



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

DIRECCIÓN DE POSTGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

El rol de SALL2 en la regulación de la transición epitelio mesénquima en cáncer de colon

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Diego Benítez Riquelme
CONCEPCIÓN - CHILE

2025

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

Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

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

Dr. Iván González Chavarría
Profesor Co-guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Roberto Elizondo Vega
Evaluador
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Jorge Toledo Alonso
Evaluador
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Julio Tapia Pineda
Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. Ariel Castro Alma
Director Programa de Doctorado
Facultad de Ciencias Biológicas

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido un desafío tanto intelectual como personal, y no habría sido posible sin el apoyo de numerosas personas e instituciones, a quienes deseo expresar mi más sincera gratitud.

En primer lugar, agradezco a la Universidad de Concepción y a la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en un entorno académico de excelencia. A mi directora de tesis, Dra. Roxana Pincheira Barrera, le expreso mi más profundo agradecimiento por su invaluable guía, paciencia y apoyo incondicional durante estos años. Su orientación ha sido fundamental en cada etapa de este proyecto. Al Dr. Iván A. González Chavarría, co-guía de esta tesis, por todos sus consejos, teóricos y experimentales, los cuales ayudaron a dar forma y buen término a este proyecto. Asimismo, agradezco a los miembros de mi comité evaluador, Dr. Jorge R. Toledo Alonso, Dr. Roberto J. Elizondo Vega y Dr. Julio C. Tapia Pineda, por sus valiosas sugerencias y aportes, que enriquecieron significativamente este trabajo.

Este proyecto no habría sido posible sin el respaldo financiero de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), a través de la Beca de Doctorado Nacional 2019 (N°21190334), así como del financiamiento otorgado por los proyectos FONDECYT Regular adjudicados por los investigadores principales de mi laboratorio (N°1191172, N°1241771, N°1201215). Su apoyo fue esencial para la ejecución de los experimentos y la difusión de los resultados en congresos científicos.

Extiendo mi reconocimiento a mis colegas y compañeros del Laboratorio de Transducción de Señales y Cáncer (TSC), quienes, con su colaboración, discusiones científicas y amistad, hicieron de este proceso una experiencia enriquecedora. Agradezco también a mis amigos y, en especial, a mis compañeros de generación del doctorado, por recordarme la importancia de equilibrar el trabajo con la vida.

Agradezco al Centro Alemán de Investigación del Cáncer (DKFZ) por permitirme realizar parte de mi tesis en el laboratorio del Dr. Rene Jackstadt, así como a todos los miembros de su grupo de investigación por su cálida acogida y por hacer de mi estancia una experiencia grata y enriquecedora.

Finalmente, deseo expresar mi más profunda gratitud a mi familia y seres queridos. En especial, quiero dedicar un reconocimiento sincero a mi madre, María Riquelme Jaque, cuyo amor incondicional, apoyo constante y sacrificio han sido pilares fundamentales en mi vida. Su dedicación y esfuerzo incansable no solo me han enseñado el valor del trabajo, la perseverancia y la determinación, sino que también han sido la fuente de inspiración que me ha impulsado a alcanzar cada uno de mis objetivos. Todo lo que he logrado y lo que soy hoy es, en gran parte, reflejo de su entrega, fortaleza y de su inquebrantable confianza en mí.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial, con una alta mortalidad asociada principalmente al desarrollo de metástasis. Este proceso involucra eventos como la migración e invasión celular, regulados en parte por la transición epitelio-mesenquimal (EMT), la cual otorga a las células tumorales un fenotipo más agresivo y resistente a la quimioterapia. Estudios en cáncer de ovario, mama y esófago han vinculado a *SALL2* con funciones supresoras tumorales y con la modulación de procesos relacionados con la EMT. Si bien la función de *SALL2* en cáncer colorrectal se ha asociado a la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina, aún se desconoce su función en la regulación de la EMT.

Este estudio tiene como objetivo evaluar si la pérdida de *SALL2* en cáncer de colon favorece la malignidad tumoral a través de la EMT. Para ello, se emplearon modelos celulares *in vitro* con pérdida y ganancia de *SALL2*, incluyendo las líneas celulares SW480, SW620 y HT-29, así como modelos de organoides de ratón AKP con y sin expresión de *Sall2*. Además, se realizaron experimentos *in vivo* mediante microinyecciones de organoides en modelos murinos.

Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de *SALL2* favorece la proliferación celular, aumenta la migración e induce cambios morfológicos en el citoesqueleto de actina. Asimismo, se observó una mayor resistencia a quimioterapéuticos clásicos usados en el tratamiento de la enfermedad en células deficientes de *SALL2*. Todos estos resultados fueron revertidos en los modelos con expresión inducible de *SALL2*. En el modelo de organoides, la ausencia de *SALL2* promovió un incremento en el crecimiento y proliferación celular. Finalmente, en los estudios *in vivo*, los ratones inyectados con organoides con pérdida de *SALL2* presentaron una menor tasa de supervivencia y tumores con características histológicas asociadas a la EMT.

En conclusión, la pérdida de *SALL2* favorece una EMT parcial, promoviendo un fenotipo tumoral más agresivo, lo que se refleja en el aumento de la proliferación, migración y resistencia a quimioterapia, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Estos hallazgos sugieren que *SALL2* podría desempeñar un papel clave en la regulación de la EMT y la progresión del CCR, representando un potencial blanco terapéutico en esta enfermedad.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the second leading cause of cancer-related death worldwide, with high mortality primarily associated with the development of metastasis. This process involves events such as cell migration and invasion, which are partially regulated by the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a process that confers tumor cells with a more aggressive and chemotherapy-resistant phenotype. Studies in ovarian, breast, and esophageal cancers have linked SALL2 to tumor suppressor functions and the modulation of processes related to EMT. Although the role of SALL2 in colorectal cancer has been associated with the inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway, its function in EMT regulation remains unknown.

This study aims to evaluate whether the loss of SALL2 in colon cancer promotes tumor malignancy through EMT. To address this, we employed *in vitro* cellular models with SALL2 loss and gain of function, including the SW480, SW620, and HT-29 cell lines, as well as AKP murine organoid models with and without *Sall2* expression. Additionally, *in vivo* experiments were conducted using organoid microinjections in murine models.

The results indicate that SALL2 loss enhances cell proliferation, increases migration, and induces morphological changes in the actin cytoskeleton. Moreover, SALL2-deficient cells exhibited greater resistance to conventional chemotherapeutic agents used in CRC treatment. In the organoid model, the absence of *SALL2* led to increased growth and proliferation. Finally, *in vivo* studies revealed that mice injected with organoids lacking SALL2 had a lower survival rate and developed tumors with histological features associated with EMT.

In conclusion, SALL2 loss promotes a partial EMT, leading to a more aggressive tumor phenotype characterized by increased proliferation, migration, and chemoresistance in both *in vitro* and *in vivo* models. These findings suggest that SALL2 may play a key role in EMT regulation and CRC progression, representing a potential therapeutic target for this disease.

Índice general

Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	4
Lista de Abreviaturas	8
1 Introducción	10
1.1 Epidemiología del Cáncer Colorrectal a Nivel Mundial	10
1.2 Epidemiología del cáncer colorrectal en Chile	10
1.3 Etiología del Cáncer Colorrectal	11
1.4 Metástasis Colorrectal	14
1.5 Transición Epitelio-Mesénquima (EMT)	15
1.6 Factor de transcripción <i>Spalt-like 2</i> (SALL2)	18
1.7 SALL2 en cáncer	21
1.8 Relación de SALL2 y EMT	21
2 Hipótesis y Objetivos	24
2.1 Hipótesis	24
2.2 Objetivo General	24
2.3 Objetivos Específicos	24
3 Materiales Y Métodos	25
3.1 Materiales	25
3.1.1 Reactivos	25
3.1.2 Plásmidos	25
3.1.3 Anticuerpos y sondas fluorescentes	26
3.1.4 Partidores	26
3.2 Métodos	26
3.2.1 Cultivo celular	26
3.2.2 Generación de modelos celulares con pérdida de función de SALL2 mediante el sistema CRISPR/Cas9	26
3.2.3 Generación de modelos celulares con ganancia de función de SALL2 mediante el sistema inducido por tetraciclina	28
3.2.3.1 Transfección de células HEK293T con lipofectamina	28
3.2.3.2 Transducción de células SW480, SW620 y HT-29 con partícu- las lentivirales	28
3.2.4 Ensayo de proliferación mediante conteo celular	28
3.2.5 Ensayo de proliferación clonal	29

