenidos en placas de 24 pocillos con 2 µg/ml de fibronectina por 1 hora a 37°C. A continuación, se sembraron 2 x 10⁴ células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} en DMEM completo al 10% FBS e incubaron a 37°C y 5% CO₂ por 24 horas, luego de este tiempo se procedió a tratar las células con 10µM de Nocodazol (Sigma-Aldrich) en medio DMEM carente de suero por 2 horas y media. Posterior al tratamiento, el nocodazol fue lavado con DMEM sin suero seguido de la incubación de las células a diferentes tiempos: 0, 5, 10, 15 y 30 minutos respectivamente. Finalmente, se llevó a cabo la técnica de inmunocitoquímica (descrita anteriormente), utilizando como anticuerpo primario para detectar las adhesiones focales (cuantificadas utilizando el programa ImageJ) el anticuerpo anti Vinculina. (Mendoza P. *et al.*, 2013).

3.2.10 Detección de fosfo-FAK (Tyr397) y FAK total durante la expansión celular.-

Para la detección de estas proteínas específicas, a placas de 100mm con células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} respectivamente, se les adicionó tripsina 0,25% con EDTA por 2 minutos para luego inactivar la acción de la tripsina con 8 mL de DMEM sin suero, se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 1 mL de DMEM sin suero. Una vez resuspendido el pellet y mantenido a 4°C, se procedió a realizar 3 siembras separadas con un intervalo de tiempo de 15 minutos cada una, dichas siembras

fueron realizadas en placas de 60mm con DMEM completo (placas previamente cubiertas con 2 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina por toda la noche a 4°C (o 1 hora a 37°C)). Transcurridos 30 minutos de incubación correspondiente a la siembra 1 y 2, se procedió a realizar la tercera siembra de células (tiempo 0) e inmediatamente después se recolectó el sobrenadante de cada siembra por separado y se centrifugó a 2000 rpm por 8 minutos. A las placas que contienen las células adheridas, se les adicionó directamente 100 μl de tampón de lisis frío en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas y se obtuvo los extractos celulares por arrastre mecánico.

Posteriormente, se incorporó en un tubo eppendorf de 1,5 mL el lisado celular más el pellet derivado de la recolección del sobrenadante y se procedió a centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C y a denaturar las muestras a 100°C por 3 minutos con solución de carga en presencia de DTT (Ditiotreitol) (Mendoza P. *et al.*, 2013). Finalmente se llevó a cabo la separación de proteínas por SDS-PAGE y su detección por *western blot* (como se describió anteriormente) de fosfo-FAK (Tyr397), FAK total y β -Actina como control de carga.

3.2.11 Análisis estadístico.-

Para realizar el análisis estadístico de todos los datos obtenidos en cada uno de los experimentos realizados, se utilizó la herramienta estadística del programa GraphPad Prism 5, en donde se determinó el nivel de significancia basándose en el test t-Student no pareado, con un intervalo de confianza del 95%.

4. RESULTADOS

4.1 OBJETIVO 1: Determinar el efecto de la deficiencia de SALL2 en la migración celular.-

Como se mencionó anteriormente, la carencia de SALL2 conlleva a fallas en el cierre de la fisura óptica (Kelberman D. *et al.*, 2014) y en la generación de neuritas (Pincheira R. *et al.*, 2009). Fallas en estos procesos se relacionan con defectos en la migración celular, siendo el factor en común la carencia de SALL2. Es importante mencionar que a la fecha no existe una investigación concreta que determine el efecto de SALL2 en el proceso migratorio.

Debido a estos antecedentes, adquiere gran relevancia determinar el rol de SALL2 en la migración celular. Para esto, los modelos inmortalizados de MEFs *Sall2* wild type (*Sall2*^{+/+}) y *Sall2* null (*Sall2*^{-/-}) y MEFs *Sall2*^{+/+} shControl y sh*Sall2*, fueron validados a través de la técnica de *western blot*. Como se muestra en la figura 8 (A-B), la expresión de la proteína SALL2 (150 KDa) es detectada en el modelo MEFs *Sall2*^{+/+} y MEFs *Sall2*^{+/+} shControl a diferencia de las células MEF *Sall2*^{-/-} y en menor grado en el caso de las MEFs sh*Sall2*.

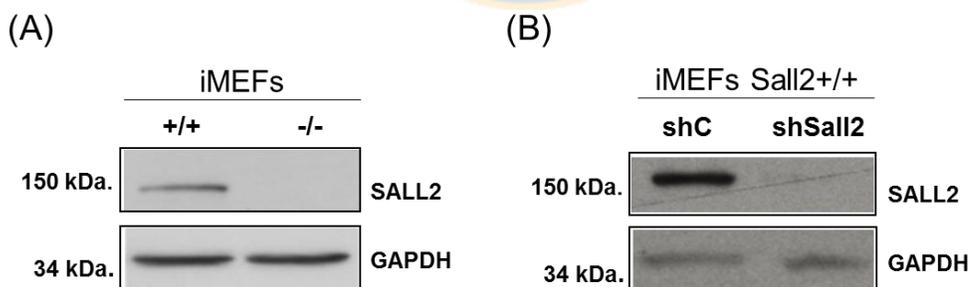


Figura 8: Análisis de los niveles de expresión de SALL2 en células MEFs inmortalizadas. Blot representativo de los niveles de SALL2, realizado a partir de extractos de células MEF *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} (A) y células MEF *Sall2*^{+/+} shControl y sh*Sall2* (B) cultivadas en condiciones de DMEM completo. Como control de carga se utilizó GAPDH. Fuente: Elaboración propia.

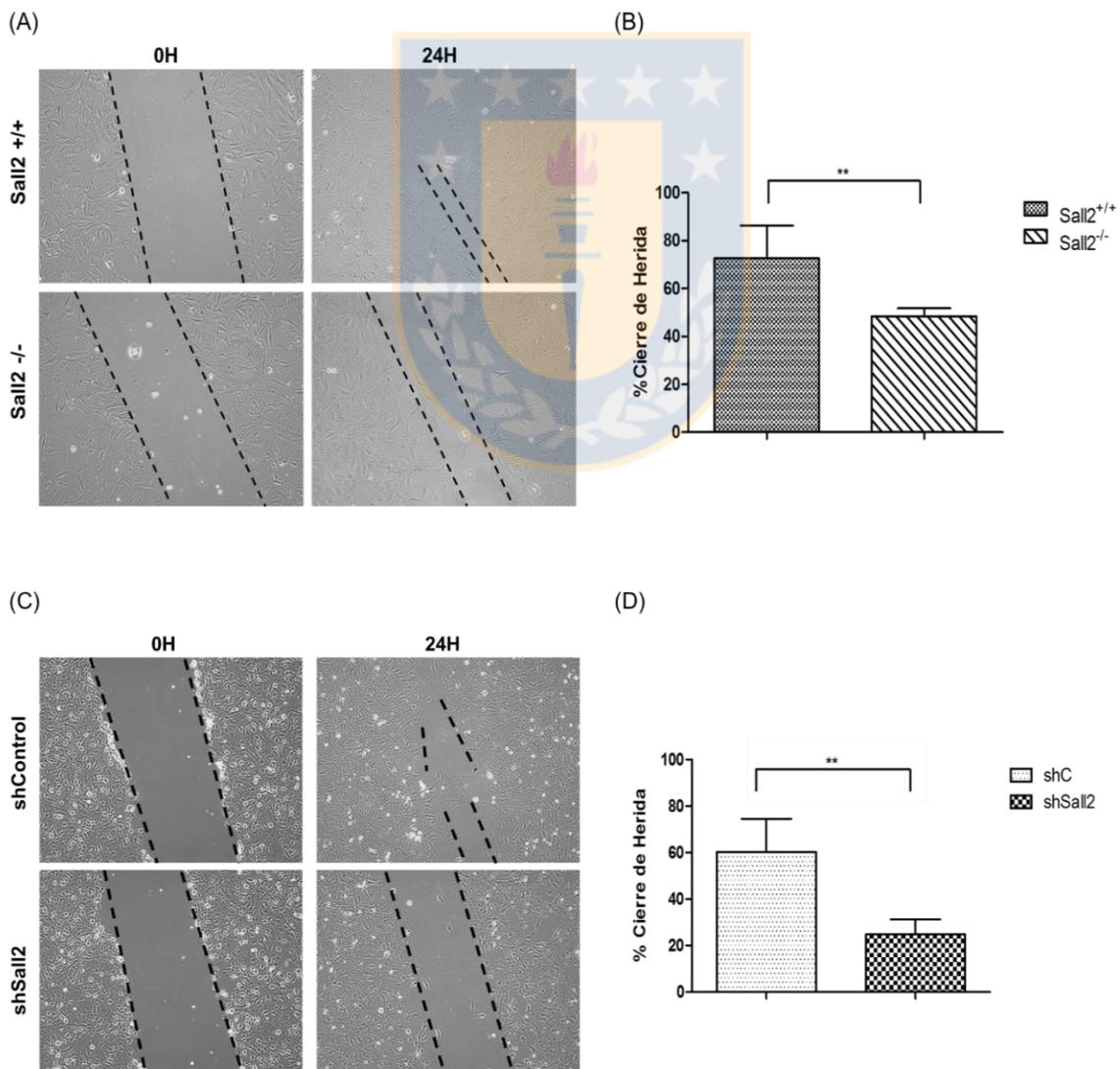
Una vez validado los niveles de proteína SALL2 en los respectivos modelos, estos fueron sometidos a un ensayo de cierre de herida que tiene como objetivo evaluar su capacidad de migrar en presencia o ausencia de SALL2. El ensayo de cierre o cicatrización de herida, se basa en realizar una brecha o herida a una monocapa confluyente de células, y luego observar en función del tiempo, el movimiento de las células del borde de dicha herida hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida (Vedula *et al.*, 2013). Para este ensayo se sembró una densidad subconfluyente de ambos modelos celulares, luego de alcanzar un 100% de confluencia las células fueron privadas de suero (para evitar el proceso de proliferación) y se realizó una herida con una punta de pipeta. Al cabo de 24 horas se monitoreó y cuantificó el cierre de las respectivas heridas con respecto al área de la herida a la hora 0, correspondientes a cada modelo.

A continuación, se muestra una imagen representativa del ensayo de cierre de herida 24 horas posteriores a la realización de la brecha y su respectiva cuantificación, donde se observa que ésta es significativamente menor en células MEFs *Sall2*^{-/-}, comparado con el fenotipo de MEFs *Sall2*^{+/+} (p= 0.0049). Similar a este resultado, las células MEFs sh*Sall2* presentan un porcentaje de cierre de herida significativamente menor comparando con las células shControl (p= 0.0040) (Figura 9 A-D).

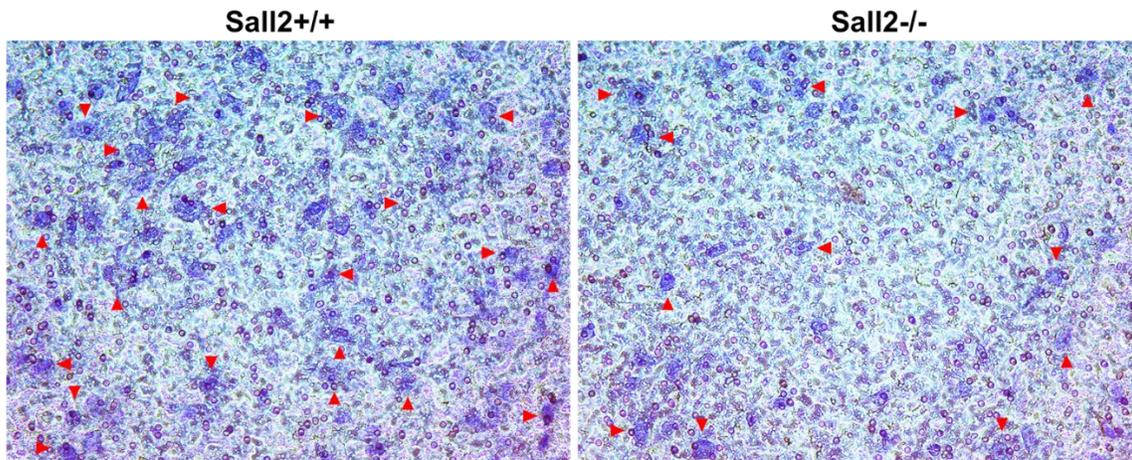
Adicionalmente, las células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} inmortalizadas fueron sometidas a un ensayo de *Transwell* con la finalidad de cuantificar el proceso migratorio de células individuales. Para llevar a cabo este experimento, se procedió a cubrir con fibronectina (glicoproteína perteneciente a la matriz extracelular que media el proceso de adhesión de las células a la matriz) la cara inferior de los insertos *Transwell* (Rodríguez L. y Schneider IC., 2013). Posteriormente las células fueron sembradas en la cara superior de cada inserto y se mantuvieron en medio libre de suero por 3-4 horas. Finalmente las células que migraron a la cara inferior del inserto fueron fijadas y teñidas con una solución de cristal violeta.

La figura 9 (E-F) muestra imágenes representativas de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} ubicadas en la cara inferior de los insertos, después de haber sido teñidas. La cuantificación de células que migraron (cara inferior del inserto) fue llevada a cabo contando el número de células a través de la herramienta “cell counter” de imageJ. A partir de este ensayo se observa que el número de células MEFs *Sall2*^{-/-} que migraron es significativamente menor comparado con las células MEFs *Sall2*^{+/+} ($p = 0.0001$).

En conjunto estos datos sugieren que el **factor de transcripción SALL2 es requerido para la migración celular.**



(E)



(F)

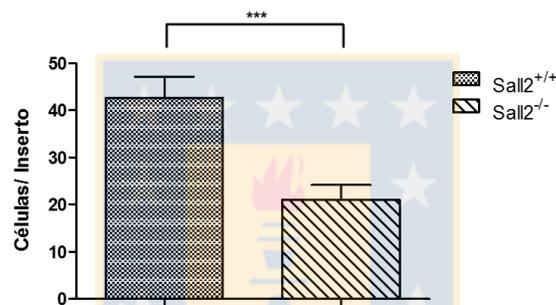


Figura 9: SALL2 es requerido para la migración celular. (A) Imagen representativa de la herida realizada en células MEFs de ambos genotipos (*Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-}) a las 0 y 24 horas post-herida, respectivamente (magnificación de 10X), (B) cuantificación del porcentaje de cierre de herida, a través del uso de la herramienta imageJ. Resultado representativo de dos experimentos independientes cada uno en quintuplicado. (C) Imagen representativa de la herida realizada en células MEFs shControl y shSall2 a las 0 y 24 horas post-herida, respectivamente (magnificación de 10X), (D) cuantificación del porcentaje de cierre de herida, utilizando imageJ. Resultado representativo de un experimento independiente en cuadruplicado. (E) Imágenes representativas de la cara inferior de cada inserto correspondiente a células MEFs de ambos genotipos *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} (magnificación de 10X). (F) Cuantificación del número de células MEFs que migraron a la cara inferior del inserto, utilizando imageJ. Puntas de flechas rojas indican células MEFs que atravesaron el poro de la cara inferior del inserto *Transwell*. Resultado representativo de dos experimentos independientes cada uno en quintuplicado. (**, *** Indica p <0.05 basado en el test t-Student no pareado). Fuente: Elaboración propia.

4.2 OBJETIVO 2: Determinar el rol de SALL2 en las diferentes etapas de la migración celular.-

Después de demostrar que el factor de transcripción SALL2 es requerido para la migración celular, procedimos a evaluar la función de SALL2 en las distintas etapas que permiten la migración celular. El objetivo fue esclarecer en qué etapa(s) de la migración SALL2 posee un mayor efecto y por consiguiente a través de qué mecanismos y blancos transcripcionales podría estar ejerciendo su rol.

4.2.1 Analizar el rol de SALL2 en la polaridad celular.-

La polaridad celular corresponde al primer paso del proceso migratorio y se caracteriza por el establecimiento de un frente migratorio y una región posterior que se diferencian tanto en estructura como en función. En el caso de fibroblastos, la polarización se evidencia en la reorganización de organelos y estructuras específicas dirigidas hacia el frente migratorio, tales como el aparato de Golgi, centrosoma, citoesqueleto de microtúbulos y estructuras de actina (Etienne-Manneville S., 2004). Una falla en esta etapa afectaría las siguientes etapas de la migración celular, consecuentemente el proceso migratorio en su totalidad (Etienne-Manneville S., 2004).

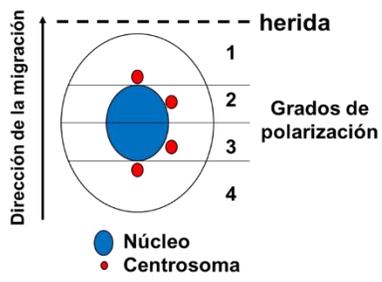
Con la finalidad de evaluar el rol de SALL2 en la polaridad celular, células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron sembradas en condiciones de medio completo y una vez que alcanzaron el 100% de confluencia, se procedió a realizar una herida con la finalidad de inducir la migración celular, evitando a su vez la proliferación celular adicionando un medio de cultivo carente de suero. A las 16 horas posteriores a la realización de la herida, se procedió a la inmunodetección por microscopía de fluorescencia de la reorientación del centrosoma utilizando un anticuerpo anti γ -Tubulina (Silverman-Gavrila R. *et al.*, 2011).

Una vez visualizado el centrosoma, se establecieron grados de polaridad (grado 1, grado 2, grado 3 y grado 4) en base a la localización del centrosoma respecto al núcleo y al eje migratorio (Figura 10 A), siendo el grado 1 indicativo de una célula altamente polarizada (centrosoma anterior al núcleo), el grado 2 indicativo de una célula polarizada (centrosoma anterior al plano medio del núcleo, pero detrás del borde anterior del núcleo), el grado 3 indicativo de una célula no polarizada (centrosoma posterior al plano medio del núcleo, pero anterior al borde posterior del núcleo) y el grado 4 indicativo de una célula altamente no polarizada (centrosoma posterior al núcleo). Asimismo, se consideró como células polarizadas aquella que presente el grado de polarización 1 o 2 y como células no polarizadas aquella que presente el grado de polarización 3 o 4 (Silverman-Gavrila R. *et al.*, 2011).