3.2.6	Ensayo de migración en transwell	29
3.2.7	Ensayo de viabilidad celular utilizando XTT	29
3.2.8	Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot	29
3.2.9	Extracción de ARN y generación de ADNc	30
3.2.10	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)	31
3.2.11	Inmunocitoquímica	31
3.2.12	Transformación bacteriana	31
3.2.13	Purificación de plásmidos	32
3.2.14	Obtención de organoides AKP y cultivo de organoides	32
3.2.15	Generación de organoides AKP deficientes de <i>Sall2</i>	32
3.2.16	Ensayo de crecimiento de organoides	33
3.2.17	Ensayo de viabilidad de organoides	33
3.2.18	Microinyección guiada por colonoscopia en ratones	34
3.2.19	Inmunohistoquímica	34
3.2.20	Métodos estadísticos	35
4	Resultados	36
4.1	Objetivo Específico 1	36
4.1.1	La pérdida de <i>SALL2</i> promueve un aumento en la proliferación celular	36
4.1.2	La pérdida de <i>SALL2</i> promueve un aumento en la migración celular	43
4.1.3	La pérdida de <i>SALL2</i> promueve cambios morfológicos asociados a la reorganización del citoesqueleto de actina	45
4.1.4	La pérdida de <i>SALL2</i> induce un aumento en la resistencia a quimioterapéuticos clásicos utilizados en pacientes con cáncer de colon	48
4.1.5	Cambios en la expresión de marcadores clásicos de EMT están asociados con la modulación de los niveles de <i>SALL2</i>	50
4.1.6	La pérdida de <i>SALL2</i> favorece la localización intracelular de E-cadherina en los modelos celulares de cáncer de colon	53
4.1.7	Resumen de los resultados obtenidos en el objetivo específico 1 y la relación biológica que se establece entre ellos	60
4.2	Objetivo Específico 2	62
4.2.1	Organoides AKP murinos con pérdida de función de <i>Sall2</i> recapitulan las características evaluadas en cultivos de células de cáncer de colon humanas	62
4.2.2	Tumores generados <i>in vivo</i> a partir de organoides AKP <i>Sall2 KO</i> producen menor sobrevida en ratones	74
4.2.3	Análisis histológicos de tumores derivados de organoides AKP <i>Sall2 KO</i> se asocian con mayor malignidad y EMT	77
4.2.4	Resumen de los resultados obtenidos en el objetivo específico 2 y la relación biológica que se establece entre ellos	82
5	Discusión	83
5.1	La proliferación celular en el cáncer colorrectal y el posible rol de <i>SALL2</i>	83
5.2	La migración celular como eje central de la progresión tumoral en el cáncer colorrectal	86
5.3	<i>SALL2</i> y la resistencia a quimioterapéuticos en CRC	89
5.4	Validación en modelos tridimensionales e <i>in vivo</i> : impacto de la pérdida de <i>SALL2</i> en la progresión tumoral	92
5.5	Implicaciones clínicas y futuras direcciones	94

6 Conclusiones	97
Conclusiones	97
	97
7 Anexo	111

Índice de figuras

1.1	Tipos celulares del colon	12
1.2	Secuencia adenoma carcinoma	13
1.3	Cascada metastásica.	14
1.4	Características principales de la Transición Epitelio Mesénquima.	17
1.5	Principales vías de señalización asociadas al cáncer colorrectal.	18
1.6	Procesos regulados por la EMT en cáncer.	19
1.7	Esquema del gen <i>SALL2</i> y sus isoformas principales.	20
4.1	Expresión de <i>SALL2</i> en líneas celulares de cáncer de colon.	38
4.2	Vías de señalización activas en las diferentes líneas celulares de cáncer de colon.	40
4.3	Validación de los modelos celulares con pérdida y ganancia de función del factor de transcripción <i>SALL2</i>	41
4.4	<i>SALL2</i> inhibe la proliferación celular en modelos celulares.	42
4.5	La pérdida de <i>SALL2</i> favorece la formación de colonias.	43
4.6	La pérdida de <i>SALL2</i> se asocia con un aumento de la capacidad migratoria en modelos celulares de cáncer de colon.	44
4.7	La expresión de <i>SALL2</i> induce una disminución en el número de adhesiones focales.	45
4.8	La expresión de <i>SALL2</i> genera una pérdida de la morfología alargada.	46
4.9	La expresión de <i>SALL2</i> induce un aumento en el tamaño y la circularidad nuclear.	47
4.10	La pérdida de <i>SALL2</i> se correlaciona con una mayor resistencia a 5-FU.	49
4.11	La pérdida de <i>SALL2</i> se correlaciona con una mayor resistencia a FOLFOX.	50
4.12	La pérdida de <i>SALL2</i> genera un fenotipo de EMT parcial	52
4.13	Los niveles de E-cadherina aumentan en ausencia de <i>SALL2</i>	52
4.14	La pérdida de <i>SALL2</i> se correlaciona con el aumento de expresión de CDH1 y SNAI1	53
4.15	La expresión de <i>SALL2</i> induce un aumento en la localización de membrana de E-cadherina.	56
4.16	La expresión de <i>SALL2</i> induce un aumento en la localización de membrana de E-cadherina en células SW480	57
4.17	La expresión de <i>SALL2</i> induce una disminución de la localización nuclear de β -catenina.	58
4.18	La disminución de E-cadherina inducida por EGF requiere la presencia de <i>SALL2</i>	59
4.19	Metodología de la generación de organoides AKP <i>Sall2</i> KO.	62

4.20	Contribución de inserciones y deleciones de los diferentes clones generados a partir de los organoides murinos AKP.	64
4.21	Niveles de proteína de los clones de organoides AKP <i>Sall2 knockout</i>	65
4.22	Crecimiento de los clones de organoides AKP <i>Sall2 knockout</i> . . .	66
4.23	Cuantificación del número, tamaño y viabilidad de los clones de organoides AKP <i>SALL2 KO</i>	67
4.24	La pérdida de <i>Sall2</i> en organoides AKP favorece el crecimiento y la viabilidad celular.	69
4.25	La pérdida de <i>Sall2</i> en organoides AKP favorece el desprendimiento celular	70
4.26	La pérdida de <i>Sall2</i> en organoides AKP favorece la formación de láminas celulares bidimensionales	71
4.27	La pérdida de <i>Sall2</i> en organoides AKP favorece la formación de colonias	73
4.28	La pérdida de <i>Sall2</i> induce la expresión de marcadores asociados a la EMT en organoides AKP	74
4.29	Sistema <i>ColoView</i> para la realización de microinyección en ratones guiado por colonoscopia	75
4.30	La pérdida de <i>Sall2</i> favorece el crecimiento tumoral <i>in vivo</i> . . .	76
4.31	Tumores con pérdida de <i>Sall2</i> generan menor sobrevida en animales	76
4.32	Análisis histológico de tumores generados a partir de organoides AKP	78
4.33	Representación de características histopatológicas asociadas a malignidad tumoral	79
4.34	Análisis de marcadores específicos de proliferación y adhesión celular en tejidos tumorales	81
5.1	Conexiones moleculares de SALL2 en los procesos celulares asociados a la transición epitelio-mesénquima (EMT).	96
7.1	Genotipificación de los modelos SW480 con pérdida de función de SALL2	111
7.2	Análisis de enriquecimiento de vías asociadas a SALL2 en cáncer de colon	112
7.3	Presencia de sitios de unión para SALL2 en promotor de diferentes cadherinas	113
7.4	Presencia de sitios de unión para SALL2 en promotor de factores de transcripción clásicos asociados a la transición epitelio-mesénquima	114
7.5	La expresión de <i>SALL2</i> se asocia con una menor intensidad de filamentos de actina en células SW480	115
7.6	Secuenciación de organoide AKP <i>Sall2 knockout</i> clon 5	116
7.7	Secuenciación de organoide AKP <i>Sall2 knock out</i> clon 7	117

Índice de tablas

3.1	Reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis	25
3.2	Plásmidos utilizados para el desarrollo de esta tesis	25
3.3	Anticuerpos y sondas fluorescentes utilizados para el desarrollo de esta tesis	26
3.4	Partidores utilizados para el desarrollo de esta tesis	27
4.1	Características de líneas celulares de cáncer de colon utilizadas .	39
4.2	Características histopatológicas de los tumores analizados	78
4.3	Inmunohistoquímica en tejidos tumorales de cáncer de colon . . .	80

Lista de Abreviaturas

5-FU: 5-Fluorouracilo
ABC: *ATP-Binding Cassette*
ADN: *Ácido desoxiribonucleico*
AF: *Adhesión focal*
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
AKP: *APC - KRAS - P53*
APC: *Adenomatous Polyposis Coli*
ARN: *Ácido ribonucleico*
AXIN2: *Axis Inhibition Protein 2*
BAD: *Bcl-2-associated agonist of cell death*
BAX: *Bcl-2-associated X protein*
BCL2: *B-cell leukemia / lymphoma 2 protein*
BCL-xL: *B-cell lymphoma extra large protein*
BRAF: *B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*
c-Myc: *cellular Myelocytomatosis oncogene*
Cas9: *CRISPR-associated protein 9*
CCR: *Cáncer Colorrectal*
CD133: *Cluster of differentiation 133*
CD44: *Cluster of differentiation 44*
CDC42: *Cell division cycle 42*
ChIP-seq: *Chromatin immunoprecipitation and sequencing*
CIN: *Chromosome Instability*
CMS: *Consensus Molecular Subtype*
CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
CTGF: *Connective Tissue Growth Factor*
DMSO: *Dimethylsulfoxide*
EGF: *Epidermal Growth Factor*
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
EMT: *Epithelial-Mesenchymal Transition*
FAK: *Focal Adhesion Kinase*
FOLFIRI: *Folinic acid / 5-FU / Irinotecan*
FOLFOX: *Folinic acid / 5-FU / Oxaliplatin*
FONASA: *Fondo Nacional de Salud*
GDP: *Guanosine 5'-diphosphate*
GES: *Garantías Explícitas en Salud*
GSK3- β : *Glycogen synthase kinase-3 β*
GTP: *Guanosine 5'-triphosphate*
ISAPRE: *Instituciones de Salud Previsional*
KO: *Knock Out*

KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
LGR5: *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor*
LOH: *Loss of Heterozygosity*
MAPK: *Mitogen-activated Protein Kinase*
mCpG: *Methylation of CpG island*
MDM2: *Murine Double Minute 2*
MEC: *Matriz Extracelular*
MEF: *Mouse Embryonic Fibroblast*
MH2: *MAD (Mothers against decapentaplegic) Homology 2*
MMP: *Matrix Metalloproteinase*
MYB: *Myeloblastosis protein*
NGF: *Nerve Growth Factor*
NT: *Non targeting*
OCT4: *Octamer-binding Transcription Factor 4*
OMS: *Organización Mundial de la Salud*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinase*
PIK3CA: *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*
PTK7: *Tyrosine-protein kinase-like 7*
RhoA: *Ras homolog family member A*
RNF43: *Ring Finger Protein 43*
RT-qPCR: *Reverse Transcription quantitative Real-Time PCR*
sgRNA: *Single guide RNA*
SMAD: *Suppressor of Mothers against Decapentaplegic*
SOX2: *SRY-box transcription factor 2*
TCF/LEF: *T-Cell Factor / Lymphoid Enhancer-binding Factor*
TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*
WT: *Wild Type*
ZEB1: *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*

Capítulo 1

Introducción

1.1. Epidemiología del Cáncer Colorrectal a Nivel Mundial

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En 2022, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en conjunto con GLOBOCAN, reportó que el CCR fue el tercer tipo de cáncer más diagnosticado, con aproximadamente 9,1 millones de casos nuevos, y la segunda causa de muerte por cáncer, con cerca de 904,000 fallecimientos [Bray et al., 2024]. La alta tasa de mortalidad de esta patología se explica en parte por la detección tardía en los pacientes, momento en el cual el cáncer ya ha progresado a estados más avanzados y agresivos, lo que empeora significativamente el pronóstico de la enfermedad [Alinia et al., 2024]. Muchos pacientes en etapas avanzadas del cáncer colorrectal (según el sistema del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC)) desarrollan metástasis, principalmente en el hígado y los pulmones, lo que disminuye considerablemente la esperanza de vida [Gallicchio et al., 2022]. Las proyecciones indican que todas estas cifras continuarán aumentando en las próximas décadas, debido principalmente al envejecimiento poblacional y a la prevalencia de factores de riesgo relacionados con el estilo de vida [Bray et al., 2024]. Entre los factores de riesgo se encuentran elementos modificables, como la dieta y el tabaquismo, y no modificables, como la predisposición genética y el historial familiar de cáncer [Valle et al., 2019, Wang et al., 2019]. En general, la incidencia del CCR es más alta en países de altos ingresos, como Australia, Estados Unidos y varias naciones de Europa Occidental [Sharma et al., 2022]. No obstante, los países con economías emergentes también están experimentando un aumento en la incidencia, lo que se atribuye a la adopción de estilos de vida más urbanizados y dietas menos saludables [Deo et al., 2021]. En los países desarrollados, la implementación de programas de cribado y detección temprana ha mejorado significativamente las tasas de supervivencia. Herramientas como la colonoscopia permiten identificar lesiones precancerosas, contribuyendo así a la reducción de la mortalidad. Sin embargo, en muchos países de ingresos medios y bajos, la falta de acceso a estos programas dificulta el control efectivo de la enfermedad, lo que resulta en tasas de mortalidad más elevadas [Khan and Lengyel, 2023, Schliemann et al., 2020, Schliemann et al., 2021].

1.2. Epidemiología del cáncer colorrectal en Chile

En Chile, el CCR ha experimentado un aumento sostenido en las últimas décadas. De acuerdo con GLOBOCAN, es la segunda causa de muerte por cáncer, solo superada por el cáncer de próstata en hombres y mama en mujeres, y representa aproximadamente el 11,3% de las muertes por esta enfermedad en el país [Bray et al., 2024]. La incidencia estimada es de 19.1 casos por cada 100,000 habitantes, con una prevalencia mayor en hombres que en mujeres. Varios factores de riesgo contribuyen a esta tendencia en la población chilena. Entre ellos, el alto índice de sobrepeso, que afecta a cerca del 67% de los adultos, y el sedentarismo, que impacta al 85% de la población. A esto se suma una baja ingesta de alimentos saludables, lo cual agrava el riesgo de desarrollar cánceres digestivos, incluido el CCR. Además, el consumo de carnes rojas y procesadas, junto con el tabaquismo, se identifican como factores críticos en el contexto nacional [Hewlett, 2019].

A pesar de que el sistema de salud en Chile combina cobertura pública (FONASA) y privada (ISAPRE), siguen existiendo barreras económicas para acceder a tratamientos avanzados [Hewlett, 2019]. Así, el costo del tratamiento de CCR varía entre \$1.125.000 y \$2.735.000 en el sistema público y entre 11 y 23 millones en el privado [Espinoza et al., 2022], cubiertos en parte por el sistema de Garantías Explícitas en Salud (GES). En este contexto, leyes y planes a nivel nacional buscan universalizar cuidados oncológicos y mejorar la infraestructura asociada al tratamiento de esta patología [Congreso Nacional de Chile, 2020, Ministerio de Salud de Chile, 2018]. Además de este desafío económico, la falta de un registro nacional consolidado del cáncer complica la planificación de políticas públicas más específicas e identificar con precisión patrones epidemiológicos en el país [Taramasco et al., 2024].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es crucial profundizar en los mecanismos biológicos que originan esta enfermedad. Entender su desarrollo a nivel molecular y celular permitirá identificar nuevas oportunidades terapéuticas, desarrollar tratamientos más eficaces y mejorar las estrategias de detección temprana, lo que podría reducir significativamente la mortalidad asociada a esta patología.

1.3. Etiología del Cáncer Colorrectal

El CCR es una enfermedad compleja y multifactorial que involucra tanto factores genéticos como ambientales. Desde el punto de vista histológico, la mayoría de los tumores colorrectales corresponden a adenocarcinomas, es decir, tumores que se originan en las células glandulares del revestimiento interno del colon o el recto, como los enterocitos, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendocrinas y células madre intestinales, tal como se ilustra en la **Figura 1.1** [Fleming et al., 2012]. Independientemente de las vías moleculares que conducen a la formación de adenocarcinomas, la mayoría de los casos siguen etapas clave: aparición de un epitelio hiperproliferativo, desarrollo de criptas displásicas focales y formación macroscópica de adenomas, ya sean tubulares, vellosos o tubulovellosos [Saoudi González et al., 2023]. Además, la progresión del CCR se ha descrito tradicionalmente mediante el modelo adenoma-carcinoma, propuesto en 1988 por Bert Vogelstein y colaboradores. Este modelo explica cómo un pólipo benigno se transforma en un carcinoma invasivo a través de una acumulación secuencial de alteraciones genéticas (**Figura 1.2**) [Vogelstein et al., 1988]. Sin embargo, aunque el modelo adenoma-carcinoma facilita la comprensión general de la progresión del CCR, no captura completamente la complejidad de esta enfermedad. En particular, no aborda adecuada-

mente la heterogeneidad intratumoral ni la inestabilidad genética, factores cruciales en la progresión clonal. En este contexto, diversos estudios han señalado que la progresión del cáncer no sigue una vía única, sino que involucra mutaciones principales (*drivers*) y pasajeras (*passengers*), las cuales favorecen la heterogeneidad intratumoral. Esta heterogeneidad se asocia estrechamente con la resistencia a terapias y la reaparición de la enfermedad [Anupriya et al., 2022]. Asimismo, se han identificado rutas distintas de adquisición de mutaciones en etapas tempranas y tardías del CCR. En las etapas iniciales se observa un mayor número de mutaciones *drivers*, lo que promueve la formación de subpoblaciones celulares y contribuye al aumento de la heterogeneidad intratumoral [Niida et al., 2021].

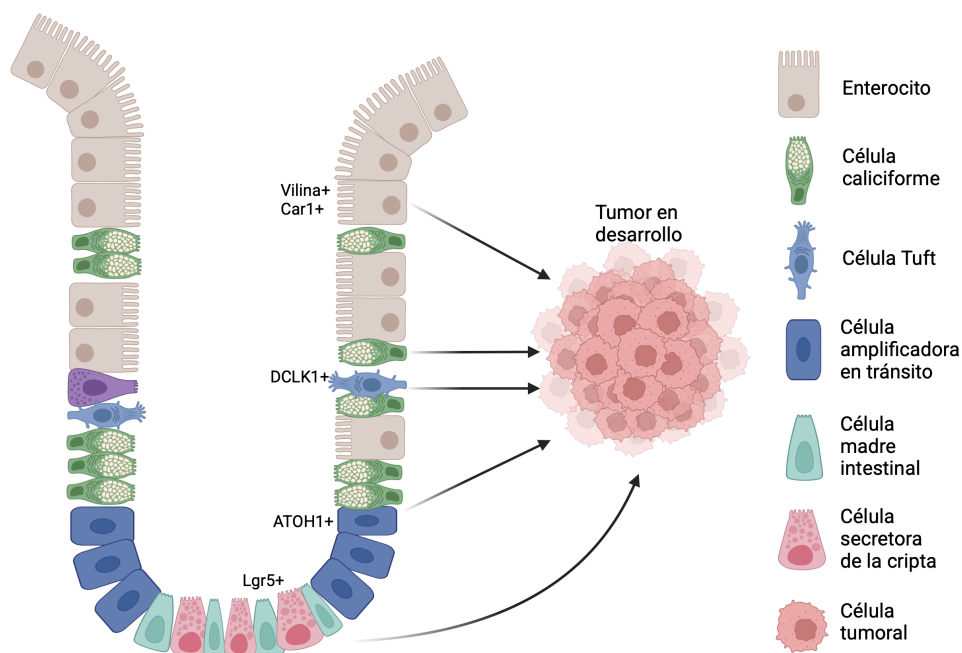


Figura 1.1: Tipos celulares del colon

Diferentes tipos celulares presentes en el epitelio del colon que pueden dar origen, a través de diferentes mecanismos, a la formación de un tumor. Tomado de [Che and Yu, 2023].