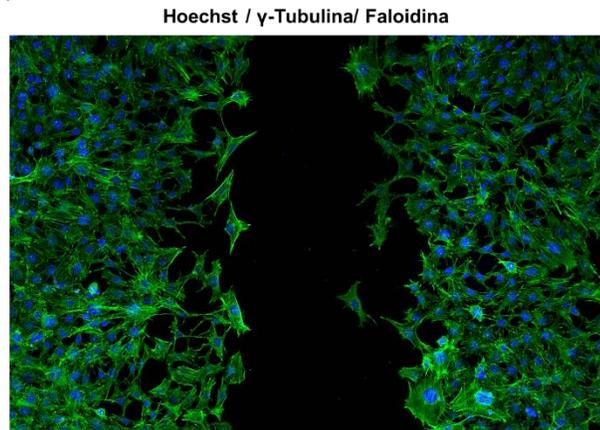
La figura 10 muestra imágenes obtenidas mediante microscopía confocal y sus respectivos análisis utilizando el programa ImageJ, donde se observa que no existen diferencias significativas ($p= 0.6284$) en el estado de polarización general (grado 1 más grado 2) entre las células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-}. Es importante destacar que las células MEFs de ambos genotipos presentan un estado de polarización aproximado de un 70%, lo que es indicativo de que se encuentran polarizadas (Figura 10 D-E).

Por otro lado, al analizar por separado cada uno de los grados de polaridad previamente establecidos, se observa que las células MEFs carentes del factor de transcripción SALL2 presentan un estado de polarización mayoritariamente de grado 2 (grado de polaridad menor). A diferencia de lo que ocurre en células MEFs *Sall2*^{+/+}, cuyo estado de polarización en su mayoría corresponde al más alto grado de polarización (grado 1). Las diferencias en relación al porcentaje de células MEFs que presentan el grado 1 de polarización son significativas ($p= 0,0084$) (Figura 10 F).

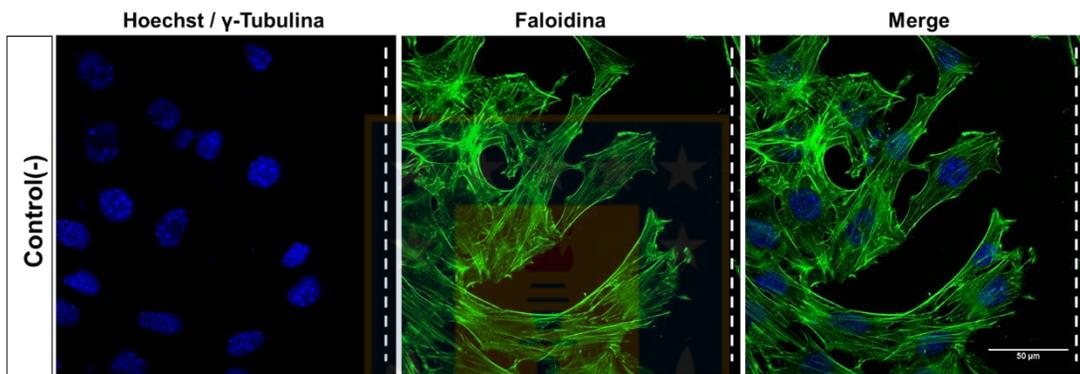
(A)



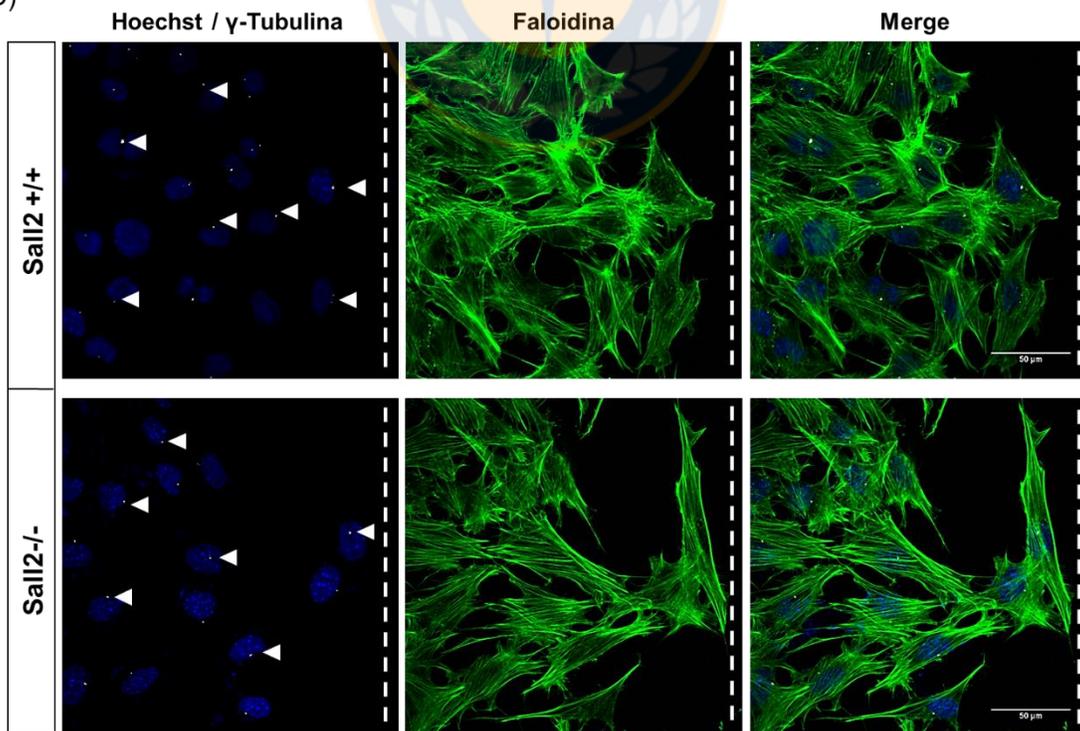
(B)



(C)



(D)



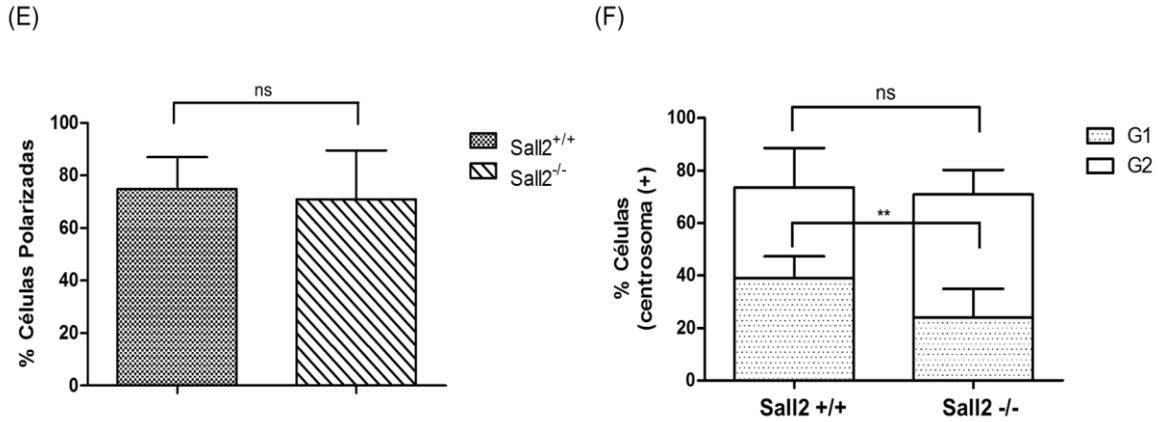


Figura 10: SALL2 favorece estados altamente polarizados a horas tardías. (A) Esquema representativo de célula migratoria en donde se muestran los 4 grados de polarización (G1= altamente polarizada, G2=medianamente polarizada, G3= medianamente no polarizada y G4= altamente no polarizada), basándose en la ubicación del centrosoma respecto al núcleo y al eje migratorio (herida). (B) Imagen de microscopía confocal panorámica (magnificación de 20X) de células MEFs a las 16 horas posteriores a realización de herida. (C-D) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (magnificación de 40X) de células MEFs ubicadas en los bordes de la herida realizada, donde se observa los filamentos de actina (en verde), centrosomas (en blanco, señalados por puntas de flechas) y núcleos (en azul), línea punteada blanca indica eje migratorio (herida). (E) Cuantificación del porcentaje de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} que se encuentran polarizadas (G1 más G2) utilizando el programa imageJ. (F) Cuantificación del porcentaje de células MEFs que presentan un alto grado de polarización (G1) y un mediano grado de polarización (G2) utilizando imageJ (**indica p <0.05 basado en el test t-Student no pareado). Resultado representativo de un experimento independiente con cuatro replicas biológicas. Número de células analizadas n=100. Fuente: Elaboración propia.

Utilizando el mismo criterio de grados de polaridad (grado 1, grado 2, grado 3 y grado 4) empleado para evaluar el estado de polarización a las 16 horas se evaluó la polaridad celular a horas tempranas (4 horas posteriores a la realización de la herida). Similar al resultado obtenido a tiempos más tardíos, no se observaron

diferencias significativas ($p= 0.2653$) en el estado de polarización (grado 1 más grado 2) entre las células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-}. Presentando las células MEFs de ambos genotipos un estado de polarización aproximado de un 70% (Figura 11 A- B). Por otro lado, al evaluar el porcentaje de células que se encuentran en un alto y mediano grado de polaridad, G1 o G2 respectivamente, no se observaron diferencias significativas en presencia o ausencia de *Sall2* ($p=0.8247$) (Figura 11 C).

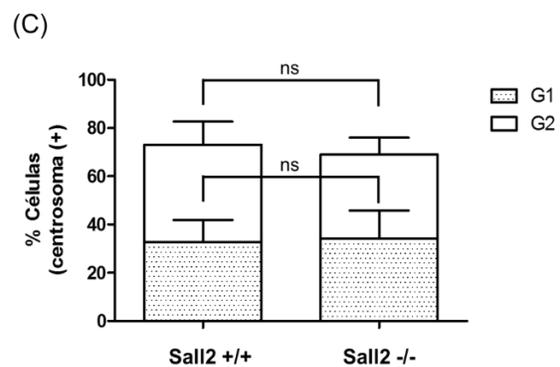
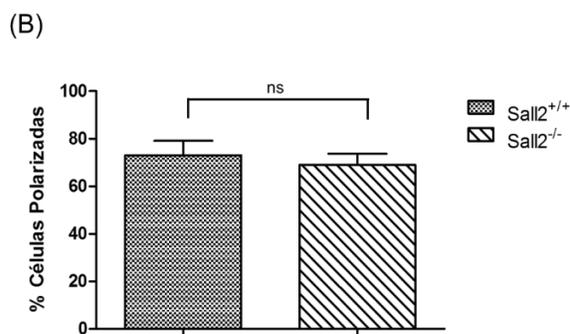
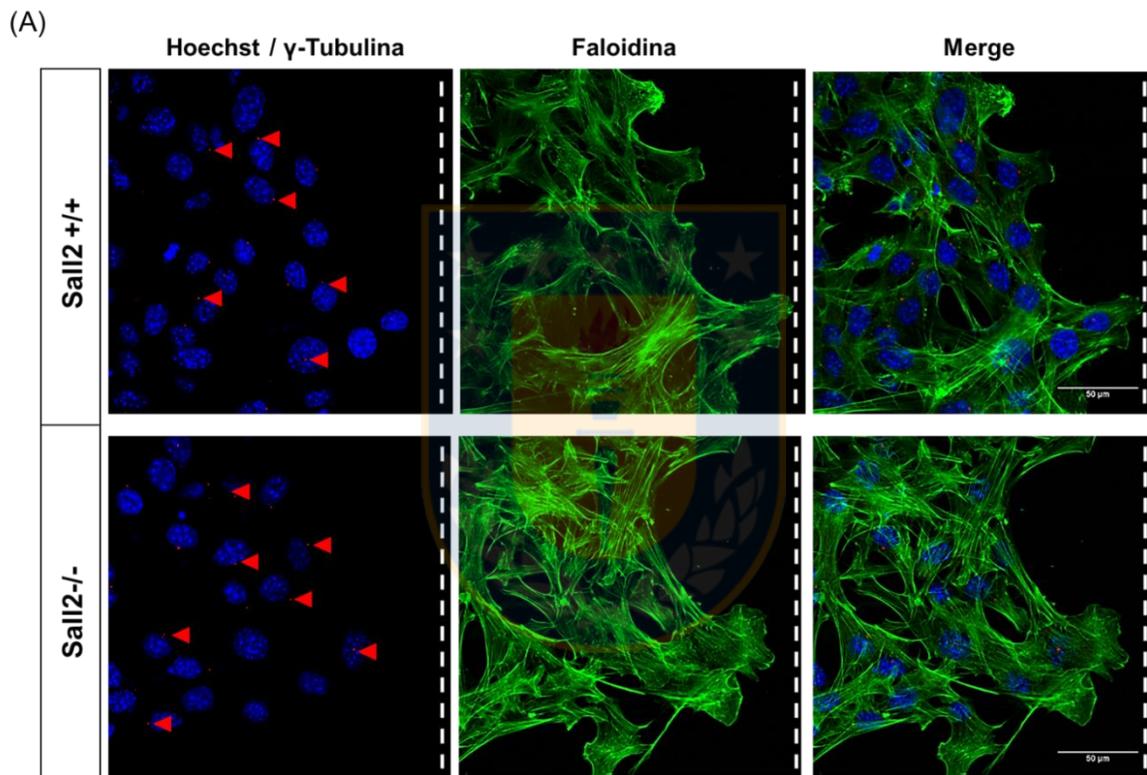


Figura 11: SALL2 no favorece estados altamente polarizados a horas tempranas. (A)

Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (magnificación de 40X) de células MEFs ubicadas en los bordes de la herida realizada, donde se observa los filamentos de actina (en verde), centrosomas (en rojo, señalados por puntas de flechas) y núcleos (en azul), línea punteada blanca indica eje migratorio (herida). (B) Cuantificación del porcentaje de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} que se encuentran polarizadas (G1 más G2) utilizando el programa imageJ. (C) Cuantificación del porcentaje de células MEFs que presentan un alto grado de polarización (G1) y un mediano grado de polarización (G2) utilizando imageJ. Análisis estadístico en base al test t-Student no pareado. Resultado representativo de un experimento independiente. Número de células analizadas n=100. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados aquí obtenidos nos permiten inferir que el **factor de transcripción SALL2 regula la polaridad celular, favoreciendo estados altamente polarizados.**

4.2.2 Analizar el rol de SALL2 en la formación de estructuras migratorias (lamelipodios y filopodios).

Se procedió a evaluar el efecto de SALL2 sobre la generación de lamelipodios y filopodios, estructuras migratorias que presentan un reordenamiento diferencial del citoesqueleto de actina y funciones específicas (Blanchoin L. *et al.*, 2014). Células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron sembradas en condiciones de medio completo y una vez que alcanzaron el 100% de confluencia, se procedió a realizar una herida de manera de inducir la migración celular, evitando la proliferación celular adicionando un medio de cultivo carente de suero. A las 16 horas posteriores a la realización de la brecha, se procedió a la detección por microscopía de fluorescencia de los filamentos de actina utilizando una sonda de faloidina acoplada a un fluoróforo (Alexa-488). Una vez detectados los filamentos de actina, se consideró como filopodios a aquellas estructuras digitiformes que

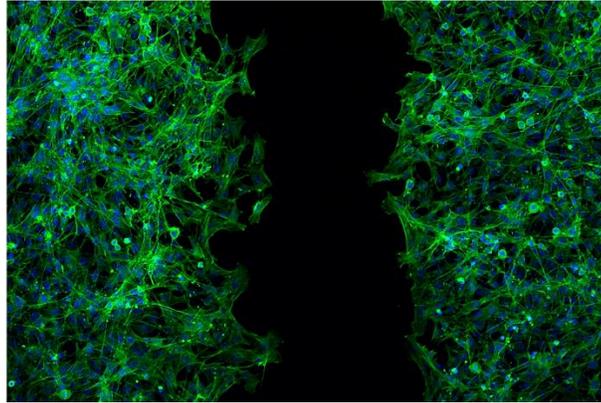
presentan filamentos de actina paralelos y como lamelipodios aquellas estructuras con una red bi-dimensional de filamentos de actina (Blanchoin L. *et al.*, 2014).

El estudio del efecto de SALL2 en la generación de protrusiones membranas, incluyó los siguientes análisis para el caso de filopodios: número de filopodios por célula, longitud promedio de los filopodios por célula y direccionalidad de los filopodios considerando como direccionados aquellos que estaban en dirección al eje migratorio (herida) y como no direccionados aquellos con una dirección opuesta al eje migratorio. Similar a los análisis aplicados para el caso de los filopodios, los análisis para los lamelipodios fueron los siguientes: número de lamelipodios por célula, área promedio de los lamelipodios por célula y direccionalidad de los lamelipodios (en base al mismo criterio utilizado en el caso de los filopodios).