Entre las alteraciones genéticas más frecuentes se encuentra la mutación del gen *APC* (*adenomatous polyposis coli*), que provoca una desregulación en la vía de señalización Wnt/ β -catenina mediante la inhibición del complejo de degradación de β -catenina, favoreciendo su traslocación al núcleo donde promueve, mediante la regulación transcripcional, un crecimiento celular descontrolado. Las principales alteraciones del gen *APC* dan como resultado una proteína con truncamientos, perdiendo así las regiones que codifican los dominios de unión a β -catenina y los microtúbulos. Además, la pérdida de heterocigocidad e inestabilidad cromosómica observada en CCR contribuye en estas alteraciones [Zhang and Shay, 2017]. Se ha descrito, además, que estas proteínas trunca de APC pueden tener roles oncogénicos adicionales, aunque los mecanismos que subyacen a estas funciones aún no han sido completamente dilucidados. Otra de las mutaciones frecuentes en CCR es la del oncogén *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma Virus*), que activa la vía de señalización Ras-MAPK (*mitogen activated protein kinase*), facilitando la proliferación celular. Dentro de las mutaciones predominantes en CCR destacan aquellas del codón 12 (G12D, G12V y G12C) y 13 (G13D), alterando la capacidad de KRAS para hidrolizar GTP a GDP, lo que significa que la proteína permanece activa en su forma ligada a

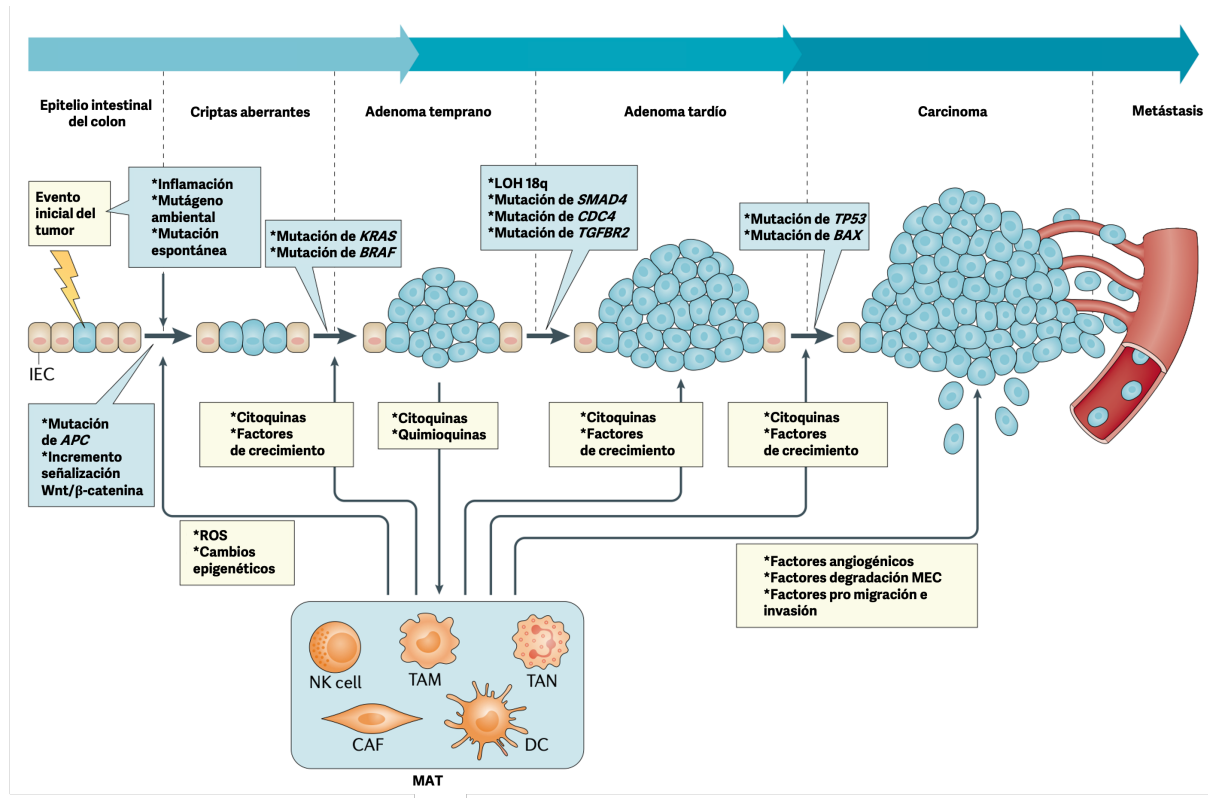


Figura 1.2: Secuencia adenoma carcinoma

El proceso de acumulación de mutaciones descrito por Vogelstein y colaboradores en 1988 se basa en la adquisición de diferentes cambios en el genoma de las células, que tiene como consecuencia la adquisición de características que favorecen el crecimiento tumoral. Además en la figura se observa la participación de las células del microambiente tumoral, que aportan otro nivel de complejidad en esta progresión. Tomado de [Schmitt and Greten, 2021].

GTP, enviando señales constantes de proliferación y supervivencia, aun en ausencia de estímulos externos [Tria et al., 2023]. Además, las mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53*, se convierten en un paso crucial para generar tumores de mayor agresividad. Las alteraciones principales evitan la unión de este factor de transcripción con el ADN [Wang et al., 2023]; sin embargo, se ha determinado que, dependiendo de la mutación que se genere, es posible obtener distintos fenotipos. Por ejemplo, las alteraciones en el residuo R273 se han relacionado con un peor pronóstico, ya que facilitan la progresión de metástasis [Hassin et al., 2022]. Finalmente, la inactivación de SMAD4 por mutaciones puntuales como R361C o D351H, ubicadas en el dominio MH2, el cual es responsable de la interacción con otras proteínas como SMAD2 y SMAD3, contribuye de manera importante a esta progresión, favoreciendo principalmente la metástasis hacia el hígado y los pulmones [Yan et al., 2016]. Además de estas alteraciones genéticas específicas, existen varias vías de señalización y proteínas que desempeñan un papel clave en la malignidad del CCR. Por ejemplo, mutaciones en *PIK3CA*, que activan la vía PI3K/AKT, promueven el aumento en la proliferación y el estado indiferenciado a través de células tumorales LGR5+, lo que confiere principalmente resistencia al tratamiento de primera línea, como FOLFOX (combinación de leucovorina, 5-fluorouracilo y oxaliplatino) o FOLFIRI (combinación de leucovorina, 5-fluorouracilo e irinotecan) [Wang et al., 2018]. De igual manera, la proteína FAK (*focal adhesión kinase*) se encuentra principalmente sobreexpresada en cáncer colo-

rectal y este aumento en su expresión confiere a las células tumorales un aumento en la migración e invasión, así como también un aumento en marcadores de pluripotencia como OCT4, CD133, CD44 y c-Myc, facilitando la diseminación de estas a tejidos distantes y adquiriendo resistencia a terapias [Xu et al., 2023] [Zhang et al., 2022]. Estos eventos moleculares destacan la importancia de múltiples vías de señalización interconectadas en el aumento de la agresividad tumoral y subrayan el potencial de estas moléculas, así como de las proteínas asociadas a ellas, como blancos terapéuticos en el tratamiento del CCR.

1.4. Metástasis Colorrectal

La metástasis es un proceso multifásico que permite a las células tumorales diseminarse desde su sitio original hacia tejidos distantes, lo que agrava significativamente el pronóstico del cáncer. En el caso del CRC, la metástasis se presenta predominantemente en el hígado y los pulmones, un fenómeno ampliamente documentado en la literatura [Cañellas-Socias et al., 2024] [Pretzsch et al., 2019]. Este patrón específico de diseminación puede explicarse por la conectividad vascular y las características anatómicas entre la región intestinal, el hígado y los pulmones. En particular, el hígado recibe sangre rica en nutrientes y desechos provenientes del tracto gastrointestinal a través de la vena porta, lo que facilita la colonización por células tumorales desprendidas del intestino. Por su parte, los pulmones están conectados a la circulación sistémica, lo que permite que las células tumorales sean transportadas y se adhieran a la red capilar pulmonar [Zhou et al., 2022]. La adhesión de las células tumorales tanto en el hígado como en los pulmones no ocurre de manera puramente mecánica, ya que en este proceso intervienen diversas proteínas. Por ejemplo, E-selectina, expresada en las células endoteliales, favorece la colonización de células de CRC en el hígado. Además, el bloqueo de E-selectina mediante polímeros sintéticos ha demostrado revertir el crecimiento de metástasis hepáticas [Rütter et al., 2024]. A pesar de los avances en el conocimiento de los factores involucrados, esta área de investigación aún no está completamente explorada. La cascada metastásica se puede resumir en una serie de etapas: (1) invasión local, que corresponde a la infiltración de células tumorales en el estroma; (2) intravasación; (3) circulación de células tumorales; (4) extravasación; y finalmente (5) colonización y crecimiento en tejidos distantes, donde se forman micro- y macrometástasis (**Figura 1.3**) [Fares et al., 2020].