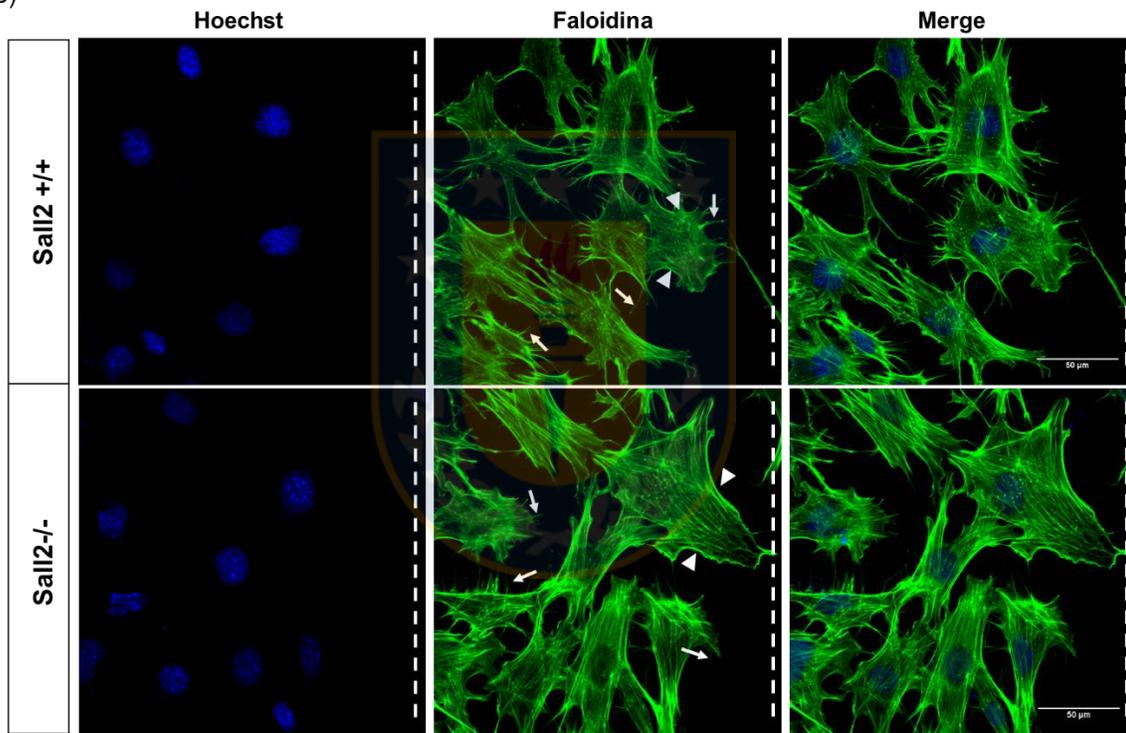
La figura 12 B muestra imágenes obtenidas mediante microscopía confocal y sus respectivos análisis utilizando el programa ImageJ. Se observa que no existen diferencias significativas en el número de filopodios por célula ($p=0.4738$), en la longitud promedio de los filopodios por célula ($p=0.3847$) y en la direccionalidad de los filopodios ($p=0.7280$) entre genotipos. Además, en ambos genotipos los filopodios se encuentran en un gran porcentaje, alrededor de un 60%, direccionados (Figura 12 C-E). Similar a lo observado en el caso de los filopodios, no se evidencian diferencias significativas en el número de lamelipodios por célula ($p=0.5795$), en el área promedio de los lamelipodios por célula ($p=0.7485$) y en la direccionalidad de los lamelipodios ($p=0.1786$) que en un gran porcentaje, alrededor de un 60%, se encuentran direccionados (Figura 12 F-H).

En base a los resultados aquí obtenidos podemos inferir que el **factor de transcripción SALL2 no afecta la morfología celular, ya que no se observó diferencia en la formación de las protrusiones membranas de tipo filopodios y lamelipodios, a las 16 horas posteriores a la inducción de la migración.**

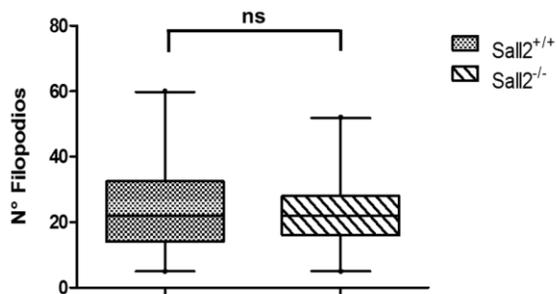
(A) Hoechst / Faloidina



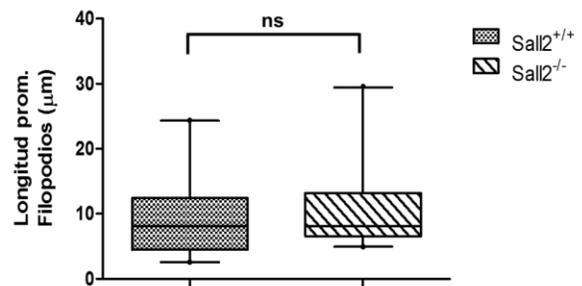
(B)



(C)



(D)



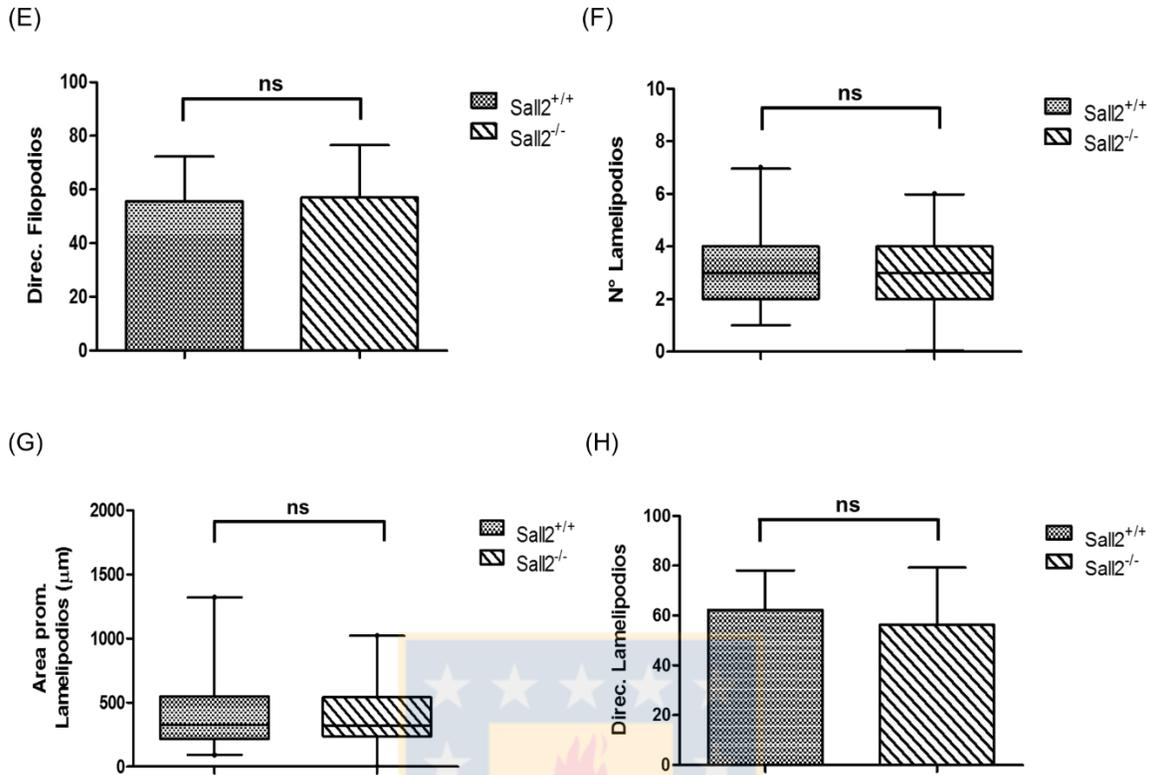


Figura 12: SALL2 no afecta la formación de las protrusiones membranas a las 16 horas post-realización de herida. (A) Imagen de microscopía confocal panorámica (magnificación de 20X) de células MEFs a las 16 horas posteriores a realización de herida. (B) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (magnificación de 40X) de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} ubicadas en los bordes de la herida, donde se observa los filamentos de actina (en verde) y núcleos (en azul). (C) Análisis y cuantificación del número de filopodios por célula, (D) cuantificación de la longitud promedio de filopodios por célula, (E) cuantificación de direccionalidad de filopodios respecto al eje migratorio. (F) Cuantificación del número de lamelipodio por célula, (G) cuantificación del área promedio de lamelipodios por célula y (H) cuantificación de direccionalidad de los lamelipodios. Línea punteada blanca indica eje migratorio (herida), flechas señalan filopodios y puntas de flechas indican lamelipodios. Análisis estadístico en base al test t-Student no pareado, utilizando el programa ImageJ. Resultado representativo de un experimento independiente con cuatro replicas biológicas. Número de células analizadas n= 40. Fuente: Elaboración propia.

4.2.3 Analizar el rol de SALL2 en el “spreading” o expansión celular.

Una vez estudiado el rol de SALL2 en la polaridad celular y en la formación de protrusiones en el frente migratorio, el siguiente paso fue determinar la función de SALL2 en el “spreading” o expansión celular.

El “spreading” celular consta de dos tipos de eventos: pasivos y activos. Los eventos pasivos corresponden al contacto de la célula con la matriz extracelular generándose así los primeros sitios de adhesión célula- matriz en donde el área de la membrana es pequeña y la tensión sobre el sustrato de adhesión es alta. Por otro lado, los eventos activos, a diferencia de los eventos pasivos, requieren de energía para la maduración de las adhesiones célula-matriz y la extensión de la membrana celular, proceso acompañado de la disminución de la tensión sobre el sustrato de adhesión (McGrath J., 2007 y Gauthier N. *et al.*, 2012).

Con la finalidad de evaluar el efecto de SALL2 en el “spreading” celular, células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron sembradas en baja densidad, en condiciones de medio completo. En una primera instancia, se procedió a la observación de la expansión celular, a través de la visualización del patrón de los filamentos de actina, a diferentes intervalos de tiempos: 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Estableciéndose como tiempo necesario para alcanzar una expansión total de las células los 120 minutos (Figura 13 A).

Con el objetivo de cuantificar la tasa de expansión celular, se calculó en porcentaje el incremento de área celular, considerando como tiempo inicial 30 minutos de incubación. Se evaluó el incremento de área a los 45, 60 y 120 minutos, respectivamente, para esto se utilizó el programa imageJ (Figura 13 B-C). El incremento de área celular a los 45 y 60 minutos se consideró como “spreading” temprano y el incremento de área a los 120 minutos se consideró como “spreading” tardío.

Como se observa en la figura 13 B, no se evidencian diferencias significativas en el incremento del área celular a los 45 y 60 minutos ($p=0.9640$ y $p=0.5452$ respectivamente) al comparar las células MEFs de ambos genotipos.

Por otro lado, al evaluar el “spreading” celular a tiempos tardíos se observa que las células MEFs *Sall2*^{-/-} presentan un incremento del área celular significativamente menor comparado con las células MEFs *Sall2*^{+/+} ($p= 0.0268$), estos datos sugieren que el **factor de transcripción SALL2 regula el “spreading” celular a tiempos tardíos.**

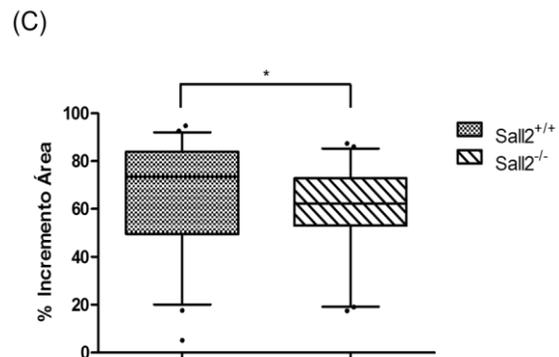
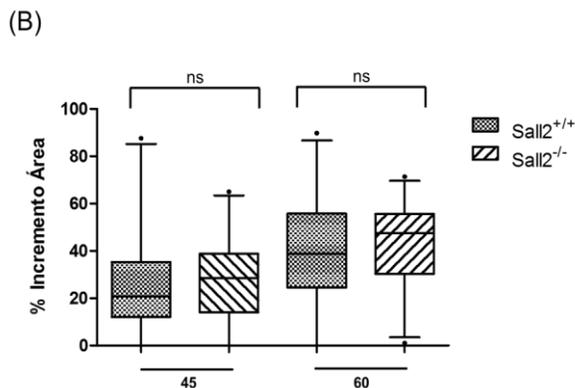
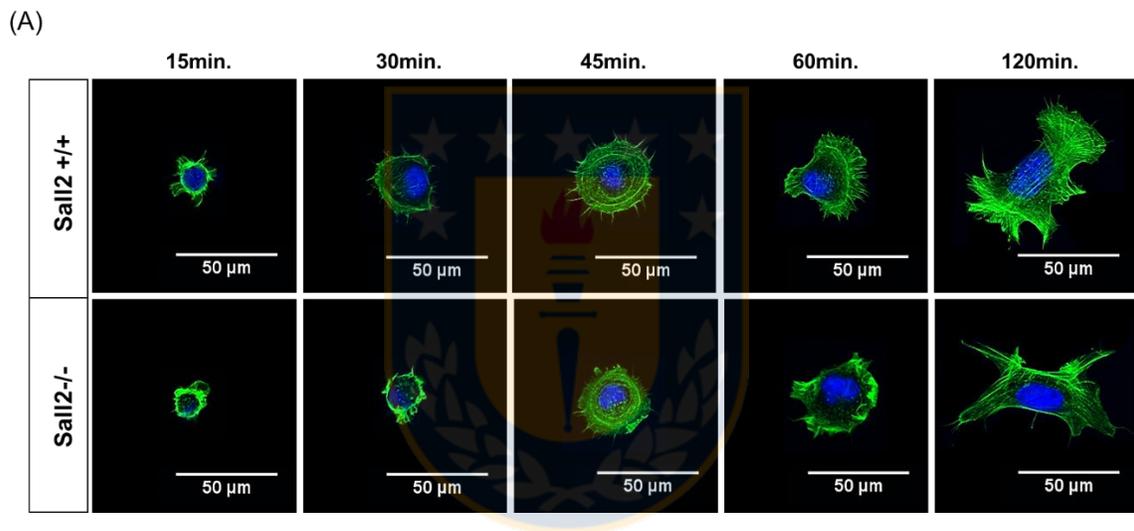


Figura 13: SALL2 regula el “spreading” celular a tiempos tardíos. (A) Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal (magnificación de 40X) de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} a diferentes tiempos de incubación: 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Filamentos de actina (en verde) y núcleos (en azul). (B) Cuantificación, en porcentaje, del incremento del área celular a los 45 y 60 minutos de incubación, respecto al tiempo inicial (30 minutos). (C) Cuantificación del incremento del área celular a los 120 minutos de incubación, respecto al tiempo inicial (30 minutos). (* Indica $p < 0.05$ basado en el test t-Student no pareado). Resultado derivado de tres experimentos independientes. Número de células analizadas por cada N experimental $n = 30$. Fuente: Elaboración propia.

4.2.4 Analizar el rol de SALL2 en la adhesión celular.

La adhesión celular se relaciona directamente con la generación de adhesiones célula-matriz que incluye diferentes niveles de maduración comenzando con las adhesiones nacientes, seguido de los complejos focales, adhesiones focales y finalmente adhesiones fibrilares, además de la participación de numerosas proteínas citoplasmáticas, receptores trans-membrana y diferentes quinasas (Gardel M. *et al.*, 2010 y Wehrle-Haller B., 2011).

Con la finalidad de determinar el rol de SALL2 en la adhesión celular, se realizaron dos ensayos de adhesión diferentes. El primer ensayo realizado permitió evaluar la capacidad de las células MEFs, de ambos genotipos, de adherirse previo a su expansión celular completa, en otras palabras solo en presencia de adhesiones con un menor grado de maduración (McGrath J., 2007), esto después de haber sido sometidas a una agitación fuerte. El segundo ensayo realizado, permitió evaluar la capacidad de adhesión de las células totalmente extendidas después de haber sido sometidas a una solución de EDTA, reactivo que al quelar el calcio afecta las adhesiones celulares, ya que proteínas como las integrinas requieren de calcio para llevar a cabo sus funciones (Zagórska A. *et al.*, 2012).

Para el ensayo de adhesión celular previo “spreading”, células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron incubadas en condiciones de medio completo por 20 minutos para permitir la adhesión. Luego, las células fueron sometidas a agitación por 5 minutos a 50 rpm y posteriormente las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Finalmente se procedió a recuperar la tinción y medir la absorbancia a 590nm, siendo la absorbancia proporcional al número de células teñidas que se encuentran adheridas después de la agitación. Como control positivo células MEFs de ambos genotipos fueron incubadas por un periodo de 3 horas, para el caso del control negativo no se sembraron células. La determinación de la adhesión celular, fue cuantificada en la forma de porcentaje de células adheridas, siendo el 100% el valor de absorbancia obtenido después de haber sometido los respectivos controles positivos (un control positivo para cada genotipo) a agitación fuerte por 5 minutos.

Como se observa en la figura 14 A, las células MEFs que carecen de SALL2 (*Sall2*^{-/-}) presentan un porcentaje de células adheridas significativamente menor comparado con las células MEFs *Sall2*^{+/+} (p= 0.0001).

Por otro lado, para el ensayo de adhesión celular tratando las células con una solución de EDTA, MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron incubadas en condiciones de medio completo hasta alcanzar el 100% de confluencia. Posteriormente fueron tratadas por diferentes intervalos de tiempos con soluciones de EDTA de concentración 0,05mM, 0,1mM y 0,2mM, respectivamente. Una vez retiradas las respectivas soluciones de EDTA, de igual manera que el ensayo anterior, se procedió a fijar, teñir con cristal violeta, recuperar la tinción y medir la absorbancia a 590nm, siendo esta medición proporcional al número de células teñidas que se encuentran adheridas después del tratamiento. Como control positivo se utilizaron células MEFs (de ambos genotipos) que no fueron tratadas con EDTA, en el caso del control negativo no se sembraron células.

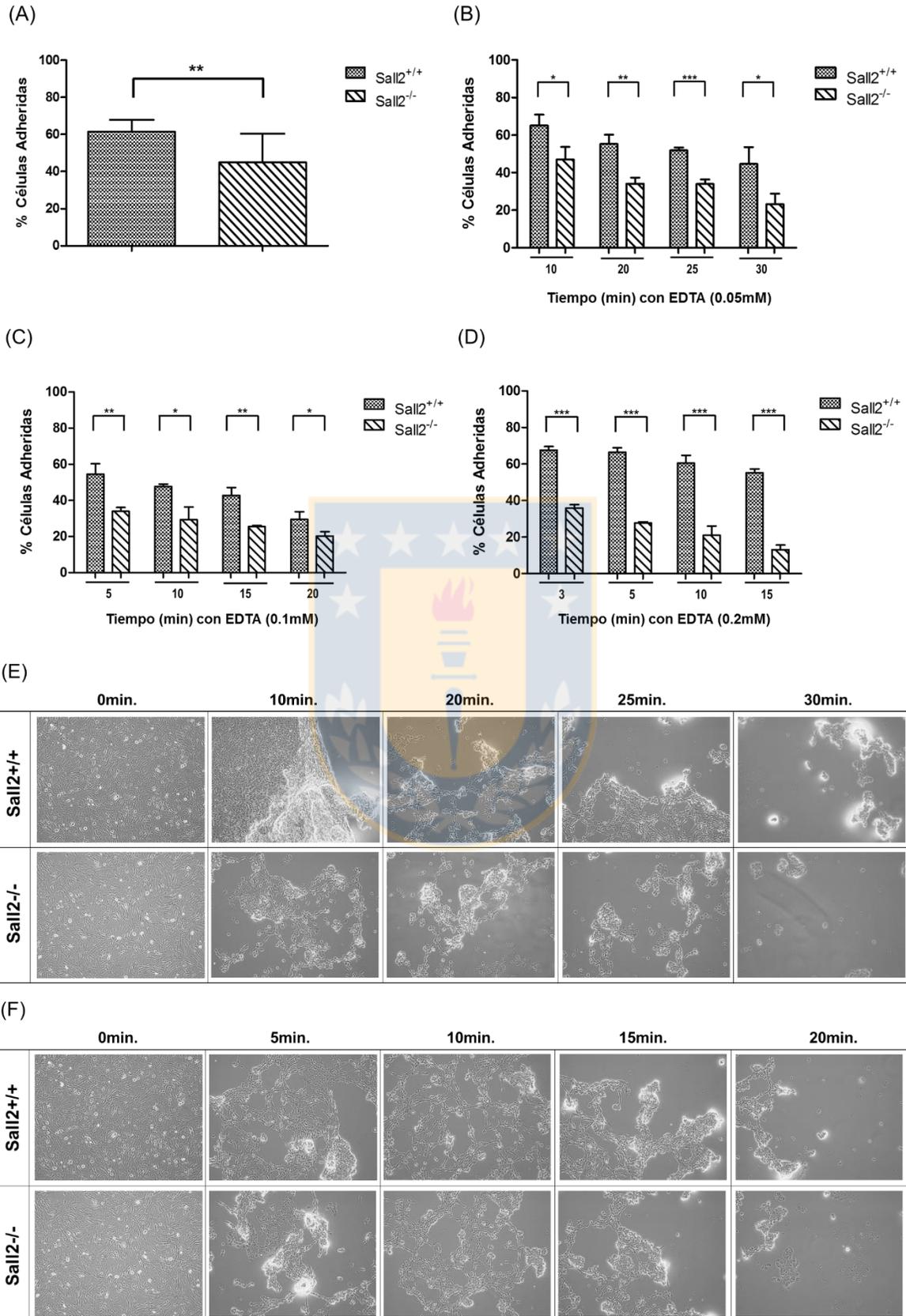
De igual manera que el ensayo anterior, la determinación de la adhesión celular fue cuantificada en la forma de porcentaje de células adheridas, siendo el 100% el valor de absorbancia obtenido de los respectivos controles positivos (un control positivo para cada genotipo) sin tratamiento con EDTA.

En la figura 14 (B-G) se observa en términos generales, que las células MEFs *Sall2*^{-/-} presentan un porcentaje de células adheridas significativamente menor comparado con las células MEFs *Sall2*^{+/+}, en todos los tiempos y concentraciones de EDTA testeadas.

Analizando estos resultados en más detalle, cuando se trataron las células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} con una solución de EDTA 0.05mM por 10, 20, 25 y 30 minutos, se observó en todos los tiempos de tratamiento que las células que carecen de SALL2 tienen un porcentaje de adhesión celular significativamente menor comparando con las células que si expresan SALL2. ($p= 0.0234$), ($p= 0.0036$), ($p= 0.0247$), ($p= 0.0004$) a los 10, 20, 25 y 30 minutos, respectivamente.

Asimismo, al tratar las células MEFs con una solución de EDTA 0.1mM por 5,10, 15 y 20 minutos y con una solución de EDTA 0.2mM por 3, 5, 10 y 15 minutos, respectivamente, se observó en todos los tiempos de tratamiento con ambas concentraciones de EDTA que las células MEFs *Sall2*^{-/-} tienen un porcentaje de adhesión celular significativamente menor comparando con las células MEFs *Sall2*^{+/+}. ($p= 0.0044$), ($p= 0.0113$), ($p= 0.0024$), ($p= 0.0332$) a los 5, 10, 15 y 20 minutos de tratamiento con una solución de EDTA 0.1mM y ($p= 0.0001$), ($p= 0.0001$), ($p= 0.0005$), ($p= 0.0001$) a los 3, 5, 10 y 15 minutos de tratamiento con una solución de EDTA 0.2mM.

Resumiendo los resultados obtenidos de los dos ensayos de adhesión celular testeados, podemos inferir que el **factor de transcripción SALL2 promueve la adhesión celular.**



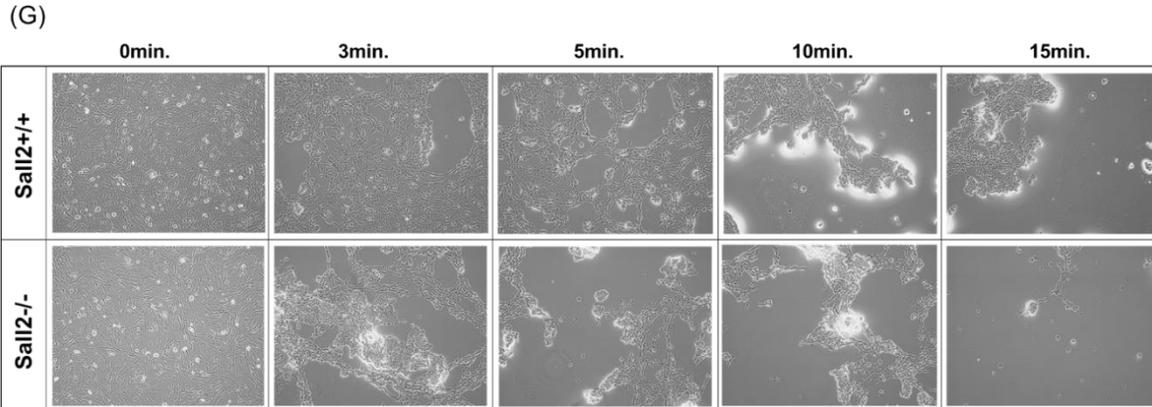


Figura 14: SALL2 promueve la adhesión celular. (A) Cuantificación del porcentaje de células adheridas después de agitación a 50 rpm, previo “spreading” celular. Resultado correspondiente a dos experimentos independientes cada uno en quintuplicado. (B) Cuantificación del porcentaje de células MEFs adheridas después de tratamiento con solución de EDTA 0.05 mM durante 10, 20, 25 y 30 minutos. (C) Cuantificación del porcentaje de células MEFs adheridas después de tratamiento con solución de EDTA 0.1 mM durante 5, 10, 15 y 20 minutos. (D) Cuantificación del porcentaje de células MEFs adheridas después de tratamiento con solución de EDTA 0.2 mM durante 3, 5, 10 y 15 minutos. (B-D) Resultados derivados de un experimento independiente en triplicado (*, **, *** indican $p < 0.05$ basado en el test t-Student no pareado). (E-G) Imágenes representativas (magnificación de 10X) de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} a los diferentes tiempos de tratamiento con solución de EDTA 0.05 mM, 0,1 mM y 0.2 mM, respectivamente. Se incluyen imágenes de controles positivos, 0 minutos de tratamiento, (de ambos genotipos) para cada concentración de solución de EDTA testada. Fuente: Elaboración propia.

4.2.5 Analizar el rol de SALL2 en la dinámica de las adhesiones focales.

Finalmente, se evaluó el rol de SALL2 en la regulación de la dinámica de las adhesiones focales, ya que como se describió previamente las adhesiones célula-matriz además de contar con diferentes grados de maduración, también posee un ciclo dinámico de ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales, proceso altamente regulado (Wozniak M. *et al.*, 2004 y Gardel M., *et al.*, 2010).

El ensamblaje de adhesiones focales requiere de una cadena de eventos de fosforilaciones que modulan este proceso, las quinasas responsables de dichos eventos son principalmente la quinasa de adhesión focal FAK y la quinasa Src. Una vez que FAK es reclutada al sitio de adhesión se auto-fosforila en el residuo tirosina 397 para así reclutar a Src (Mitra S. *et al.*, 2005), la cual fosforila a paxilina y vuelve a fosforilar a FAK, generándose así una cadena de fosforilaciones (Wehrle-Haller B., 2011 y Huttenlocher A. y Horwitz A., 2011). Asimismo, el desensamblaje de adhesiones focales requiere de fosforilaciones por parte del complejo FAK-Src de manera de disociar la unión de talina con las integrinas. Por otro lado, el clivaje mediado por Calpaínas de las quinasas FAK, Src, además de proteínas citoplasmáticas como talina, α -actinina y paxilina conllevan al desensamblaje de adhesiones focales previamente existentes (Wehrle-Haller B., 2011 y Huttenlocher A. y Horwitz A., 2011).

Con la finalidad de determinar la función de SALL2 en la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales, se llevaron a cabo tres estrategias experimentales complementarias. La primera consistió en evaluar el número de adhesiones focales y su direccionalidad posteriores a la inducción de la migración, a través de la realización de una herida sobre una monocapa de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} confluentes.

La segunda estrategia experimental permitió determinar la velocidad de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales, tratando las células con nocodazol. El nocodazol tiene la propiedad de desestabilizar los microtúbulos, lo que se traduce en una estabilización de las adhesiones focales y de esta manera permite sincronizar las células en base a las adhesiones focales existentes. A medida que se liberó las células del tratamiento con nocodazol, realizando lavados a diferentes tiempos, es posible observar el desensamblaje y posterior ensamblaje de las adhesiones focales (Mendoza P. *et al.*, 2013)

En base a lo mencionado anteriormente, la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales dependen en gran medida de la acción de las quinasas FAK y Src, razón por la cual la tercera estrategia experimental consistió en evaluar el estado de auto-fosforilación de la quinasas FAK (tirosina 397), correspondiente al primer evento de fosforilación, en un contexto de “spreading” celular. Proceso caracterizado por la generación de adhesiones célula-matriz y su respectiva maduración a medida que la membrana celular se extiende (McGrath J., 2007 y Gauthier N. *et al.*, 2012), esto fue realizado a tiempos tempranos a través de la técnica de *western blot*.

Para llevar a cabo el estudio del número y direccionalidad de las adhesiones focales, células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron sembradas en condiciones de medio completo y una vez que alcanzaron el 100% de confluencia, se procedió a realizar una herida, evitando la proliferación celular utilizando un medio de cultivo carente de suero. A las 16 horas posteriores a la realización de la herida, se procedió a la detección por microscopía de fluorescencia de las adhesiones focales utilizando un anticuerpo anti Paxilina fosforilada (Figura 15 A-B). Una vez inmunodetectadas las adhesiones focales, se procedió a la cuantificación del número de adhesiones focales por célula y su direccionalidad, calculada como porcentaje de adhesiones en dirección al eje migratorio (Figura 15 C-D). Para esto se utilizó el programa ImageJ.

Como se observa en la figura 15, no existen diferencias significativas comparando células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{-/-} con las células MEFs *Sall2*^{+/+} en el número de adhesiones focales ($p= 0.1195$) y su direccionalidad ($p=0.9740$) a las 16 horas posteriores a la inducción de la migración.

En base a los resultados aquí obtenidos podemos inferir que el **factor de transcripción SALL2 no afecta el número y direccionalidad de las adhesiones focales a las 16 horas posteriores a la inducción de la migración.**

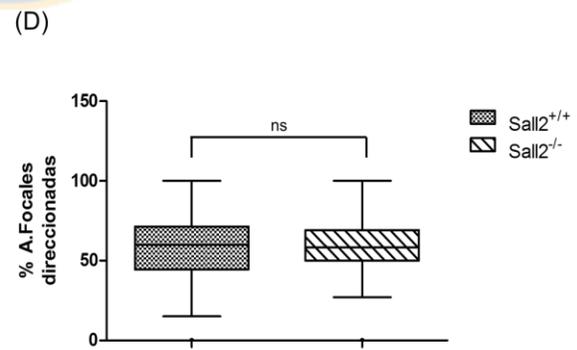
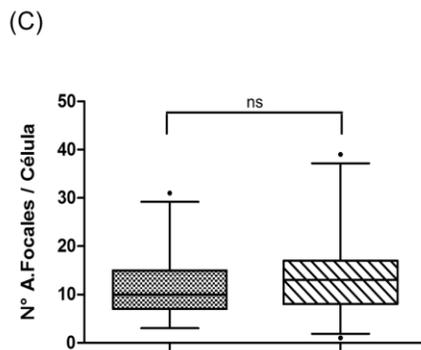
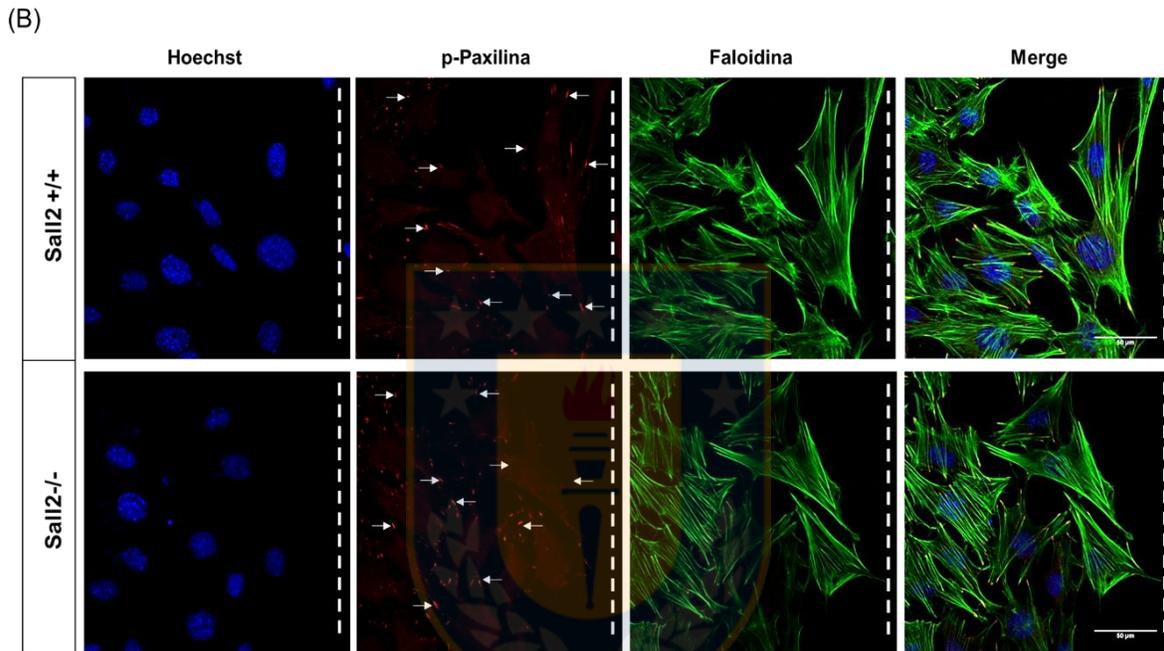
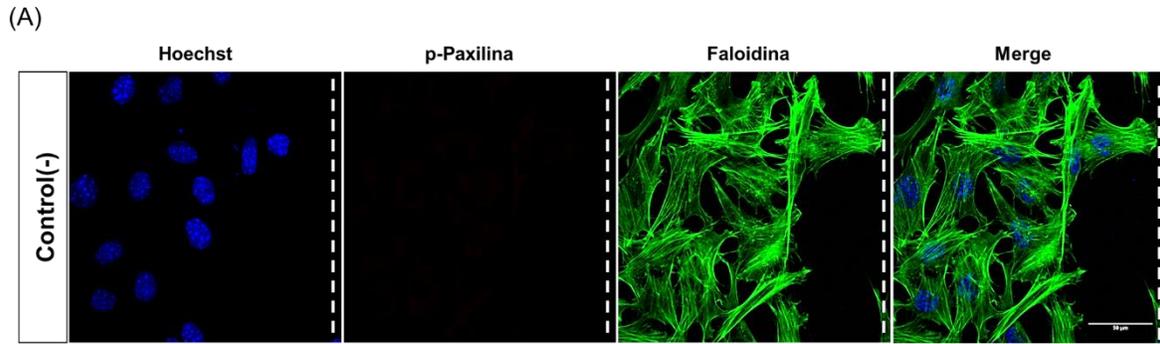


Figura 15: SALL2 no afecta el número y direccionalidad de las adhesiones focales a las 16 horas post-realización de herida. (A-B) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (magnificación de 40X) de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} ubicadas en los bordes de la herida, donde se observa las adhesiones focales (en rojo), los filamentos de actina (en verde) y núcleos (en azul). (C) Análisis y cuantificación del número de adhesiones focales por célula y (D) cuantificación de la direccionalidad de las adhesiones focales. Línea punteada blanca indica eje migratorio (herida), flechas señalan adhesiones focales. Análisis estadístico en base al test t-Student no pareado, utilizando el programa ImageJ. Resultado representativo de un experimento independiente con tres replicas biológicas. Número de células analizadas n=75. Fuente: Elaboración propia.

Con el objetivo de analizar la dinámica de la adhesiones focales se evaluó el tiempo y posteriormente se calculó la velocidad de ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales, células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron tratadas con 10µM de nocodazol en medio de cultivo carente de suero por 2 horas y media. Posteriormente, se liberó las células del tratamiento con nocodazol, realizando lavados a 0, 5, 10, 15 y 30 minutos, respectivamente. Finalmente, se llevó a cabo la inmunodetección de las adhesiones focales utilizando el anticuerpo anti Vinculina y como control de que el tratamiento con nocodazol fue efectivo, se detectó por microscopia de fluorescencia el citoesqueleto de microtúbulos utilizando el anticuerpo anti α -tubulina (Figura 16 A).

Los resultados obtenidos del análisis del tiempo que se requiere para el desensamblaje y posterior ensamblaje de las adhesiones focales, evidencian en primera instancia que tanto células MEFs *Sall2*^{+/+} como MEFs *Sall2*^{-/-} aumentan el número, intensidad y longitud de sus adhesiones focales posteriores al tratamiento con nocodazol, siendo parámetros indicativos de la estabilización de las adhesiones focales. Esto se evidencia al comparar con las células MEFs (de ambos genotipos) no tratadas (Figura 16 D).