A nivel molecular, no se han identificado mutaciones *drivers* exclusivas que desencadenen la metástasis, ya que diversos estudios que comparan grandes cohortes de pacientes entre tumores primarios y metastásicos no han encontrado mutaciones únicas en el cáncer metastásico [Priestley et al., 2019] [Zehir et al., 2017]. Aunque se han identificado mutaciones enriquecidas en tumores metastásicos, estas tampoco son específicas de este estado ya que también están presentes en tumores primarios avanzados. Sin embargo, se han descrito alteraciones prevalentes en cáncer metastásico que, combinadas con cambios epigenéticos, interacciones con el microambiente tumoral y adaptaciones a las presiones selectivas del entorno, impulsan la diseminación y la colonización. Por ejemplo, las alteraciones genéticas frecuentes en tumores metastásicos muestran patrones dependientes de la localización del tumor primario en el colon. Los tumores metastásicos derivados del colon ascendente presentan una alta frecuencia de mutaciones en genes como *APC* y *TP53*. En contraste, aquellos originados en el colon descendente están enriquecidos en alteraciones de genes como *KRAS*, *BRAF*, *PI3KCA*, *AKT1*, *RNF43* y *SMAD4* [Yaeger et al., 2018]. En general, estas y otras alteraciones durante la progresión tumoral afectan principalmente las vías de señalización Wnt/ β -catenina, EGF y TGF- β , las cuales regulan la biología

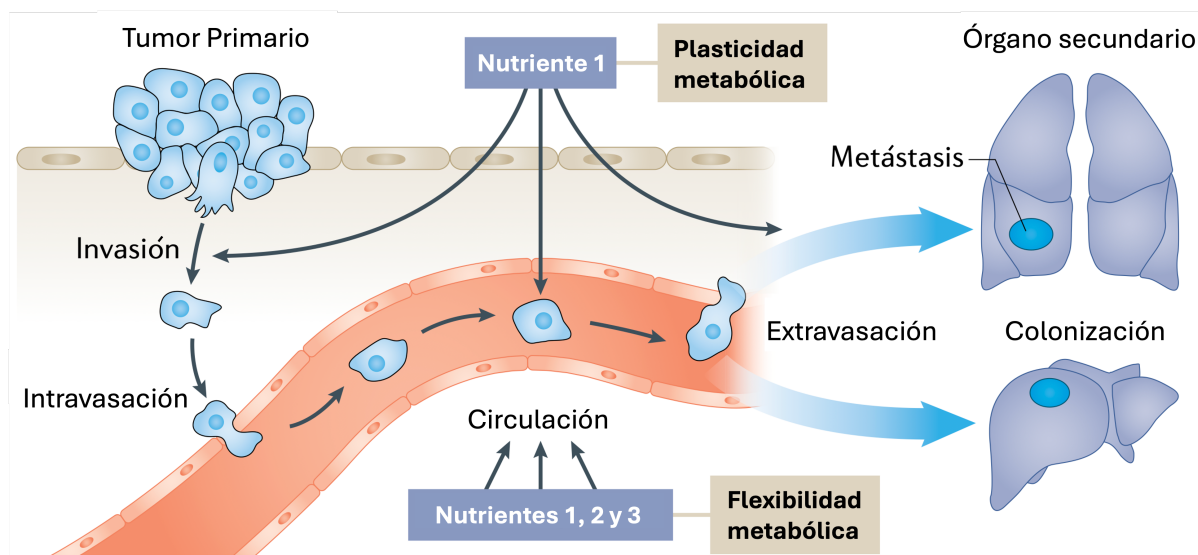


Figura 1.3: **Cascada mestastásica.**

El proceso que va desde el desprendimiento de las células en un tumor primario hasta la colonización en un lugar distante, principalmente nódulos linfáticos, hígado y pulmones, se denomina cascada metastásica. Tomado de [Bergers and Fendt, 2021].

de las células madre colónicas sanas. Esto resulta crucial para que las células tumorales logren independizarse de los factores del nicho tumoral primario, otorgándoles mayor plasticidad y capacidad de crecimiento autónomo en ambientes distintos al de su origen [Batlle and Clevers, 2017, Li et al., 2024a]. Un proceso fundamental asociado a la plasticidad y progresión tumoral es la transición epitelio mesénquima o EMT (por sus siglas en inglés *Epithelial to Mesenchymal Transition*), el cual a través de diversos mecanismos moleculares favorece el avance del cáncer colorrectal a estadios más agresivos, involucrándose en las diferentes etapas de la cascada metastásica.

1.5. Transición Epitelio-Mesénquima (EMT)

La transición epitelio-mesénquima es un proceso biológico fundamental que permite a las células epiteliales adquirir características mesenquimales, favoreciendo su migración, invasión y eventual colonización en sitios distantes [Yang et al., 2020]. Este fenómeno ocurre en tres contextos biológicos principales: el desarrollo embrionario (EMT tipo 1), la reparación de tejidos y la fibrosis (EMT tipo 2), y la progresión tumoral (EMT tipo 3). En el contexto del cáncer, la EMT tipo 3 juega un rol central en la metástasis, facilitando que las células tumorales escapen de su nicho primario, entren en circulación y colonicen nuevos órganos [Dongre and Weinberg, 2019] [Kalluri and Weinberg, 2009]. A nivel fenotípico, las células tumorales experimentan una serie de cambios que afectan tanto su morfología como su función. Uno de los cambios más característicos es la reestructuración del citoesqueleto. En las células epiteliales, el citoesqueleto está estructurado para mantener la polaridad ápico-basal clásica de este tipo de células, con uniones intercelulares firmes, como las uniones estrechas, uniones adherentes y los desmosomas, que garantizan la integridad tisular. Sin embargo, en la EMT, estas estructuras se desensamblan, lo que conlleva a la pérdida de adhesión celular y la adquisición de una morfología alargada, propia de las células mesenquimales [Nurmagambetova et al., 2023]. La reorganización de los filamentos de actina y la formación de protrusiones celulares, como pseudópodos y

lamelipodios, permiten que las células se movilen hacia tejidos vecinos. Este aumento en la motilidad es facilitado por la capacidad de las células para degradar la matriz extracelular (MEC), lo que, junto con la pérdida de adhesión epitelial, facilita la invasión a tejidos adyacentes y la diseminación del tumor [Yang et al., 2020]. Durante el proceso de migración, las células experimentan una serie de cambios, comenzando con la polarización, donde se establece asimetría estructural y funcional para generar un frente migratorio y una región trasera. Posteriormente, se observa la formación de protrusiones de membrana, y el ensamblaje y desensamblaje de adhesiones focales (AFs). Estas AFs son cruciales para que las células se anclen a la matriz extracelular y participen en la transducción de señales del entorno hacia el interior de la célula. En una célula en movimiento, la dinámica de formación y ruptura de AFs es esencial, ya que estas proporcionan puntos de anclaje y facilitan la tracción necesaria para el desplazamiento celular. Las AFs son complejos proteicos que incluyen integrinas, filamentos de actina y varias proteínas adicionales, como talinas, tensinas y vinculinas, las cuales desempeñan un papel clave en la formación, estabilización y señalización de las AFs, ya que conectan el citoesqueleto con la matriz extracelular a través de integrinas. En particular, vinculina desempeña un papel clave al mediar la interacción entre las integrinas y los filamentos de actina, estabilizando el complejo y favoreciendo la migración celular. Así, un mayor número de adhesiones focales está asociado con una mayor capacidad migratoria de la célula. Por otra parte, se han reportado cambios morfológicos a nivel nuclear, observándose núcleos más alargados en células con un programa EMT activo. Además, se ha descrito que la forma que adopta el núcleo, influenciada por la estructura del microambiente, podría a su vez favorecer la activación de la transición epitelio-mesénquima, generando así un bucle de retroalimentación [Leggett et al., 2016, Wang et al., 2025]. Se han descritos una serie de factores de transcripción que actúan como moduladores clave de la adquisición de este fenotipo. Entre estos se encuentran SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB1 y ZEB2, los cuales, en muchos contextos, inhiben la expresión de proteínas epiteliales como E-cadherina, Claudinas y Ocludinas, que son cruciales para la adhesión célula-célula. Al mismo tiempo, inducen la expresión de proteínas asociadas al fenotipo mesenquimal, como Vimentina, Fibronectina y N-cadherina, que promueven la movilidad celular [Debnath et al., 2022] [Stemmler et al., 2019]. Así, en general, la combinación de estos cambios fenotípicos y la expresión diferencial de marcadores epiteliales y mesenquimales, así como también de los factores de transcripción mencionados, son indicadores críticos de la progresión y agresividad tumoral. Cabe destacar que este programa no debe considerarse como un proceso completamente binario entre fenotipos epitelial y mesenquimal, sino como una transición continua, lo que da lugar a estados intermedios o híbridos. Este fenómeno de EMT parcial o híbrida es particularmente importante, ya que son estas células quienes tienen mayor agresividad y plasticidad, lo que contribuye a su capacidad para diseminarse y resistir tratamientos terapéuticos [Lüönd et al., 2021]. En el caso particular del CCR, se ha descrito recientemente en diferentes líneas celulares, que la inducción de un EMT parcial promueve un aumento en el potencial migratorio, un aumento en la resistencia a quimioterapia y la internalización de E-cadherina desde la membrana plasmática al citoplasma (**Figura 1.4**) [Pastorino et al., 2024].