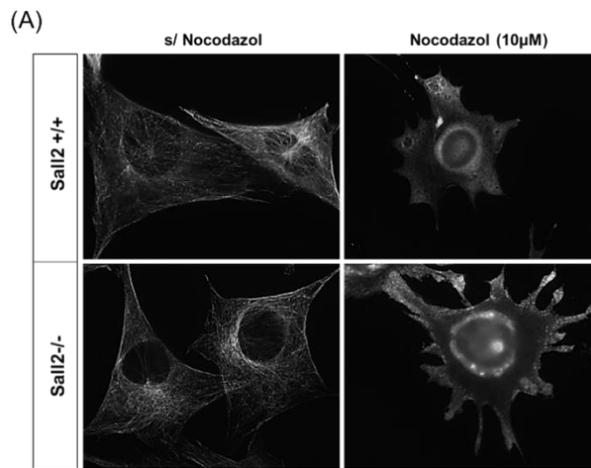
Centrándonos en las células MEFs *Sall2*^{+/+}, se observa que a medida que aumentan los tiempos de lavados (posteriores al tratamiento con nocodazol), el número de adhesiones focales disminuye proporcionalmente a los tiempos de lavados, observándose que a los 10 minutos el número de adhesiones focales disminuye de manera drástica. Sin embargo, a los 15 y 30 minutos de liberación de nocodazol se observa un aumento progresivo del número de adhesiones focales respecto al tiempo de lavado, alcanzando su máximo a los 30 minutos de liberación del nocodazol (Figura 16 B y D).

Similar a lo que ocurre en el caso de las células que expresan SALL2, se observa que en células MEFs *Sall2*^{-/-} a medida que aumentan los tiempos de lavados (posteriores al tratamiento con nocodazol), el número de adhesiones focales disminuye proporcionalmente a los tiempos de lavados, observándose que a los 15 minutos de lavado el número de adhesiones focales alcanza su menor valor, no obstante no disminuyen en su totalidad. Sin embargo, a los 30 minutos de liberación de nocodazol se observa un aumento del número de adhesiones focales recuperándose el fenotipo observado en los primeros minutos de lavados (Figura 16 C y D). Al comparar entre ambos genotipos (*Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-}) el número de adhesiones focales por célula a los 10 minutos de liberación del nocodazol (tiempo en donde se observa la mayor diferencia en términos de disminución de adhesiones focales entre ambos genotipos), se observa que en presencia de SALL2 el número de adhesiones es significativamente menor ($p=0.0024$) comparando con células MEFs deficientes de SALL2. Valor estadístico que respalda las observaciones anteriormente mencionadas.

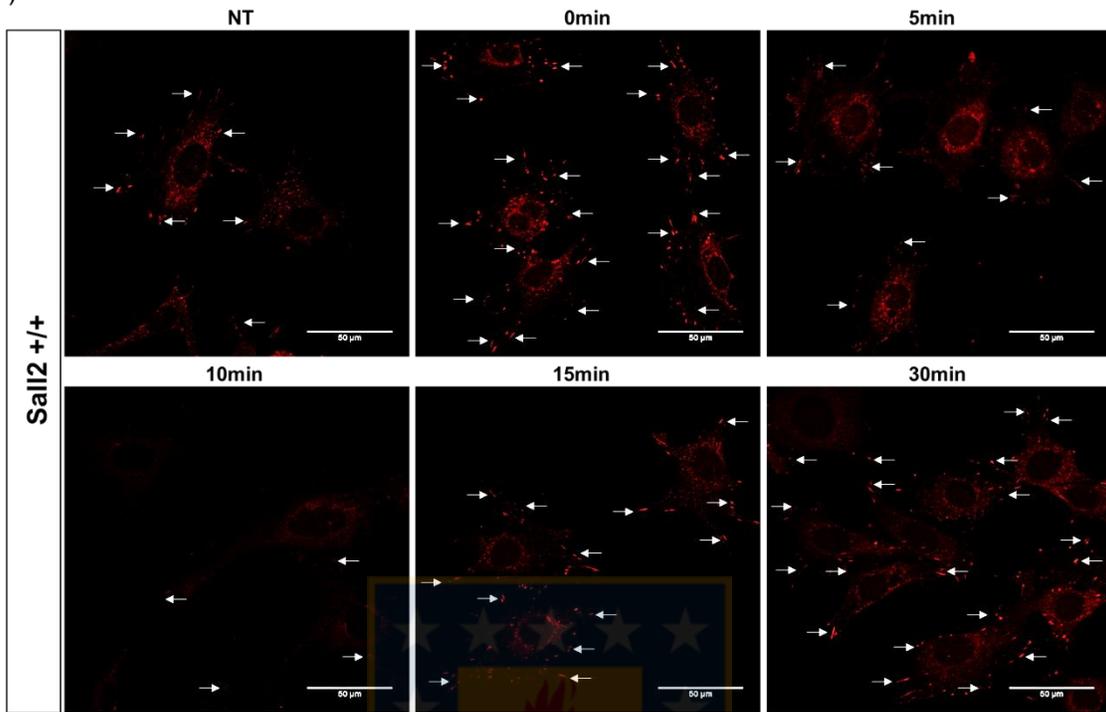
Una vez cuantificado el tiempo de desensamblaje y posterior ensamblaje, el siguiente paso fue calcular la velocidad promedio de ambos procesos, mediante la generación de una línea de tendencia lineal y obtención del valor de la pendiente. Los tiempos de liberación del nocodazol donde se observó una disminución del número de adhesiones focales corresponden al desensamblaje de adhesiones y los tiempos de liberación del nocodazol donde se observó la recuperación del

número de adhesiones focales corresponde al ensamblaje. La velocidad promedio de desensamblaje fue calculada entre los 0 y 10 minutos de liberación del nocodazol. Para el caso de las células MEFs que expresan SALL2 el valor de velocidad promedio fue de $v=1,7$ (N° AF/min) y en el caso de las células MEFs que no expresan SALL2 el valor de velocidad promedio fue de $v=1,1$ (N° AF/min) (Figura 16 E). De los valores de velocidad aquí obtenidos se puede inferir que las células MEFs *Sall2*^{-/-} tienen una tasa de desensamblaje más lenta comparando con las MEFs *Sall2*^{+/+}.

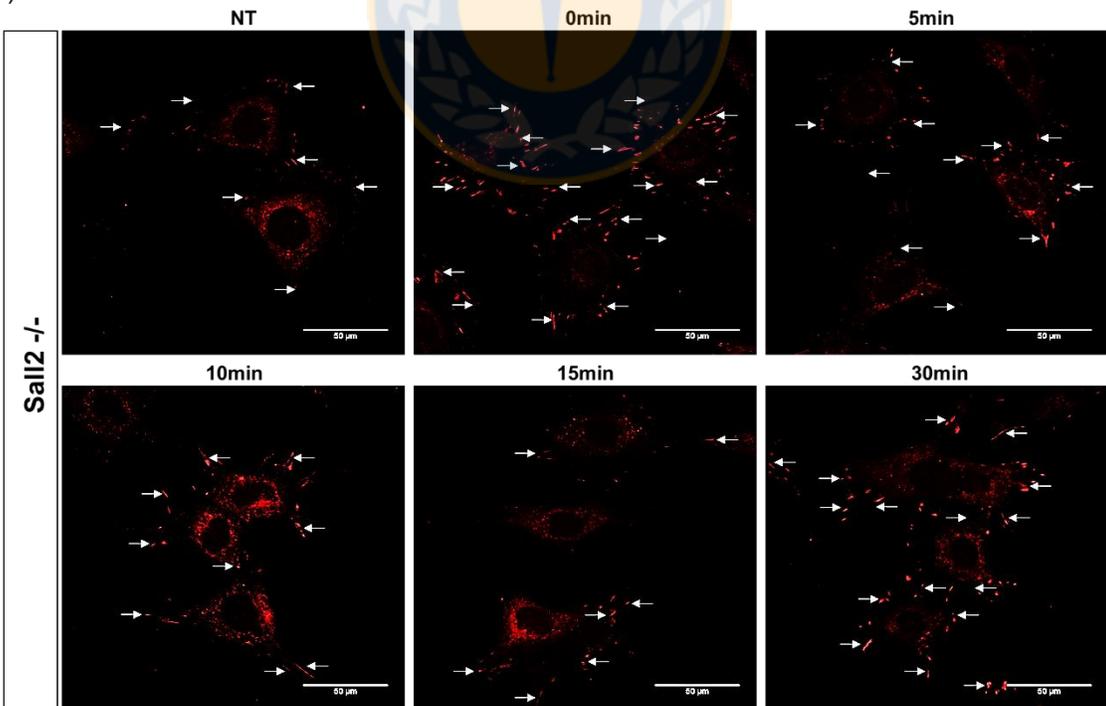
De similar manera se calculó la velocidad promedio de ensamblaje, esta fue calculada entre los 10 y 30 minutos de liberación del nocodazol para el caso de las células MEFs *Sall2*^{+/+}, ya que a los 10 minutos de lavado se comienza a observar la generación de nuevas adhesiones focales. En el caso de las células MEFs *Sall2*^{-/-} entre los 15 y 30 minutos de liberación del nocodazol, ya que a partir de los 15 minutos de lavado se observa en las células que no expresan SALL2 la generación de adhesiones focales. La velocidad promedio de ensamblaje fue de $v=0,6$ (N° AF/min) para el caso de células MEFs *Sall2*^{+/+} y de $v=0,75$ (N° AF/min) en el caso de células MEFs *Sall2*^{-/-} (Figura 16 F). De los valores de velocidad aquí obtenidos se puede inferir que las células MEFs *Sall2*^{-/-} tienen una tasa de ensamblaje similar comparando con las MEFs *Sall2*^{+/+}.



(B)



(C)



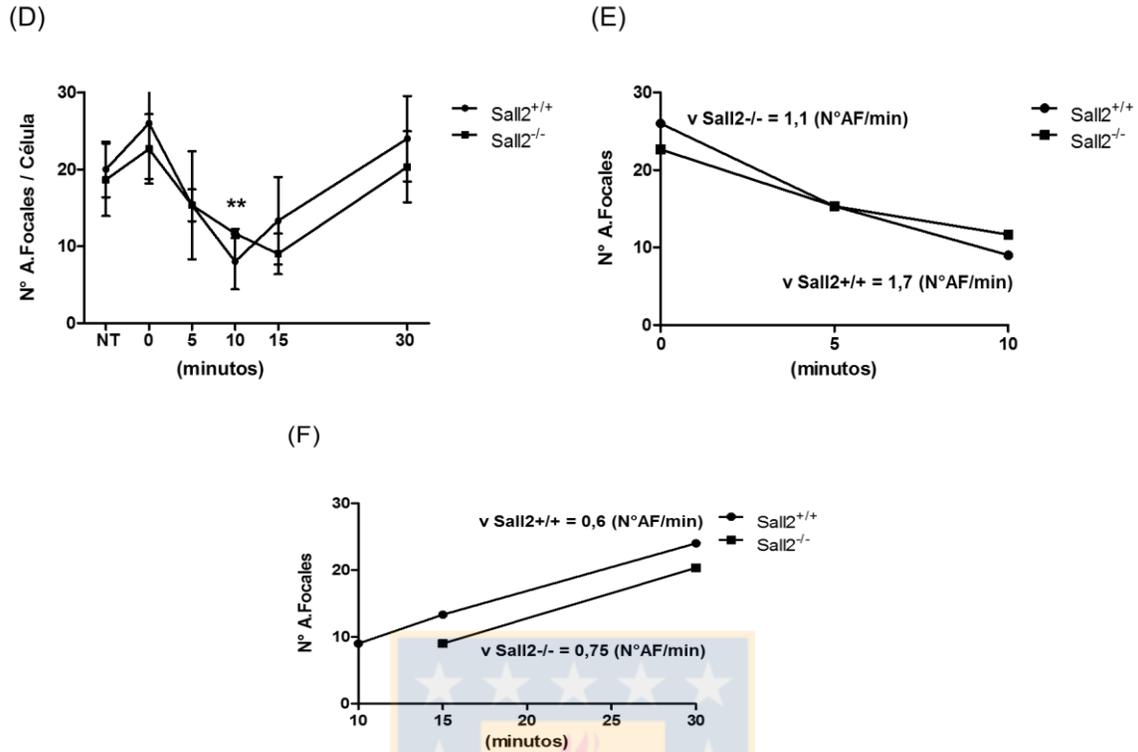


Figura 16: SALL2 promueve la dinámica de desensamblaje y ensamblaje de las adhesiones focales. (A) Imágenes obtenidas mediante microscopía (magnificación de 100X) de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} sin tratamiento con nocodazol y tratadas con 10Mm de nocodazol por 2 horas y medias, donde se observa los microtúbulos en blanco. (B-C) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (magnificación de 40X) de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} en condiciones de no tratamiento con nocodazol (NT), de tratamiento con nocodazol sin lavados (0 min.) y a los diferentes tiempos de lavados 5,10, 15 y 30 minutos. En rojo se observa las adhesiones focales, señaladas con las flechas blancas. (D) Análisis y cuantificación del número de adhesiones focales por célula en función del no tratamiento con nocodazol y los diferentes tiempos de lavados del nocodazol en células MEFs de ambos genotipos, utilizando el programa ImageJ. (E) Cuantificación de la velocidad de desensamblaje de las adhesiones focales de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} entre los 0 y 10 minutos. (F) Cuantificación de la velocidad de ensamblaje de las adhesiones focales de células MEFs *Sall2*^{+/+} entre los 10 y 30 minutos de lavados y para el caso de células MEFs *Sall2*^{+/+} entre los 15 y 30 minutos de lavados. Resultado representativo de tres experimentos independientes. Número de células analizadas por cada N experimental n=30. Fuente: Elaboración propia.

En base a los resultados aquí obtenidos podemos sugerir que el **factor de transcripción SALL2 promueve la velocidad de la dinámica de desensamblaje y ensamblaje de las adhesiones focales, ejerciendo una mayor regulación en la velocidad de desensamblaje de las adhesiones focales.**

Finalmente, se evaluó el estado de auto-fosforilación de la quinasa FAK en un contexto de “spreading” celular. Para esto células MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} fueron sembradas en placas, previamente cubiertas con fibronectina, durante 0, 15 y 30 minutos en medio de cultivo completo. Inmediatamente después, se obtuvieron los extractos celulares por arrastre mecánico correspondientes a los 0, 15 y 30 minutos para cada uno de los genotipos. Finalmente, se determinó los niveles de proteicos de fosfo-FAK (tirosina 397), FAK total y β -Actina, como control de carga, a través de la técnica de *western blot*.

En la figura 17 A, se observa que los niveles de auto-fosforilación de FAK aumentan a medida que aumenta el tiempo de expansión celular, tanto en células MEFs *Sall2*^{+/+} como en MEFs *Sall2*^{-/-}, siendo dicho aumento ligeramente mayor en el caso de las células MEFs que expresan SALL2. Por otro lado, al centrar nuestra atención en los niveles de FAK total se puede observar que sus niveles no aumentan de manera evidente a medida que aumenta el tiempo de “spreading” celular, sin embargo los niveles basales de FAK total son mayores en ausencia de SALL2.

Al llevar a cabo la normalización de los niveles proteicos de FAK fosforilado (tirosina 397) respecto a los niveles de FAK total y el control de carga, todo esto respecto al tiempo de “spreading” celular de 0 minutos de las células control (MEFs *Sall2*^{+/+}), observamos que los niveles de activación de la quinasa FAK aumentan a medida que aumenta el tiempo de “spreading” celular y que estos niveles de activación son aparentemente mayores para el caso de la células MEFs

que expresan el factor de transcripción SALL2 (Figura 17 B). Para llevar a cabo las densitometrías se utilizó el programa ImageJ.

En base a estos resultados, podemos inferir que el **factor de transcripción SALL2 podría regular la activación de la quinasa de adhesiones focales FAK en un contexto de “spreading” celular a tiempos tempranos.**

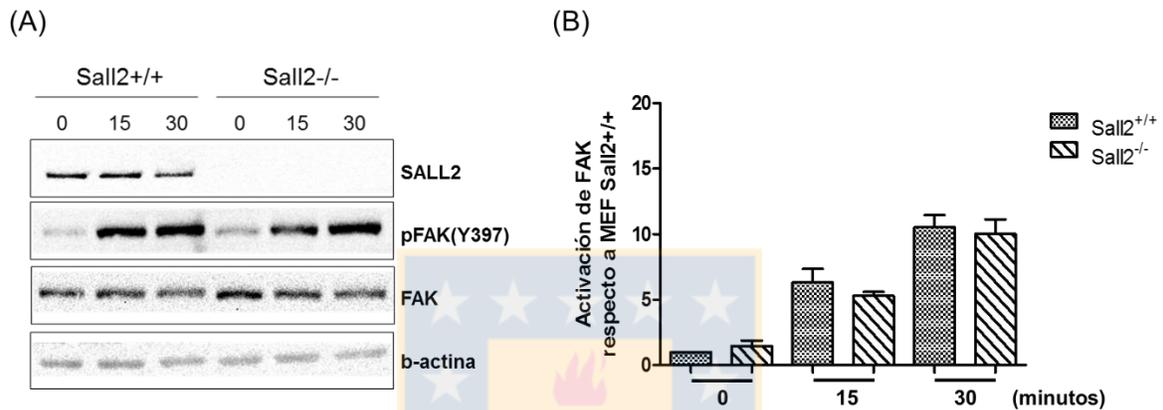


Figura 17: SALL2 podría regular la activación de la quinasa FAK, en un contexto de “spreading” celular temprano. (A) Blot representativo de los niveles de SALL2, FAK fosforilado (Y397), FAK total y β -actina como control de carga. (B) Normalización de la activación de FAK respecto al tiempo 0 de “spreading” de las células MEFs Sall2^{+/+}, utilizando el programa ImageJ. Resultado representativo de dos experimentos independientes. Fuente: Elaboración propia.

4.3 OBJETIVO 3: Determinar posibles blancos transcripcionales de SALL2 que medien su efecto en la migración celular.

A lo largo del desarrollo de esta tesis, se determinó que el factor de transcripción SALL2 es requerido en el proceso de migración celular (objetivo específico N° 1). Asimismo, se observó que SALL2 regula positivamente diferentes etapas del proceso migratorio (objetivo específico N° 2) incluyendo la polaridad celular, la expansión de las células (“spreading” celular) y la velocidad de la dinámica de las adhesiones focales, en conjunto con una aparente activación de la quinasa de adhesiones focales, FAK, en un contexto de “spreading” celular a tiempos tempranos.