Durante todo este proceso, diversas vías de señalización se ven involucradas, actuando en conjunto para promover la progresión tumoral (**Figura 1.5**) [Li et al., 2024a]. La hiperactivación de la vía Wnt/ β -catenina juega un papel crucial no solo en la proliferación celular, sino también en la metástasis del CCR. Cuando esta vía está desregulada, la acumulación nuclear de β -catenina activa genes clave que facilitan la migración e in-

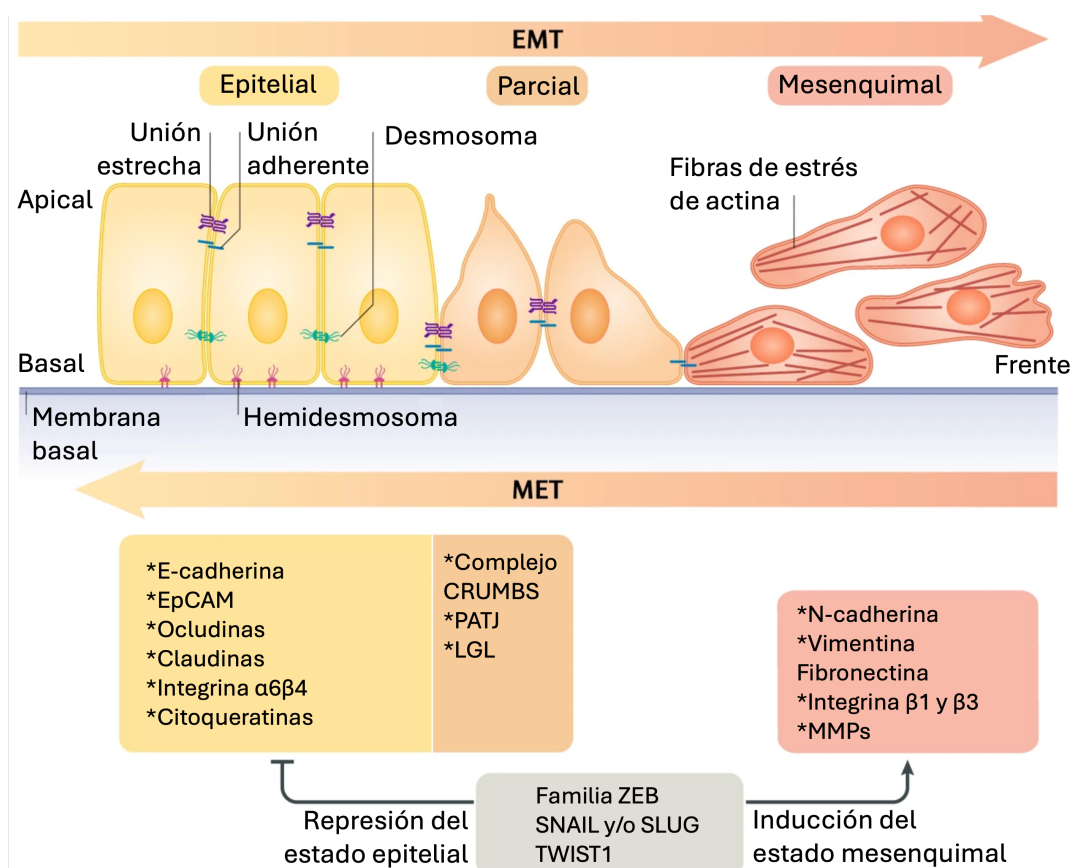


Figura 1.4: Características principales de la Transición Epitelio Mesénquima.

Las células epiteliales con polaridad apical-basal están unidas por uniones estrechas y ancladas a la membrana basal por hemidesmosomas. La EMT induce la expresión de factores de transcripción que inhiben genes epiteliales y activan genes mesenquimales, resultando en cambios celulares como la desensamble de uniones y la pérdida de polaridad. Con este nuevo fenotipo, las células adquieren movilidad e invasividad. Este proceso es reversible, permitiendo que las células mesenquimales vuelvan al estado epitelial a través de la transición mesénquima-epitelio (MET). Tomado de [Dongre and Weinberg, 2019].

vasión celular, así como la remodelación del microambiente tumoral, lo que contribuye a la metástasis mediada por la EMT. Genes como *MMP2*, *MMP9*, *SNAIL*, *ZEB1*, *TWIST*, *VIM*, *CTGF* y *CD44* están entre los más importantes en este proceso, ayudando a las células tumorales a perder sus características epiteliales, invadir tejidos adyacentes y colonizar órganos distantes. Este fenómeno contribuye significativamente a la agresividad y progresión del CCR [Zhang et al., 2022]. Adicionalmente, vías de señalización activadas por el factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$) tienen un doble papel en el CCR, ya que en las primeras etapas de la enfermedad, $TGF-\beta$ inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis; sin embargo, en las fases avanzadas, la vía $TGF-\beta$ contribuye a la EMT, promoviendo la invasión y metástasis. Además, las mutaciones previamente descritas en *SMAD4*, localizadas en el dominio MH2, están presentes en un alto porcentaje de casos de CCR avanzado [Woodford-Richens et al., 2001]. Por otro lado, la señalización mediada por EGF juega un papel crucial en el CCR ya que la unión del ligando EGF con su receptor EGFR provoca la dimerización y fosforilación del receptor, lo que activa diversas cascadas de señalización intracelular, incluyendo las vías de MAPK y PI3K/AKT. Estas vías son fundamentales para la proliferación, supervi-

vencia y migración celular [Saletti et al., 2015]. Además, EGFR está sobreexpresado en aproximadamente el 60-70% de los tumores colorrectales, y su expresión se correlaciona con estadios avanzados de la enfermedad y un pronóstico desfavorable. Cuando KRAS está constantemente activo, activa de manera persistente la vía Ras-MAPK, lo que no solo promueve la proliferación celular, sino también la invasión y migración de las células tumorales. Este estado de activación crónica favorece la diseminación metastásica al facilitar la reorganización del citoesqueleto, mediante la activación de las Rho GTPasas (RhoA, Cdc42 y Rac1) y la secreción de metaloproteinasas (MMPs), que degradan la matriz extracelular y abren camino a la invasión celular. Además, la activación aberrante de KRAS está implicada en la resistencia a la apoptosis, permitiendo que las células tumorales sobrevivan en entornos hostiles y establezcan colonias en tejidos distantes, lo que es fundamental para la metástasis. Por su parte, las mutaciones en *PIK3CA*, que activan la vía PI3K/AKT, desempeñan un papel crucial en la resistencia a la apoptosis y la progresión metastásica en las células tumorales [Wang et al., 2024]. La activación constitutiva de AKT no solo promueve la supervivencia celular mediante la fosforilación de varias proteínas proapoptóticas, sino que también favorece la EMT. Por ejemplo, AKT fosforila la proteína BAD, bloqueando su unión a Bcl-2/Bcl-xL en las mitocondrias, lo que evita la liberación de citocromo c y la activación de las caspasas, protegiendo así a las células tumorales de la apoptosis [Kennedy et al., 1999]. Además, AKT inactiva GSK3- β , una quinasa que normalmente promueve la apoptosis, lo que favorece la proliferación de las células tumorales [Hermida et al., 2017]. De igual forma, AKT fosforila a MDM2 en el residuo Ser183, aumentando su estabilidad nuclear y capacidad para degradar p53. Esta fosforilación reduce los niveles de p53 en condiciones de estrés oxidativo, suprimiendo la senescencia celular [Chibaya et al., 2021]. Dada la relevancia de la EMT en la progresión del cáncer colorrectal, resulta fundamental identificar nuevos reguladores de este proceso. La EMT no solo contribuye a la diseminación tumoral, sino que también, como se muestra en la **Figura 1.6**, está asociada con resistencia a las terapias, reprogramación metabólica y evasión del sistema inmune, lo que complica el tratamiento eficaz de la enfermedad [Brabletz et al., 2021].

Entre los posibles reguladores emergentes se encuentra SALL2, un factor de transcripción que podría desempeñar un papel en la regulación de la EMT. Comprender su función en este contexto podría abrir nuevas oportunidades terapéuticas para controlar la metástasis y mejorar los resultados clínicos en pacientes con cáncer colorrectal.

1.6. Factor de transcripción *Spalt-like 2* (SALL2)

La familia de factores de transcripción *Spalt-like* (SALL) está evolutivamente conservada en una amplia gama de organismos, incluyendo especies simples como nemátodos, y complejas como mamíferos [De Celis and Barrio, 2009]. Esta familia desempeña funciones cruciales en diversos procesos biológicos esenciales para la embriogénesis, como la formación de extremidades, el desarrollo del sistema nervioso, la morfogénesis de órganos como el corazón, riñones y pulmones, y en la mantención de células madre [Sweetman and Münsterberg, 2006]. Los genes SALL fueron inicialmente descritos en *Drosophila melanogaster*, donde cumplen un papel clave en la especificación de identidad celular y la formación de tejidos. En vertebrados, se han identificado cuatro miembros: SALL1, SALL2, SALL3, y SALL4, todos ellos caracterizados por la presencia de dominios estructurales de dedos de zinc que facilitan la unión al ADN y la regulación transcripcional de múltiples genes objetivo [Kohlhase et al., 2000]. En particular, SALL1 y SALL4

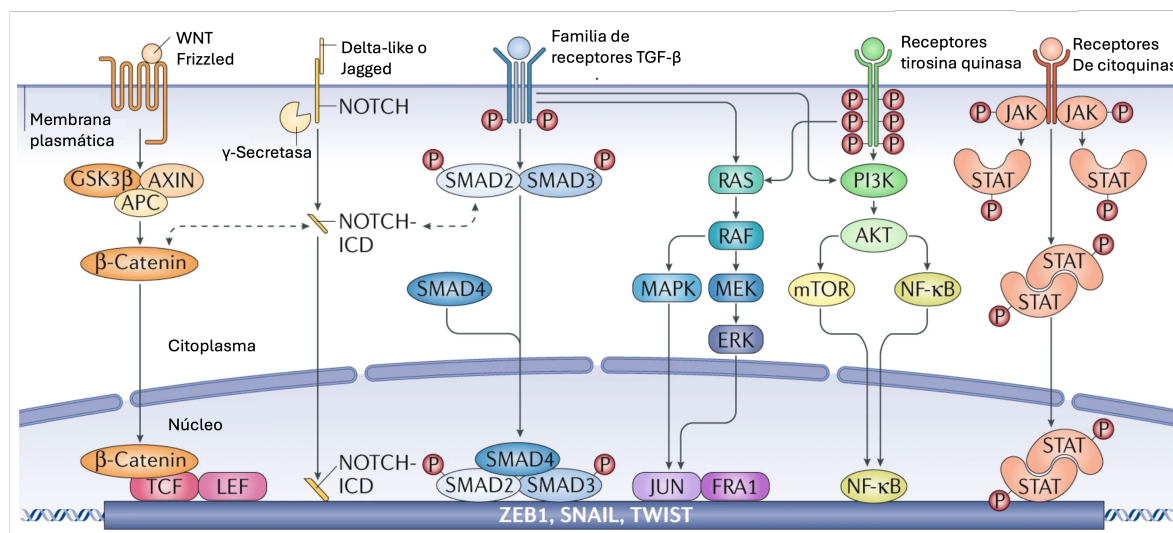


Figura 1.5: Principales vías de señalización asociadas al cáncer colorrectal.