En base a lo anterior, el siguiente paso corresponde a la búsqueda de posibles blancos transcripcionales de SALL2 que medien su efecto en la migración celular. Para ello se realizó la identificación de posibles sitios de unión para SALL2 dentro de las regiones promotoras de diferentes genes de ratón, se utilizó la secuencia consenso de unión al ADN (GGG(T/C)GGG), correspondiente a un motivo GC, identificada para SALL2 mediante el método SELEX, en conjunto con una matriz, generada por el mismo grupo, que contempla posibles mutaciones puntuales y su respectivo poder estadístico respecto a la secuencia de unión consenso óptima (Gu H. *et al.*, 2012).

La búsqueda de los posibles blancos transcripcionales de SALL2, comenzó con la obtención de las diferentes regiones promotoras desde el nucleótido -2000 al +100, tomando como +1 al nucleótido con el que se inicia la transcripción, utilizando la base de datos de promotores eucariontes (EPD) (Dreos R. *et al.*, 2015; 2017), (<http://epd.vital-it.ch/>). La selección de los genes que fueron candidatos para la búsqueda de sitios de unión para SALL2, se basó en primera instancia en aquellos genes que codifican proteínas que participan en el ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales, ya que en esta etapa de la migración celular se observó que SALL2 ejerce su mayor efecto.

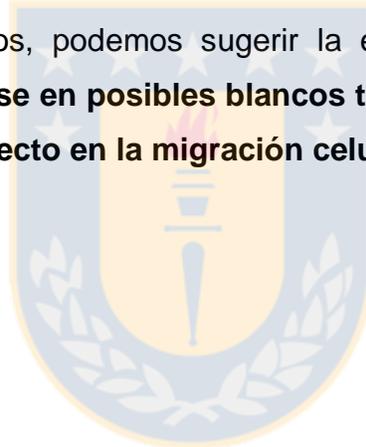
La lista de genes estudiados fueron los siguientes: Ptk2 que codifica para la quinasa FAK, Src que codifica para la quinasa SRC, Tln1 que codifica para la proteína citoplasmática Talina, Pxn que codifica para la proteína citoplasmática Paxilina, Vcl que codifica para la proteína citoplasmática Vinculina, Fn1 que codifica para la Fibronectina (componente de la matriz extracelular), Itgb1 que codifica para la integrina beta1 y Actn1 que codifica para la proteína citoplasmática Actinina.

Para la búsqueda de sitios de unión para SALL2 en los promotores de los genes anteriormente mencionados, se utilizó la base de datos de elementos reguladores transcripcionales (TRED), (<https://cb.utdallas.edu/cgi-bin/TRED/>), insertando las secuencias promotoras de los respectivos genes a analizar y la matriz de nucleótidos que incluye la secuencia consenso óptima.

Como se muestra en la figura a continuación, se encontraron múltiples sitios de unión para SALL2 en todas las regiones promotoras estudiadas. Analizando en más detalle cada una de las regiones promotoras, encontramos en el promotor de Ptk2 7 posibles sitios de unión para SALL2 en las posiciones 15, 75, 166, 283, 328, 476 y 489 antes del sitio de inicio de transcripción; en el promotor de Src 6 posibles sitios de unión en las posiciones 120, 142, 874, 999, 1229 y 1709; en el promotor de Tln1 4 posibles sitios de unión en las posiciones 4, 95, 161 y 1939; en el promotor de Pxn 6 posibles sitios de unión en las posiciones 51, 71, 94, 126, 745 y 1541; en el promotor de Vcl 7 posibles sitios de unión en las posiciones 48, 66, 130, 158, 163, 300 y 341; en el promotor de Fn1 5 posibles sitios de unión en las posiciones 49, 102, 560, 756 y 1377; en el promotor de Itgb1 7 posibles sitios de unión en las posiciones 85, 100, 105, 310, 427, 953 y 1944 y finalmente en la región promotora de Actn1 encontramos 7 posibles sitios de unión para SALL2 en las posiciones 252, 609, 614, 1026, 1193, 1763 y 1935 antes del sitio de inicio de transcripción (Figura 18 A).

De igual manera, se buscaron sitios posibles de unión para SALL2 en las regiones promotoras de los genes que codifican para las GTPasas pequeñas Rac1, RhoA y Cdc42 ya que estas GTPasas son reguladores maestros de polaridad celular, formación de protrusiones membranosas y del ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales (Raftopoulou M. y Hall A., 2004; Sadok A. y Marshall C., 2014). Encontrándose en Rac1 6 posibles sitios de unión para SALL2 en las posiciones 101, 105, 113, 117, 262 y 534 antes del sitio de inicio de transcripción; en el promotor de RhoA se encontraron 3 posibles sitios de unión en las posiciones 105, 790 y 799 y finalmente el promotor de Cdc42 se encontraron 3 posibles sitios de unión para SALL2 en las posiciones 133, 1192 y 1550 (Figura 18 B).

En base a estos resultados, podemos sugerir la existencia de **varios genes candidatos para convertirse en posibles blancos transcripcionales de SALL2 que estén mediando su efecto en la migración celular.**



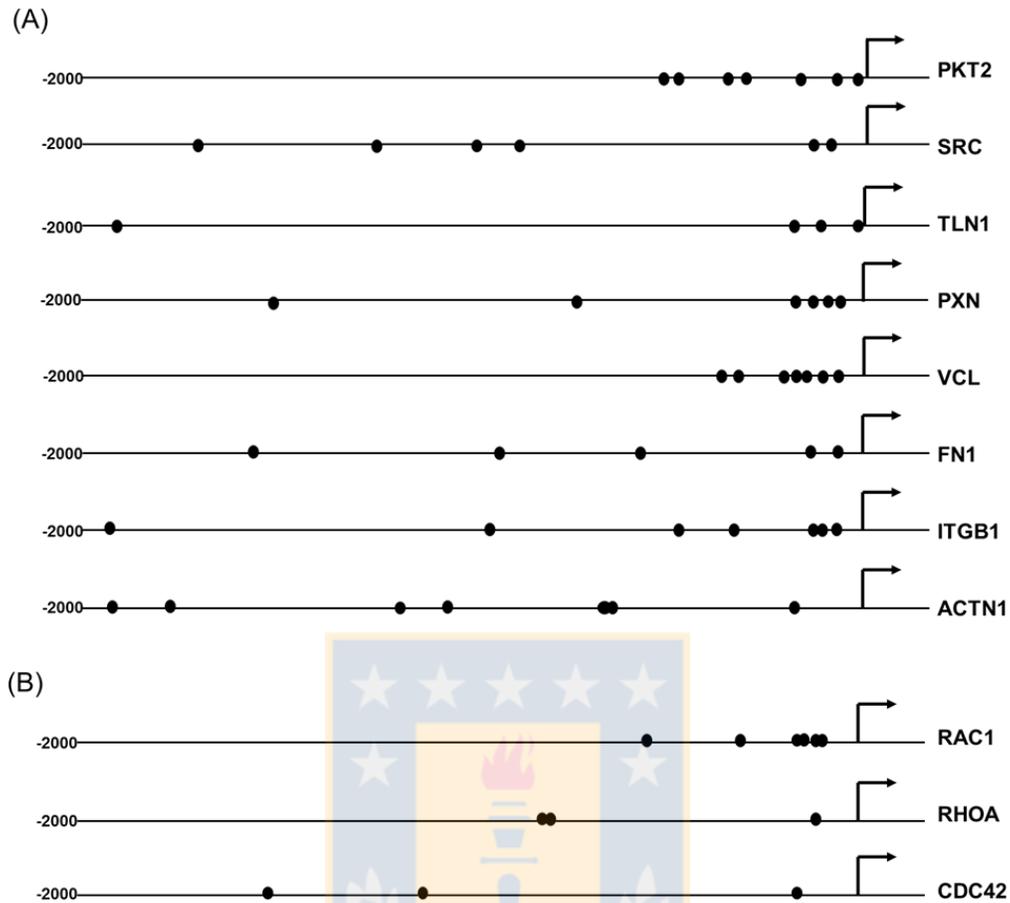


Figura 18: Posibles sitios de unión para SALL2 en diferentes promotores de genes de ratón. Representación esquemática de diferentes promotores de genes asociados a las adhesiones focales (A) y de genes que codifican para las GTPasa pequeñas de la familia Rho (B). Los sitios putativos para la unión de SALL2 están representados por óvalos de color negro. El sitio de inicio de la transcripción (+1) se encuentra representado por flechas. Fuente: Elaboración propia.

5. DISCUSIÓN

Poco se sabe a la fecha del factor de transcripción SALL2, desconociéndose en gran parte sus funciones, blancos transcripcionales y regulación. Siendo importante destacar que las investigaciones que vinculan a SALL2 con funciones específicas, no identifican cuál de sus dos isoformas (E1 o E1A) es la responsable del efecto evaluado, ya que no existe a la fecha un anticuerpo isoforma-específico disponible. Considerando que ambas isoformas difieren en el extremo N-terminal y poseen una expresión diferencial (Hermosilla V. *et al.*, 2017), las isoformas de SALL2 podrían ser responsables de funciones diferentes, tanto en un contexto normal como patológico.

Previo al desarrollo de esta tesis, se determinó que la isoforma predominante de SALL2 en células MEFs, corresponde a la isoforma E1A siendo la expresión de la isoforma E1 prácticamente indetectable (ver Anexo 1 figura 19). Este resultado implica que la función de SALL2 estudiada en el desarrollo de esta tesis, podría ser isoforma-dependiente, siendo E1A la isoforma responsable.

Dentro de las funciones descritas para SALL2, existen dos estudios (Pincheira R. *et al.*, 2009 y Kelberman D. *et al.*, 2014) que apuntan a que SALL2 podría tener un rol en el proceso migratorio y es por esto que hipotetizamos que SALL2 promueve la migración celular, desconociéndose en qué etapa del proceso migratorio y a través de qué genes blancos podría estar ejerciendo su rol.

Utilizando modelos *Sall2* knockout y de pérdida de función en células MEFs *wild type*, nuestros ensayos de migración (cierre de herida y *Transwell*) demuestran que SALL2 es requerido para la migración celular. Cabe mencionar, que previo a la realización de ambos ensayos, se evaluó la viabilidad de las células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} frente a condiciones de privación de suero, las mismas utilizadas a lo largo de todo el desarrollo de este trabajo (ver Anexo 2 figura 20), observándose que el porcentaje de muerte celular máximo alcanzado es de

alrededor de un 3,9% a las 24 horas. Siendo importante destacar que los estudios posteriores a estos ensayos fueron llevados a cabo durante 4 y 16 horas de privación de suero donde el porcentaje de muerte celular promedio entre ambos genotipos fue de 1% y 3,7%, respectivamente. Descartándose de esta manera que los resultados obtenidos pudiesen estar afectados por la viabilidad celular.

Similar a SALL2 otros miembros de la familia *Sall*, como SALL1 y SALL4 han sido vinculados con la migración celular (Wolf J. *et al.*, 2014 y Zhang D. *et al.*, 2017). Datos que refuerzan la hipótesis de que SALL2 podría tener un rol en la migración celular, ya que otros miembros de la misma familia ya han sido directamente asociados al proceso migratorio.

Por otro lado, SALL1, SALL4 y SALL2 además de tener un posible rol en común en la migración celular, han sido asociados a cáncer. Siendo importante destacar que a la fecha se desconoce el rol específico de SALL2 en esta enfermedad, existiendo actualmente controversia entre datos de distintos tipos de cáncer, y su consecuente definición como supresor tumoral y/o oncogén. Nuestros resultados en MEFs indican que SALL2, al igual que SALL4 favorecería la migración celular lo que en un contexto de cáncer podría asociarse con un rol oncogénico. En este sentido hay estudios que indican que en cánceres como el tumor de Wilms (Li C.-H. *et al.*, 2002), testicular (Alagaratnam S. *et al.*, 2011), sarcoma sinovial (Nielsen T. *et al.*, 2003) y de glioblastoma (Suvà M. *et al.*, 2014) SALL2 se encuentra sobreexpresado. Sin embargo, se requieren estudios en células de cáncer para determinar si la sobreexpresión de SALL2 favorece la migración en un contexto patológico.

Apartándonos de los miembros de la familia *Sall*, existen numerosas evidencias que vinculan a factores de transcripción con el proceso migratorio, como por ejemplo el factor de transcripción Snail reprime la expresión del gen *E-cadherina* favoreciendo la adquisición de un fenotipo metastásico, clásico en la progresión de tumores epiteliales (Batle E. *et al.*, 2000). Otro ejemplo es el caso del factor de

transcripción OCT4 que regula positivamente la expresión del gen *N-cadherina* y el gen *Vimentina* en tejidos endometriales, genes que favorecen la migración celular (Chang J. H. *et al.*, 2013). Cabe destacar que SALL2 y OCT4 han sido previamente vinculados, ya que se demostró que SALL2 forma parte de un grupo de factores de transcripción junto a NANOG, SOX2 y OCT4, considerados como genes maestros que promueven la pluripotencia (Nie J. *et al.*, 2011).

Interesantemente NANOG, SOX2, OCT4, SALL4 y SALL2 se encuentran íntimamente relacionados ya que por un lado se ha descrito que SALL2 es regulado por NANOG y por la familia de factores de transcripción SOX (Boyer L. *et al.*, 2005). Por otro lado, en un contexto de pluripotencia SALL2 interacciona con SOX2 reprogramando las células de glioblastoma diferenciadas en células de glioblastoma con capacidad de propagación tumoral, es decir, células con características tipo células madre (Suvà M. *et al.*, 2014), más aun se ha descrito que SALL2 interacciona con SOX2 y SALL4, factores críticos para la mantención de células madre neuronales embrionarias como adultas (Van den Berg D. *et al.*, 2010; Engelen E., 2011 y Suvà M. *et al.*, 2014). Adicionalmente, en células madres embrionarias de ratón la pérdida de OCT4 conlleva a una disminución de la expresión de SALL2 (Hermosilla V. *et al.*, 2017). Estos datos nos permiten sugerir que si bien en un contexto de pluripotencia que a su vez se relaciona con la progresión tumoral como es en el caso de glioblastoma, SALL2 lleva a cabo sus funciones a través de la acción en conjunto de los factores de transcripción anteriormente mencionados, en un contexto de migración celular SALL2 pudiese llevar a cabo su funciones en conjunto o bien de manera similar a factores de transcripción como por ejemplo SALL4 u OCT4, proteínas ya vinculadas con el proceso migratorio.

Como se describió en la introducción, la migración celular involucra una serie de etapas específicas (Kirfel G. *et al.*, 2004). En este contexto los resultados obtenidos en el objetivo específico 2 evidencian que SALL2 participaría en la polaridad celular, “spreading” o expansión de las células, adhesión celular y en la

dinámica de las adhesiones focales no así en la formación de protrusiones migratorias de tipo lamelipodios y filopodios.

Con respecto a la inducción de la migración esta fue llevada a cabo mediante la realización de una herida en la monocapa de células, siendo las 16 horas post-realización de esta, la hora elegida para los análisis. Como se observó en el ensayo de cierre de herida, a las 24 horas las células MEFs *wild type* cierran dicha brecha, perdiéndose los bordes de esta. Por otro lado, los análisis asociados a las diferentes etapas del proceso migratorio requieren de un tiempo considerable para que la inducción de la migración sea efectiva, además de la observación clara de los bordes que conforman la herida, siendo por estas razones las 16 horas posteriores a la inducción de la migración, el tiempo idóneo para los análisis en nuestro modelo de estudio.

En relación a los resultados obtenidos en el estudio de cada una de las etapas que conforman la migración celular, es importante destacar que como estrategia general fueron llevados a cabo en ausencia de sustrato, específicamente de fibronectina, que media el proceso de adhesión de las células a la matriz extracelular, favoreciendo así la capacidad migratoria de las células. Considerando el hecho que los fibroblastos son células metabólicamente activas que cuando se activan por ejemplo en un contexto de cicatrización de herida, exhiben un abundante retículo endoplásmico y prominente aparato de Golgi asociados con la síntesis y secreción de moléculas de la matriz extracelular que incluye colágeno, fibronectina entre otras (McAnulty R., 2006 y Kalluri R., 2016). No pudiéndose descartar que adicionando fibronectina se pudiesen observar diferencias más marcadas e incluso respuestas diferentes a las observadas a lo largo del desarrollo de este trabajo.

El análisis de polaridad celular a las 16 horas posteriores a la inducción de la migración evidenció que la ausencia de SALL2 genera un estado menos polarizado, datos que sugieren que si bien SALL2 no afecta la polaridad en

términos de células polarizadas versus no polarizadas, si favorece estados altamente polarizados.

Considerando que la polarización celular es la primera etapa del proceso migratorio, se evaluó el estado de polarización a horas más tempranas. Interessantemente, se observó que no existen diferencias significativas en presencia o ausencia de SALL2 al comparar el estado de polarización general y el porcentaje de células que se encuentran en un alto o mediano grado de polaridad. Al comparar estos resultados con otros estudios donde se utilizó el mismo modelo celular y la misma cantidad de horas de inducción (4 horas), si se observan diferencias en el estado de polarización de las células, por ejemplo Tomar A. *et al.* evaluaron el efecto de la quinasa de adhesiones focales FAK en el establecimiento de la polaridad celular, analizando la reorientación del aparato de Golgi, observando diferencias significativas entre las células MEFs que expresan FAK de aquellas que no lo expresan (Tomar A. *et al.*, 2009). Otro ejemplo fue la investigación realizada por Grande-García A. *et al.*, donde evaluaron el rol de la proteína Caveolina1, observando que las células MEFs que no expresaban Caveolina 1 presentan una reorientación del centrosoma defectuosa comparando con las células MEFs control (Grande-García A. *et al.*, 2007). Ambos estudios tienen en común la utilización exógena de fibronectina, siendo quizás la ausencia de fibronectina adicionada en nuestros experimentos la responsable de no observar diferencias en estado de polarización general y en el porcentaje de células que se encuentran en un alto y mediano grado de polaridad, pudiendo existir también la posibilidad que a las 16 horas posteriores a la realización de la herida, observar diferencias más marcadas en el estado de polarización general de las células.