Este panel muestra diversas vías, incluyendo las vías Wnt, IGF2, ErbB, TGF- β , Notch, Hedgehog y TNF α . Detalla cómo las señales extracelulares se transmiten a través de receptores y moléculas intracelulares hacia el núcleo, enfatizando la complejidad y la interconexión de estas redes de señalización en el desarrollo y la progresión del cáncer colorrectal. Tomado de [Dongre and Weinberg, 2019].

se han asociado con la pluripotencia de células madre embrionarias, mientras que SALL3 juega un papel en la regulación del desarrollo del sistema nervioso [Álvarez et al., 2021]. SALL2 destaca por su papel en una variedad de procesos celulares y del desarrollo. A pesar de la gran similitud entre los miembros de la familia SALL en cuanto a la conservación de los dominios de dedos de zinc, la región C-terminal de SALL2 no muestra homología con los otros miembros, lo que sugiere que puede tener funciones específicas no compartidas con los demás factores SALL [Hermosilla et al., 2017]. El gen *SALL2* está localizado en el brazo largo del cromosoma 14 en humanos y codifica al menos dos isoformas principales: E1 y E1A, generadas a partir del uso de promotores alternativos: P1 y P2, respectivamente, como se observa en la **Figura 1.7**. La isoforma E1 se expresa predominantemente en tejidos como el pulmón, riñón, timo y testículos, mientras que la isoforma E1A tiene una expresión más generalizada en diversos tejidos, aunque ambas isoformas son altamente expresadas en el cerebro [Ma et al., 2001]. Esta distribución diferencial sugiere que SALL2 podría tener funciones contextuales, específicas del tipo celular y del microambiente fisiopatológico.

Diversas funciones se han descrito para SALL2 principalmente en el contexto del desarrollo embrionario, las cuales se relacionan con la migración celular y la diferenciación. Estudios en modelos animales han proporcionado evidencia del papel crucial de SALL2 en la morfogénesis de órganos. Por ejemplo, se ha demostrado que ratones *knockout* para *Sall2* presentan defectos en el cierre del tubo neural, un proceso altamente dependiente de la migración y proliferación de células neurales durante el desarrollo temprano del sistema nervioso central [Böhm et al., 2008]. Asimismo, se ha observado que la delección de *Sall2* en células PC12 y en neuronas hipocámpales primarias de rata altera la extensión de neuritas en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF), sugiriendo un rol regulador en la plasticidad neuronal y la proyección axonal [Pincheira et al., 2009, Xiong et al., 2024]. Esta evidencia resalta la importancia de SALL2 en la organización y migración neuronal, procesos clave para el desarrollo adecuado del sistema nervioso. Otra de las funciones

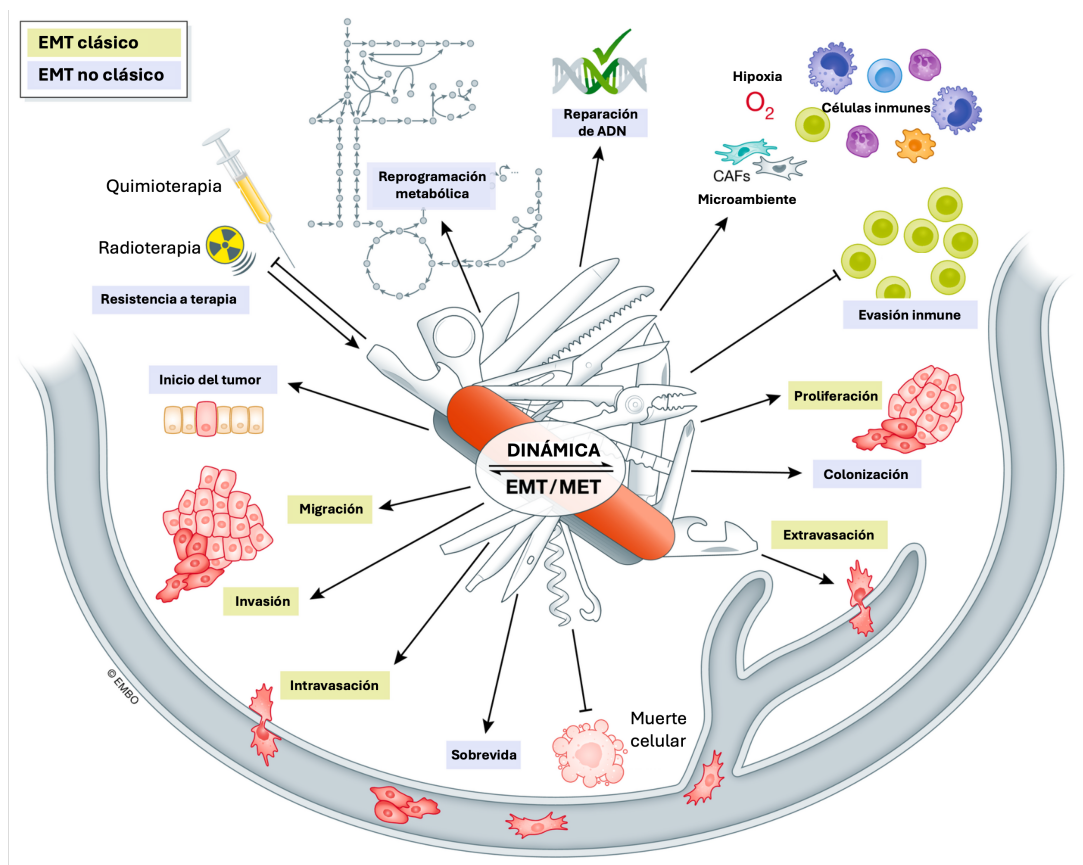


Figura 1.6: Procesos regulados por la EMT en cáncer.

Las funciones clásicas asociadas a la EMT permiten a las células cancerosas migrar, invadir y penetrar en vasos sanguíneos y linfáticos, mientras que la MET promueve el crecimiento de macrometástasis. Las características no clásicas apoyan la iniciación tumoral y la colonización metastásica, ayudando a las células a adaptarse a condiciones cambiantes a través de la reprogramación metabólica, evasión inmunitaria y resistencia a tratamientos. La EMT también puede ser inducida por señales extracelulares en el microambiente. Tomado de [Brabletz et al., 2021].

críticas de SALL2 se relaciona con el desarrollo ocular. En 2014, un estudio liderado por Kelbermann y su equipo describió que una mutación en el gen *SALL2*, que produce un codón de término prematuro, conduce a la formación anormal del ojo en ratones, resultando en coloboma de retina, un defecto caracterizado por la falta de cierre de la fisura ocular durante la embriogénesis [Kelberman et al., 2014]. Los estudios mencionados destacan un aspecto común en los efectos de SALL2: su influencia sobre la migración celular en distintos contextos biológicos. Desde el cierre del tubo neural hasta la extensión de neuritas y el desarrollo ocular, SALL2 parece ser un regulador clave de los movimientos celulares que permiten la organización adecuada de tejidos durante el desarrollo. Este papel en la migración sugiere que SALL2 puede ser un mediador crucial de la plasticidad y reorganización celular en diferentes contextos fisiológicos. Aunque aún se requieren estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos moleculares subyacentes, el año 2022, nuestro grupo de investigación describió que SALL2 es capaz de regular la migración de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) mediante la regulación de integrina $\beta 1$, siendo el primer mecanismo molecular descrito en este contexto [Riffo et al., 2022].

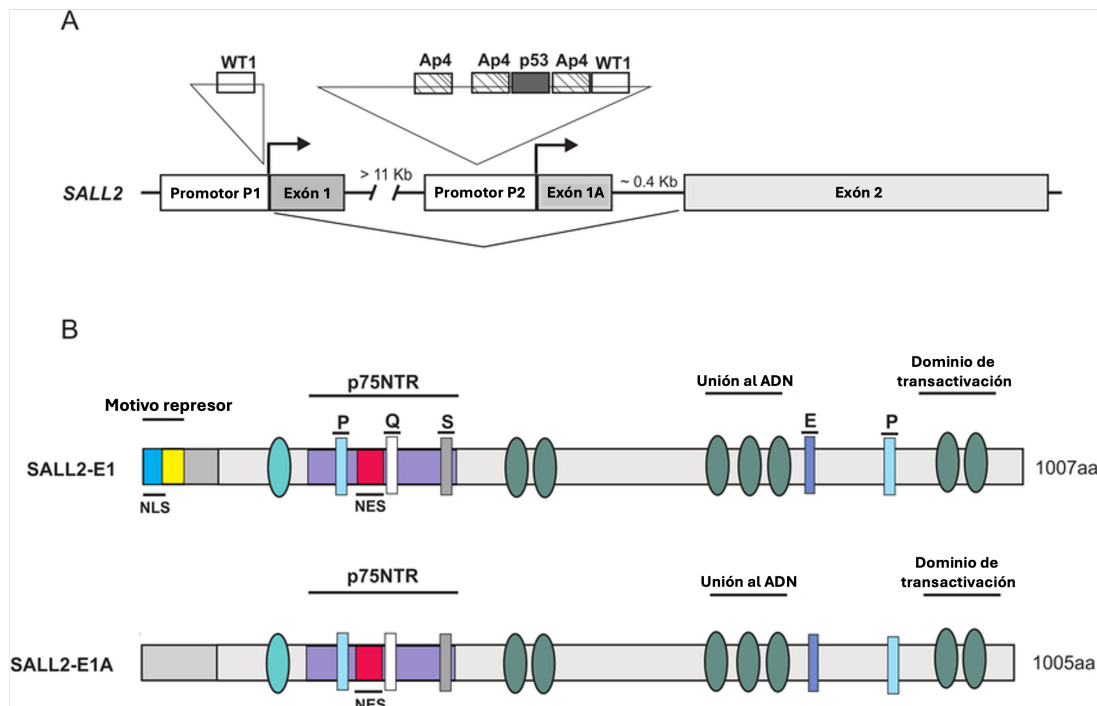


Figura 1.7: Esquema del gen *SALL2* y sus isoformas principales.