Si bien a las 4 horas posteriores a la inducción de la migración, SALL2 no favoreció estados altamente polarizados como si se observó a las 16 horas. Es importante destacar que al comparar el porcentaje de células en grado 1 y 2 a las 4 y 16 horas (tabla 1) se observa que células MEFs SALL2 deficientes a las 4

horas presentan un porcentaje de células en grado 1 cercano a un 30% sin embargo a las 16 horas el porcentaje de células en grado 1 baja a alrededor de un 20%. Efecto inverso a lo que se observa en presencia de SALL2 donde los porcentajes de células en grado 1 aumentan de un 30% a un 40% a las 16 horas. Estos hallazgos, que si bien son discretos, nos sugieren que además de que SALL2 pudiese favorecer estados altamente polarizados (efecto observado a las 16 horas de inducción de la migración) también pudiese tener un rol en la mantención de la polaridad a horas más tardías, razón por la cual células MEFs deficientes de SALL2 “pierden” en cierto grado su estado de polarización a medida que aumentan las horas de inducción de la migración.

Tabla 1. Porcentajes de células MEFs en G1, G2 y G1+G2 posteriores a la inducción de la migración.

	Sall2 +/+			Sall2 -/-		
	% G1	% G2	% G1 + G2	% G1	% G2	% G1 + G2
H. Tempranas (4 horas)	30	40	70	30	40	70
H. Tardías (16 horas)	40	30	70	20	50	70

Tabla comparativa del porcentaje de células MEFs *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} en grado 1 (G1), grado 2 (G2) y grado 1 más grado 2 (G1+G2) a las 4 y 16 horas inducción de la migración. Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a las protrusiones migratorias en donde aparentemente SALL2 no ejerce ningún tipo de efecto, no se puede descartar que a tiempos más tempranos, cuando dichas estructuras aún no se encuentran fuertemente estabilizadas, por ejemplo por la generación de adhesiones focales, pudiesen existir diferencias en algunos de los parámetros analizados en el desarrollo de esta tesis. Siguiendo con

la idea anterior, de existir adhesiones focales débiles en las protrusiones migratorias se observaría la formación de “ruffles”, estos se definen como protuberancias de la membrana en forma de hoja con muy poca o nula adherencia al sustrato y presentan una vida media de tan solo minutos (Chhabra E.S. y Higgs H., 2007). Siendo la presencia de “ruffles” un parámetro posiblemente diferencial al comparar la estabilidad de las estructuras migratorias formadas en presencia o ausencia de SALL2.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran que SALL2 promueve el “spreading” o expansión celular a tiempos tardíos no así a tiempos más tempranos. Cabe destacar que el proceso de “spreading” está ampliamente relacionado con un aumento en la tasa migratoria de las células, un ejemplo de esto es la investigación llevada a cabo por Mendoza P. *et al.* donde se demostró que la GTPasa Rab5 promueve el proceso migratorio en conjunto con el “spreading” celular en líneas de cáncer de mama y de pulmón (Mendoza P. *et al.*, 2013).

Adicionalmente, a través de dos aproximaciones experimentales (previo expansión celular y tratamiento con solución de EDTA) se determinó que SALL2 promueve la adhesión celular. Por un lado, en células que presentan adhesiones de un menor grado de maduración (McGrath J., 2007), datos que concuerdan con que SALL2 regula positivamente la extensión de la membrana celular y por ende favorecería la generación de puntos de contacto entre la célula y la matriz extracelular. Asimismo, en células completamente extendidas que presentan adhesiones de mayor grado de maduración como lo son las adhesiones focales (McGrath J., 2007), las cuales fueron interrumpidas al quelar el calcio, metabolito fundamental para la adhesión mediada por integrinas (Wehrle-Haller B., 2011). Es importante destacar que la capacidad de adhesión de las células se puede asociar directamente a un mayor número de adhesiones focales y expansión de las células (Zagórska A. *et al.*, 2012).

Cabe mencionar, que las concentraciones de EDTA empleadas (0.05, 0.1 y 0.2 mM) son relativamente bajas comparando con las concentraciones utilizadas en otros estudios donde fluctúan entre 1 y 15 mM (Zagórska A. *et al.*, 2012 y Schubert R. *et al.*, 2014). Siendo la concentración de EDTA un punto importante a considerar, ya que al quelar el calcio una gran gama de vías de señalización se ven afectadas (Berridge M., 2012). Centrándonos en la migración celular, se ha demostrado que el calcio está implicado en diferentes etapas del proceso migratorio tales como polarización, generación de protrusiones migratorias, adhesión celular y retracción (Tsai C.-H. *et al.*, 2016). En base a lo anteriormente señalado, la utilización de bajas concentraciones de EDTA buscó interrumpir la adhesión celular ya sea mediada por integrinas, o por proteólisis mediada por Calpaínas de proteínas claves en el ensamblaje de adhesiones focales como por ejemplo FAK, talina, paxilina, etc., afectando en el menor grado posible las otras etapas de la migración celular donde el calcio tiene un rol.

Centrándonos en el rol de SALL2 observado en el “spreading” y en la adhesión celular se puede inferir que SALL2 tiene un efecto a nivel de las adhesiones focales. En este contexto, se determinó el rol de SALL2 en la dinámica de las adhesiones focales y para esto se llevaron a cabo tres estrategias experimentales complementarias, los resultados obtenidos mostraron, en primera instancia, que SALL2 no afecta el número y direccionalidad de las adhesiones focales a las 16 horas posteriores a la realización de herida. Por otro lado, es importante tener en consideración que el ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales es un ciclo muy dinámico (Wehrle-Haller B., 2012), razón por la cual la visualización de estos procesos por ejemplo a través de video-microscopía sería una mejor aproximación para su análisis, considerando que cuando se evalúa el ensamblaje de adhesiones siempre estará presente de manera paralela el desensamblaje de adhesiones focales previamente existentes. O bien, llevando a cabo un análisis de la dinámica de internalización y reciclaje de integrinas.

Una vez estabilizadas las adhesiones focales con el tratamiento de nocodazol, se observó que la velocidad promedio de desensamblaje de las adhesiones focales es mayor en presencia de SALL2, valores que concuerdan con la cuantificación de las adhesiones focales previo al tiempo, de liberación del tratamiento, donde se observó la disminución más drástica de estas. Asimismo, no se observaron grandes diferencias en la velocidad promedio de ensamblaje de adhesiones focales que concuerda con la cuantificación de las adhesiones focales posterior al tiempo donde se observó la disminución más drástica de su número. Por otro lado, la evaluación del estado de auto-fosforilación de la quinasa de adhesiones focales FAK (Y397), evidenció que sus niveles de activación son aparentemente mayores para el caso de las células MEFs que expresan SALL2, observaciones que deben ser corroboradas aumentando el N experimental.

Cabe destacar, que la migración celular requiere de la integración y coordinación de la dinámica de las adhesiones en el frente migratorio, en el centro y en la región posterior de la célula en movimiento, siendo clave su regulación para que la migración celular sea efectiva (Broussard J. *et al.*, 2008). La regulación de la dinámica de las adhesiones focales depende de la asociación versus la disociación de los diferentes componentes que participan en la generación de adhesiones en los sitios de adhesión. Uno de los reguladores claves de la dinámica de las adhesiones focales es la quinasa FAK, específicamente las vías de señalización río abajo producto de su activación (Broussard J. *et al.*, 2008). Respecto a la importancia de la activación de la quinasa de adhesiones focales en la regulación del recambio de las adhesiones focales, se ha identificado que la auto-fosforilación de FAK en la tirosina 397 es clave para su fosforilación en otros residuos, mediada por ejemplo por la quinasa Src, y más importante aún para regular el recambio de las adhesiones focales (Hamadi A. *et al.*, 2005). En resumen, de nuestros resultados se puede inferir que SALL2 promueve el recambio o dinámica de las adhesiones focales.

En este mismo contexto, la búsqueda de posibles blancos transcripcionales que medien el efecto de SALL2 en la migración celular, revelan múltiples sitios de unión para SALL2 en los promotores de los genes de Ptk2, Src, Tln1, Pxn, Vcl, Fn1, Itgb1 y Actn1. Analizando estos resultados en más detalle, resulta interesante los múltiples sitios encontrados en el promotor de Ptk2, gen que codifica para la quinasa FAK, al contrastar este hallazgo con los análisis de *western blot*, mostrados previamente, donde se observó que aparentemente en los dos experimentos independientes realizados (Blot correspondiente al segundo experimento independiente no mostrado) los niveles proteicos basales (tiempo 0 minutos de “spreading”) de FAK total son mayores en las células MEFs *Sall2*^{-/-}. Este dato podría ser indicativo de que SALL2 reprime la expresión del gen Ptk2, suposición que debe ser corroborada mediante RT-PCR (transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa) y por otro lado llevando a cabo ensayos de reportero de luciferasa, entre otros ensayos, todos en presencia y ausencia de SALL2.

De ser corroborada esta hipótesis, la mayor activación aparente de FAK observada en presencia de SALL2 pudiese deberse a un mecanismo más indirecto, como por ejemplo que SALL2 afecte de alguna manera la estabilidad de esta quinasa o a través de la regulación de otros genes que promuevan la autofosforilación de FAK. Siguiendo con la idea anterior, la presencia de múltiples sitios de unión para SALL2 en las regiones promotoras de los genes que codifican para Talina e Integrina beta1, podrían explicar mayores niveles de autofosforilación de FAK, ya que la proteína adaptadora talina se une al dominio citoplasmático de la β -integrina induciendo un cambio conformacional que se propaga a lo largo de su estructura y favorece su forma activa, reclutando a proteínas con actividad tirosina quinasa, como la quinasa de adhesión focal FAK, que una vez reclutada al sitio de adhesión se auto-fosforila (Gardel M. *et al.*, 2010).

Por otro lado, los múltiples sitios de unión para SALL2 en los promotores de los genes anteriormente mencionados (Ptk2, Src, Tln1, Pxn, Vcl, Fn1, Itgb1 y Actn1) son genes candidatos para convertirse en posibles blancos transcripcionales de SALL2 que estén mediando su efecto en la migración celular, específicamente a nivel de las adhesiones focales.

Sin embargo, es importante recordar que SALL2 además tiene un efecto en la polarización y en el “spreading” celular, no pudiéndose descartar que en presencia de fibronectina y realizando análisis a tiempos más tempranos o a través de video-microscopia, SALL2 pudiese tener un efecto en alguna otra etapa del proceso migratorio. Es por esta razón que se buscaron sitios posibles de unión para SALL2 en las regiones promotoras de los genes que codifican para las GTPasas pequeñas Rac1, RhoA y Cdc42 ya que estas GTPasas son reguladores maestros de la organización del citoesqueleto de actina y así controlando la migración celular (Raftopoulou M. y Hall A., 2004; Sadok A. y Marshall C., 2014). Los resultados obtenidos revelan múltiples sitios de unión para SALL2 en los promotores de las GTPasas testeadas, encontrándose en Rac1 el mayor número de posibles sitios de unión, sugiriendo que SALL2 podría estar ejerciendo su efecto por ejemplo por la regulación transcripcional de alguna de estas GTPasas pequeñas de la familia Rho.

Es importante mencionar que para comprobar que los genes candidatos, aquí expuestos, son realmente blancos transcripcionales de SALL2, se debe llevar a cabo una serie de estudios específicos partiendo por análisis de ARN mensajero a través de PCR, seguido de ensayos de reportero de luciferasa con la finalidad de evaluar la actividad de los promotores de los genes de interés, para finalmente llevar a cabo ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) con el objetivo de evaluar si SALL2 se une a los promotores *in vivo* y ensayos de cambio en la corrida electroforética (EMSA) para poder determinar a qué secuencias específicas de los promotores de interés se une SALL2 *in vitro*.

Similar al rol de SALL2 en la migración celular, SALL4 en líneas de cáncer de mama como SUM 149 y MDA MB231 evidencian que este factor de transcripción promueve un correcto patrón de las adhesiones focales en las células en movimiento y más importante aún promueve la dinámica de las adhesiones focales en conjunto con una mayor activación de la quinasa FAK, específicamente la auto-fosforilación (Y397) de esta quinasa, además SALL4 regula la expresión de las integrinas $\alpha 6$ y $\beta 1$. Cabe destacar que SALL4 no regula la polaridad celular, sin embargo en este estudio no se establecieron grados de polaridad no pudiéndose descartar diferencias en dichos grados al comparar el estado de polarización cuando SALL4 se encuentra silenciado (Itou J. *et al.*, 2016). En relación a la regulación de la expresión de la integrina $\beta 1$, el análisis bioinformático llevado a cabo en este trabajo revela 7 posibles sitios de unión para SALL2 en el promotor de este gen, sugiriendo que la integrina $\beta 1$ al igual que en el caso de SALL4 podría ser regulada transcripcionalmente por SALL2.

Recientemente, estudios realizados en carcinoma de células escamosas de esófago (ESCC) radioresistentes revelan que una baja expresión de SALL2, producto de una hiper metilación de su promotor, se asocia directamente con la radioresistencia y por ende con la adquisición de fenotipos más agresivos, específicamente presentan una mayor capacidad migratoria (evaluada a través de ensayos de cierre de herida) y un menor porcentaje de células apoptóticas. La sobreexpresión de SALL2 en estas células conllevó a la reversión de la migración y a un aumento de la apoptosis (Luo J. *et al.*, 2017). Cabe destacar que algunos de sus análisis son cuestionables, por ejemplo la evaluación de los niveles proteicos de SALL2 en células de carcinoma esofágico normales y radioresistentes en donde el blot no es representativo de sus conclusiones (baja expresión de SALL2 en las células radioresistentes), faltando análisis de densitometría e incluso la información del anticuerpo empleado. Otro punto a considerar, es el gran número de ARN mensajeros expresados diferencialmente, un total de 1192, en conjunto con el número de genes aberrantemente metilados, 8841 en total, comparando las células radioresistentes de las células parentales,

que no fueron evaluados a pesar de existir genes asociados directamente a la migración como por ejemplo *ITGB5* (Integrina $\beta 5$), *ARHGAP11A* (Proteína activante de la GTPasa Rho) y también genes asociados a la proliferación y sobrevivencia. Procesos considerados claves en la radioresistencia que fueron evaluados y principalmente asociados a *SALL2*, no siendo el gen *SALL2* el principal gen diferencialmente expresado ni aberrantemente metilado.

Si bien los hallazgos anteriormente mencionados son aparentemente discordantes con nuestros resultados, es importante enfatizar en qué contexto se llevó a cabo ambas investigaciones. En relación a este punto, nuestro estudio fue llevado a cabo en células no tumorales y en ausencia de radiación u otro agente externo. Por otro lado, el estudio de Luo J. y colaboradores fue llevado a cabo en células de carcinoma esofágico radioresistentes, destacando que la radiación y más aún la adquisición de radioresistencia conlleva a una serie de modificaciones tanto a nivel de expresión génica como a nivel de regulación epigenética (Smits K. y col, 2014 y Sage E. y Shikazono N., 2017).

En resumen, los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de esta tesis posicionan al factor de transcripción *SALL2* como un posible nuevo regulador de la migración celular, estos hallazgos cobran suma importancia ya que si bien la migración celular es un proceso clave a nivel fisiológico, su desregulación trae consigo serias consecuencias siendo una de estas la formación de tumores y su posterior propagación (Rodríguez L. y Schneider I.C., 2013). En relación a este último punto, *SALL2* ha sido vinculado con cáncer y por consiguiente un estudio más profundo de su rol en el proceso migratorio a nivel fisiológico y posteriormente extrapolando a un contexto de cáncer, podría ser clave para dilucidar su rol en esta patología.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis, se concluye lo siguiente:

1. El factor de transcripción SALL2 es requerido para la migración de Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs).
2. SALL2 regula la polaridad celular, favoreciendo estados altamente polarizados.
3. SALL2 no afecta la formación de protrusiones migratorias de tipo lamelipodio y filopodio a las 16 horas posteriores a la inducción de la migración.
4. SALL2 promueve el “spreading” celular a tiempos tardíos.
5. SALL2 promueve la adhesión celular.
6. SALL2 regula la dinámica o recambio de las adhesiones focales, posiblemente a través de la activación de la quinasa de adhesiones focales FAK.
7. SALL2 regula la migración celular posiblemente a través de varios genes candidatos a convertirse en blancos transcripcionales de SALL2.

7. REFERENCIAS

- Alagaratnam S., Lind, G., Kraggerud, S., Lothe, R. & Skotheim, R. I. (2011). The testicular germ cell tumour transcriptome. *Int. J. Androl.* 34, 133–50.
- Batlle E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J. & García de Herreros A. (2000). The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–89.
- Berridge M. J. (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 297–309.
- Blanchoin L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. (2014). Actin dynamic, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94: 235 – 263.
- Böhm J., Buck A., Borozdin W., Mannan A. U., Matysiak-Scholze U., Adham I., Schulz-Schaeffer W., Floss T., Wurst W., Kohlhase J. & Barrionuevo F. (2008). Sall1, sall2, and sall4 are required for neural tube closure in mice. *Am. J. Pathol.* 173, 1455–63.
- Boyer L., Lee T., Cole M., Johnstone S., Levine S., Zucker J., Guenther M., Kumar R., Murray H., Jenner R., Gifford D., Melton D., Jaenisch R. & Young R.A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947–956.
- Bradford M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Broussard J., Webb, D. & Kaverina, I. (2008). Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 85–90.
- Campos T., Ziehe J., Palma M., Escobar D., Tapia JC, Pincheira R. & Castro AF. (2016). Rheb promotes cancer cell survival through p27Kip1-dependent activation of autophagy. *Mol. Carcinog.* 55, 220–229.
- Chai L. (2011). The role of HSAL (SALL) genes in proliferation and differentiation in normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Transfusion* 51 Suppl 4, 87S–93S.
- Chang J. H., Au H.K., Lee W. C., Chi C.C., Ling T.Y., Wang L.M., Kao S.H., Huang Y.H. & Tzeng C.R. (2013). Expression of the pluripotent transcription factor OCT4 promotes cell migration in endometriosis. *Fertil. Steril.* 99, 1332–1339.e5.
- Chhabra E. S. & Higgs, H. N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9, 1110–1121.

De Celis J. F. & Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 1385–98.

Dreos R., Ambrosini G., Périer R. C. & Bucher P. (2015). The Eukaryotic Promoter Database: Expansion of EPDNew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 43, D92–D96.

Dreos R., Ambrosini G., Groux R., Perier R. C. & Bucher P. (2017). The eukaryotic promoter database in its 30th year: Focus on non-vertebrate organisms. *Nucleic Acids Res.* 45, D51–D55.

Engelen E., Akinci U., Bryne J., Hou J., Gontan C., Moen M., Szumska D., Kockx C., van Ijcken W., Dekkers D., Demmers J., Rijkers E., Bhattacharya S., Philipson S., Pevny L., Grosveld F., Rottier R., Lenhard B. & Poot R.A. (2011). Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nat. Genet.*, 43, 607–11.

Etienne-Manneville S. (2004). Cdc42 – the centre of polarity. *J. Cell. Sci.* 117: 1291 – 1300.

Fukata M., Nakagawa M. & Kaibuchi K. (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 590–597.

Gardel M. L. Schneider IC, Aratyn-Schaus Y. & Waterman C.M. (2010). Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315–333.

Gauthier N. C., Masters T. A. & Sheetz M. P. (2012). Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol.* 22, 527–535.

Grande-García A. Echarri A., Johan de Rooij J., Nazilla B. Alderson N., Waterman-Storer C., Valdivielso J. & Del Pozo M. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J. Cell Biol.* 177, 683–694.

Goncharova E., James M., Kudryashova T., Goncharov D. & Krymskaya V. (2014). Tumor suppressors TSC1 and TSC2 differentially modulate actin cytoskeleton and motility of mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One.* 9: 111476.

Govek E., Hatten, M. E. & Van Aelst, L. (2011). The role of Rho GTPase proteins in CNS neuronal migration. *Dev. Neurobiol.* 71, 528–553.

Gu H., Li D., Sung, C. K., Yim H. & Troke P. (2012). DNA-binding and regulatory properties of the transcription factor and putative tumor suppressor p150Sal2. *NIH Public Access.* 1809, 276–283.

Guilluy C., Garcia-Mata, R. & Burridge, K. (2011). Rho protein crosstalk: Another social network? *Trends Cell Biol.* 21, 718–726.

Hamadi A., Bouali M., Dontenwill M., Stoeckel H., Takeda K. & Rondé P. (2005). Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *J. Cell Sci.* 118, 4415–4425.

Hermosilla V., Hepp M., Escobar D., Farkas C., Riffo E.N., Castro A.F. & Pincheira R. (2017). Developmental SALL2 transcription factor; a new player in cancer. *Carcinogenesis*. doi: 10.1093/carcin/bgx036. [Epub ahead of print].

Huttenlocher A. & Horwitz A.R. (2008). Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb Perspectives Biology.* 1;3 (9):a005074.

Itou J., Tanaka S., Li W., Iida A., Sehara-Fujisawa A., Sato F. & Toi M. (2017). The Sal-like 4-integrin $\alpha 6 \beta 1$ network promotes cell migration for metastasis via activation of focal adhesion dynamics in basal-like breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1864, 76–88.

Kalluri R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 582–598.

Kelberman D., Islam L., Lakowski J., Bacchelli C., Chanudet E., Lescai F., Patel A., Stupka E., Buck A., Wolf S., Beales P., Jacques T., Bitner-Glindzicz M., Alki Liasis A., Lehmann O., Kohlhase J., Nischal K. & Sowden J. (2014). Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Hum. Mol. Genet.* 15:23, 2511-26.

Kiefer, S. M., McDill, B. W., Yang, J. & Rauchman. (2002). Murine Sall1 represses transcription by recruiting a histone deacetylase complex. *J Biol Chem* 277, 14869-76.

Kim B., Hong Y., Lee S., Liu P., Lim J.H., Lee Y., Lee T., Chang K. & Hong Y. (2015). Therapeutic implications for overcoming radiation resistance in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26880–26913.

Kirfel G., Rigort A., Borm B. & Herzog V. (2004). Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *Eur. J. Cell. Biol.* 83: 717 – 724.

Kohlhase J., Schuh R., Dowe G., Kuhnlein R., Jackle H., Schroeder B., Schulz-Schaeffer W., Kretschmar H., Kohler A., Muller U., Raab-Vetter M., Burkhardt E., Engel W. & Stick R. (1996). Isolation, characterization, and organ-specific expression of Two Novel Human Zinc Finger Genes Related to the *Drosophila* Gene spalt. *Genomics* 298, 291–298.

Kohlhase J., Altmann, M., Archangelo, L., Dixkens, C. & Engel, W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2. *Genome* 11, 64–8.

Kühnlein R. P., Frommer G., Friedrich M., Gonzalez-Gaitan M., Weber A., Wagner-Bernholz J., Gehring W., Jackle H. & Schuh R. (1994). Spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 13, 168–79.

Kultima K., Jergil M., Salter H., Gustafson A.L., Dencker L. & Stigson M. (2010). Early transcriptional responses in mouse embryos as a basis for selection of molecular markers predictive of valproic acid teratogenicity. *Reprod. Toxicol.* 30, 457–68.

Langenberg T., Kahana A., Wszalek J. A. & Halloran M. C. (2009). The Eye Organizes Neural Crest Cell Migration. *NIH Public Access.* 237, 1645–1652.

Lawson C. D. & Burridge, K. (2014). The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration. *Small GTPases* 5, e27958.

Le Clainche C. & Carlier M.F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev.* 88, 489-513.

Li Chi-Ming, Guo M., Borczuk A., Powell C. A., Wei M., Thaker H. M., Friedman R., Klein U. & Tycko B. (2002). Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am. J. Pathol.* 160, 2181–90.

Li D., Tian Y., Ma Y. & Benjamin, T. (2004). p150 Sal2 is a p53-Independent regulator of p21(WAF1/CIP). *Mol. Cell Biol.* 24, 3885–3893.

Li R. & Gundersen G.G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:860-73.

Liu H., Liu Q., Ge Y., Zhao Q., Zheng X. & Zhao1 Y. (2016). hTERT promotes cell adhesion and migration independent of telomerase activity. *Sci. Rep.* 6, 22886.

Luo J., Wang W., Tang Y., Zhou D., Gao Y., Zhang Q., Zhou X., Zhu H., Xing L. & Yu J. mRNA and methylation profiling of radioresistant esophageal cancer cells : the involvement of Sall2 in acquired aggressive phenotypes. *J. of Cancer* 8(4): 646–656.

Ma Y., Li D., Chai L., Luciani A. M., Ford D., Morgan J. & Maizel A. L. (2001). Cloning and characterization of two promoters for the human HSAL2 gene and their transcriptional repression by the Wilms tumor suppressor gene product. *J. Biol. Chem.* 276, 48223–30.

McAnulty R. J. (2007). Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 666–671.

McGrath J. L. (2007). Cell Spreading: The Power to Simplify. *Curr. Biol.* 17, 357–358.

Mendoza P., Ortiz R., Díaz J., Quest A., Leyton L., Dwayne Stupack D. & Torres V. (2013). Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J. Cell Sci.* 126, 3835–47.

Miller N., Lawson, C., Chen, X. L., Lim, S.-T. & Schlaepfer, D. (2012). Rgnef (p190RhoGEF) knockout inhibits RhoA activity, focal adhesion establishment, and cell motility downstream of integrins. *PLoS One* 7, e37830.

Mokalled M., Johnson A., Kim Y., Oh J. & Olson E. (2010). Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. *Development* 137, 2365–2374.

Nie J., Stewart, R., Zhang, H., Thomson, J. a, Ruan, F., Cui, X., & Wei, H. (2011). TF-Cluster: a pipeline for identifying functionally coordinated transcription factors via network decomposition of the shared coexpression connectivity matrix (SCCM). *BMC Systems Biology*, 5(1), 53.

Nielsen T. O., Hsu F. D., O'Connell J. X., Gilks C. B., Sorensen Poul H.B, Linn S., West R. B., Liu C. L., Botstein D., Brown P. O. & van de Rijn M. (2003). Tissue microarray validation of epidermal growth factor receptor and SALL2 in synovial sarcoma with comparison to tumors of similar histology. *Am. J. Pathol.* 163, 1449–56.

Quilliam L. a, Rebhun, J. F., Zong, H. & Castro, A F. (2001). Analyses of M-Ras/R-Ras3 signaling and biology. *Methods Enzymol.* 333, 187–202.

Parri M. & Chiarugi, P. (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Community Signaling* 8, 23.

Pincheira R., Baerwald M., Dunbar J. D. & Donner, D. (2009). Sall2 is a novel p75NTR-interacting protein that links NGF signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO J.* 28, 261–73.

Raftopoulou M. & Hall A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* 265: 23 – 32.

Rembold M., Loosli F., Adams R. & Joachim Wittbrodt J. (2006). Individual Cell Migration Serves as the Driving Force for Optic Vesicle Evagination. *Science* 25;313(5790):1130-4.

Ridley A., Schwartz A., Burridge K., Firtel R., Ginsberg M., Borisy G., Parsons T. & Horwitz A. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science*. 302, 5651. 1704-1709.

Rodriguez L. & Schneider, I. C. (2013). Directed cell migration in multi-cue environments. *Integr. Biol.* 5, 1306–23.

Sadok A. & Marshall, C. J. (2014). Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases* 5, e29710.

Sage E. & Shikazono N. (2016). Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 107, 125–135.

Sato A., Matsumoto Y., Koide U., Kataoka Y., Yoshida N., Yokota T., Asashima M. & Nishinakamura R. (2003). Zinc Finger Protein Sall2 Is Not Essential for Embryonic and Kidney Development. *Mol. Cell Biol.* 23, 62–69.

Schubert R., Strohmeyer N., Bharadwaj M., Ramanathan S.P., Krieg M., Friedrichs J., Franz C.M. & Muller D. (2014). Assay for characterizing the recovery of vertebrate cells for adhesion measurements by single-cell force spectroscopy. *FEBS Lett.* 588, 3639–3648.

Silverman-Gavrila R., Silverman-Gavrila L., Hou G., Zhang M., Charlton M. & Bendeck M. (2011). Rear polarization of the microtubule-organizing center in neointimal smooth muscle cells depends on PKC δ , ARPC5, and RHAMM. *Am. J. Pathol.* 178, 895–910.

Smits K., Melotte V., Niessen H., Dubois L., Oberije C., Troost E., Starmans M., Boutros P., Vooijs M., Engeland M. & Lambin P. (2014). Epigenetics in radiotherapy: Where are we heading? *Radiother. Oncol.* 111, 168–177.

Spiering D. & Hodgson, L. (2011). Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhes. Migr.* 5, 170–180.

Song B., Liu, J., Chen, X. & Xu, Y. (2010). A modified lentiviral vector construction system. *Life Sci. J.* 7, 42–46.

Sun H., & Taneja, R. (2007). Analysis of transformation and tumorigenicity using Mouse Embryonic Fibroblast Cells. *Methods Mol. Biol.* 383, 303–310.

Sun H., Gulbagci, N. T. & Taneja, R. (2007). Analysis of growth properties and cell cycle regulation using mouse embryonic fibroblast cells. *Methods Mol. Biol.* 383, 311–9.

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, e46486.

Suvà M. L., Rheinbay E., Gillespie S. M., Patel A. P., Wakimoto H., Rabkin S. D., Bernstein B. E. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3), 580–94.

Sweetman D. & Münsterberg, A. (2006). The vertebrate spalt genes in development and disease. *Dev. Biol.* 293, 285–93.

Tomar A., Lim, S.-T., Lim, Y. & Schlaepfer, D. (2009). A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J. Cell Sci.* 122, 3005–3005.

Towbin H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145–9.

Tsai F.-C., Kuo G.-H., Chang S.-W. & Tsai P.-J. (2015). Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *Biomed Res. Int.* 409245.

Van den Berg D., Snoek T., Mullin N.P, Yates A., Bezstarosti K., Demmers J., Chambers I. & Poot R.A. (2010) An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 6, 369–381.

Vedula S., Ravasio A., Lim C. T. & Ladoux B. (2013). Collective cell migration: a mechanistic perspective. *Physiology* 28, 370–9.

Wehrle-Haller, B. (2011). Structure and function of focal adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 116–124.

Wehrle-Haller B. (2012). Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 569–581.

Williams A. & Brenda L. Bohnsack B. (2015). Neural Crest Derivatives in Ocular Development: Discerning the Eye of the Storm. *HHS Public Access.* 28, 1304–1314.

Wolf J., Müller-Decker K., Flechtenmacher C., Zhang F., Shahmoradgoli M., Mills GB., Hoheisel J. & Boettcher M. (2014). An in vivo RNAi screen identifies SALL1 as a tumor suppressor in human breast cancer with a role in CDH1 regulation. *Oncogene* 33, 4273–4278.

Wozniak M. A., Modzelewska, K., Kwong, L. & Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1692, 103–119.

Yang L., Wang L. & Zheng Y. (2006). Gene Targeting of Cdc42 and Cdc42GAP Affirms the Critical Involvement of Cdc42 in Filopodia Induction, Directed Migration, and Proliferation in Primary Mouse Embryonic Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* 17, 4675–4685.

Yuan X., Zhang X., Zhang W., Liang W., Zhang P., Shi H., Zhang B., Shao M., Yan Y., Qian H. & Xu W. (2016). SALL4 promotes gastric cancer progression through activating CD44 expression. *Oncogenesis* 5, e268.

Zagórska A., Deak M., Campbell D., Banerjee S., Hirano M., Aizawa S., Prescott A. & Alessi D. (2012). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Sci. Signal.* 3, 115.

Zhang D., Jiang F., Wang X. & Li G. (2017). Knockdown of SALL4 Inhibits Proliferation Migration and Invasion in Osteosarcoma Cells. 25, 763–771.

Zhu J. Y., Abate, M., Rice, P. W. & Cole, C. N. (1991). The ability of simian virus 40 large T antigen to immortalize primary mouse embryo fibroblasts cosegregates with its ability to bind to p53. *J. Virol.* 65, 6872–80.



ANEXOS

Anexo1: Determinación de isoforma predominante de SALL2 en MEFs.

Se determinó la isoforma predominante de SALL2 mediante la realización de un RT-PCR utilizando como control positivo células P19 de ratón, que expresan ambas isoformas (Kultima K. *et al.*, 2010), y GAPDH como gen normalizador. Como se observa en la figura a continuación, la isoforma predominante en fibroblastos embrionarios de ratón corresponde a la isoforma E1A, por otro lado la isoforma E1 es prácticamente indistinguible en células MEFs, lo que significa que los niveles de expresión de esta isoforma son significativamente menores en comparación con los niveles de expresión de la isoforma E1A.

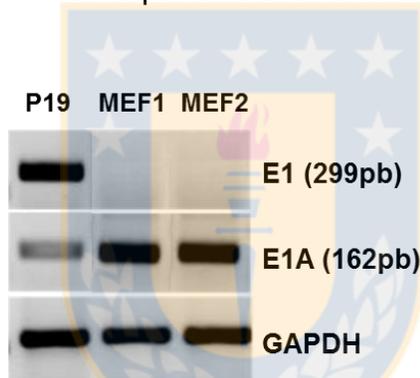


Figura 19: E1A es la isoforma de SALL2 predominante en MEFs. ARN total aislado de células P19 se utilizó como control positivo, isoforma E1A (162 pb) es detectada entre ciclo 25-30 e isoforma E1 (299 pb) es indetectable en células MEFs incluso después de 35 ciclos de amplificación. Se utilizaron set de partidores específicos para cada isoforma de la proteína SALL2. Fuente: Elaboración propia.

Anexo 2: Evaluación de viabilidad celular frente a condiciones de privación de suero.

A continuación se muestra el porcentaje de muerte celular bajo la condición de privación de suero utilizando el método de exclusión de Azul de tripán. Se observa que el porcentaje promedio de muerte celular alcanzado entre ambos genotipos (*Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-}) es de un 0,5%, 1%, 3%, 3,7% y 3,9% a las 0, 4, 8, 16 y 24 horas de privación de suero respectivamente. Por otro lado, no se observan diferencias significativas en presencia o ausencia de SALL2 en ninguna de las horas evaluadas ($p=1.0000$, $p=0.4255$, $p=0.0783$, $p=0.2868$ y $p=0.9304$ correspondientes a las 0, 4, 8, 16 y 24 horas respectivamente).

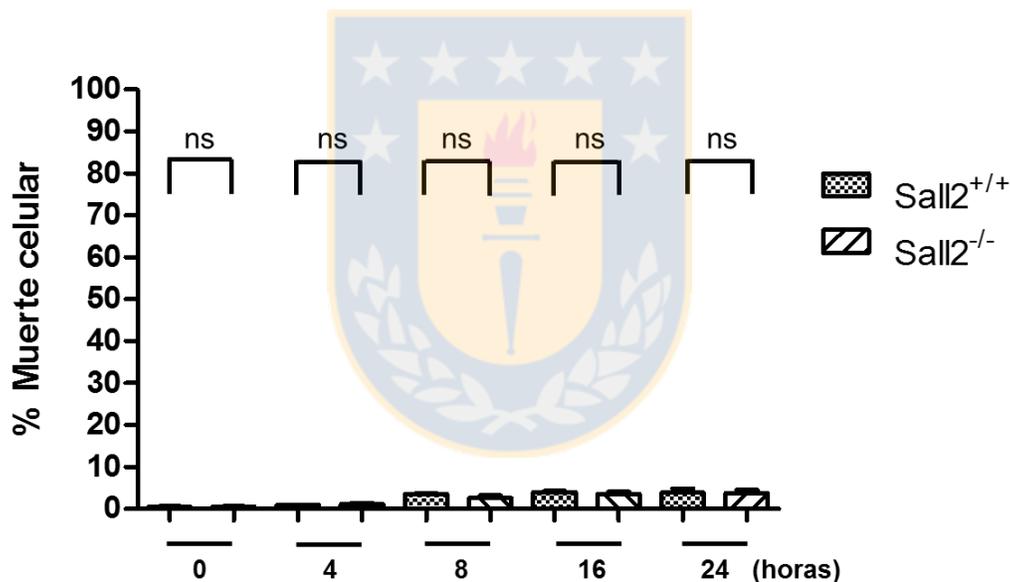


Figura 20: Viabilidad celular frente a privación de suero. Gráfico de viabilidad celular (expresada como porcentaje de muerte) de MEFs inmortalizadas *Sall2*^{+/+} y *Sall2*^{-/-} evaluada a diferentes tiempos de privación de suero (0, 4, 8, 16 y 24 hrs), utilizando el ensayo de exclusión con azul de tripán. (**ns** indica $p > 0.05$ basado en el test t-Student no pareado). Resultado correspondiente a un experimento independiente realizado en triplicado. Fuente: Elaboración propia.