El gen que codifica a *SALL2* se localiza en el cromosoma 14 en humanos y está constituido por dos promotores P1 y P2, que codifican las dos isoformas principales del gen, E1 y E1A, respectivamente. Tomado de [Hermosilla et al., 2017].

1.7. *SALL2* en cáncer

Además de su papel en condiciones fisiológicas, *SALL2* se ha posicionado como un regulador central de procesos implicados en la progresión de diversos cánceres. Alteraciones genéticas como mutaciones, deleciones y amplificaciones en el gen *SALL2* han sido reportadas en varios cánceres, observándose tanto aumento como disminución, lo que sugiere que su función en el cáncer es altamente dependiente del contexto genético y del tejido [Farkas et al., 2021a]. Si bien se han realizado avances significativos en el estudio del rol de *SALL2* en glioblastoma, donde se comporta como un oncogén [Baulch et al., 2016] [Fiscon et al., 2018] [Suvà et al., 2014] [Yu et al., 2017], y en cáncer de ovario, en el cual actúa como supresor tumoral [Miao et al., 2017][Sung et al., 2013], su función en otros tipos de cáncer sigue siendo poco comprendida. Uno de los aspectos más investigados de *SALL2* es su respuesta al estrés celular. Diversos estudios han demostrado que la expresión de *SALL2* se induce ante estrés metabólico, como la privación de suero [Liu et al., 2007], y ante estrés genotóxico, generado por agentes como doxorrubicina [Escobar et al., 2015] y etopósido [Sung et al., 2012]. Esto ha llevado a proponer que *SALL2* desempeña un papel supresor tumoral en cánceres como el de ovario, esófago y mama, dado que su expresión está vinculada a la regulación de genes involucrados en la detención del ciclo celular, la apoptosis y la supervivencia. Entre los genes diana de *SALL2* se incluyen *p21* [Li et al., 2004], *p16* [Wu et al., 2015], *BAX* [Gu et al., 2011], *NOXA* [Escobar et al., 2015], *c-Myc* y ciclina D1/E1 [Hermosilla et al., 2018], cuya regulación por parte de *SALL2*, ya sea positiva o negativa, contribuye a una respuesta celular de tipo antitumoral. En cuanto al CCR, aunque el papel de *SALL2* aún no ha sido profundamente investigado, los estudios preliminares apuntan a una posible función

como supresor tumoral. Por ejemplo, se ha reportado una pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 14, en la región donde se localiza el gen *SALL2*, en pacientes con CCR, lo que se asocia con un mal pronóstico [Al-Mulla et al., 2006]. Además, análisis de bases de datos han mostrado que los niveles de expresión de *SALL2* disminuyen significativamente reducidos en tejidos tumorales de CCR en comparación con el tejido normal [Chandrashekar et al., 2017]. Estos hallazgos son consistentes con los estudios de nuestro laboratorio, donde hemos observado que *SALL2* es indetectable en varias líneas celulares de CCR y disminuye su expresión durante la progresión del CCR observado en tejidos humanos, sugiriendo que su pérdida está asociada con el fenotipo tumoral [Quiroz, 2023]. El efecto de *SALL2* en la migración celular ha sido otro foco de estudio, observándose en datos preliminares que la migración de células SW480 disminuye en ausencia de *SALL2* en comparación con el modelo *wild type*, lo que sugiere que *SALL2* podría regular la migración en contextos tumorales [Alarcon, 2021]. Estos resultados coinciden con estudios en cáncer de ovario [Miao et al., 2017] y esófago [Luo et al., 2017], donde el silenciamiento de *SALL2* favorece la migración e invasión celular.

1.8. Relación de *SALL2* y EMT

Uno de las interrogantes clave derivados de estos estudios es si la pérdida de *SALL2* observada en cáncer colorrectal favorece el aumento en la malignidad tumoral a través de la EMT, y cómo este mecanismo podría estar implicado en la progresión tumoral. La EMT es un proceso fundamental en la biología del cáncer, que facilita la migración, invasión y metástasis de las células tumorales, siendo regulada por múltiples vías de señalización. En este contexto, estudios previos han demostrado que la activación de TGF- β en fibroblastos humanos primarios disminuye la expresión de *SALL2*, lo que sugiere que las vías de señalización inductoras de la EMT podrían suprimir la expresión de *SALL2*, favoreciendo así el fenotipo mesenquimal [Sung et al., 2011]. Además, se ha identificado que el promotor P2 de *SALL2* contiene sitios de unión para los factores de transcripción SMAD3/4, los cuales son mediadores clave de la señalización TGF- β . Esta observación refuerza la hipótesis de que *SALL2* podría desempeñar un papel regulador en la EMT a través de su interacción con esta vía de señalización. Evidencia adicional sugiere que *SALL2* podría modular la EMT por distintos mecanismos en otros tipos de cáncer. En cáncer de mama, se ha propuesto que su efecto inhibitorio sobre la EMT está mediado, en parte, por la regulación positiva del factor de transcripción MYB [Liu et al., 2014]. De manera similar, en cáncer de ovario, la inhibición de la proteína tirosina quinasa 7 (PTK7) se ha asociado con un aumento en los niveles de *SALL2*, lo que a su vez induce la inhibición de la EMT, evidenciado mediante estudios de migración, quimiorresistencia y análisis de marcadores asociados a este proceso [Raivola et al., 2022]. En el contexto del cáncer colorrectal, *SALL2* podría influir en la EMT a través de su impacto en la adhesión célula-célula y la regulación de genes clave en este proceso. Se han identificado sitios de unión putativos para *SALL2* en los promotores de diversos genes de la familia de las cadherinas y de factores de transcripción asociados a la EMT, los cuales se conservan en varias especies (**Figura Suplementaria 7.3 y 7.4**). Esto sugiere que *SALL2* podría desempeñar un papel evolutivamente relevante en la regulación de la adhesión celular y la EMT. Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado si *SALL2* promueve o inhibe la expresión de estos genes. Además, se ha descrito que *SALL2* regula la expresión del supresor tumoral PTEN, cuya pérdida en cáncer colorrectal se ha asociado con la acumulación nuclear de β -catenina y el aumento en la expresión de c-MYC y ciclina D1, eventos

que favorecen la activación de la EMT [Bowen et al., 2009] [Fedorova et al., 2022]. Por otro lado, se ha descrito que TM4SF1, a través de MYC, favorece la EMT a través de la vía Wnt/ β -catenina/SOX2. En este contexto, como SALL2 también regula negativamente la expresión de MYC, podría existir un mecanismo similar de regulación de la EMT [Tang et al., 2020]. De manera complementaria, estudios recientes de nuestro laboratorio han sugerido una posible función de SALL2 en la regulación de la adhesión celular. Mediante inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación (ChIP-seq) en células HEK293T sometidas a estrés genotóxico, se identificó que SALL2 podría estar modulando la expresión de diversas proteínas de adhesión célula-célula, lo que refuerza su posible implicación en procesos como la migración celular, la EMT y la progresión tumoral. Adicionalmente, investigaciones preliminares indican que SALL2 regula la vía Wnt/ β -catenina mediante la regulación positiva de AXIN2, un regulador negativo de esta vía que forma parte del complejo de degradación de β -catenina, impidiendo su acumulación en el núcleo y, por tanto, la activación transcripcional de los genes blanco. Dado que la activación de la vía Wnt/ β -catenina se ha asociado con la inducción de la EMT, estos hallazgos sugieren un nuevo mecanismo por el cual SALL2 podría desempeñar un papel en la regulación de este proceso. En conjunto, estas evidencias posicionan a SALL2 como un posible regulador clave de la EMT en el cáncer colorrectal, probablemente a través de su interacción con vías de señalización clásicas asociadas a este programa morfogenético y su influencia en la expresión de genes involucrados en la adhesión celular, la migración y la proliferación. A partir de esta información, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿La pérdida de SALL2 contribuye directamente a la progresión tumoral y a la agresividad del cáncer colorrectal a través de mecanismos que involucran la transición epitelio-mesénquima?

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

La pérdida del factor de transcripción SALL2 potencia la progresión del cáncer colorrectal y favorece la adquisición de características asociadas a la transición epitelio-mesénquima.

2.2. Objetivo General

Determinar el impacto de la pérdida y sobreexpresión del factor de transcripción SALL2 en la progresión del cáncer colorrectal *in vitro* e *in vivo*, con un enfoque en su rol como regulador de la transición epitelio-mesénquima.

2.3. Objetivos Específicos

1. Evaluar el impacto de la pérdida de SALL2 en los cambios fenotípicos y moleculares asociados a la transición epitelio-mesénquima en modelos celulares de cáncer de colon.
2. Analizar la inhibición de *Sall2* en la progresión tumoral y la transición epitelio-mesénquima mediante estudios *in vivo* en modelos murinos de cáncer de colon.

Capítulo 3

Materiales Y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

Tabla 3.1: Reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis

Reactivo	Código	Compañía
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Cat. No. 3174	TOCRIS
5-Fluorouracilo (5-FU)	sc-29060A	Santa Cruz
Oxaliplatino	J66586.MF	Thermo Fisher
Leucovorina	sc-252837	Santa Cruz
Doxiciclina	Cat.No. 14422	Cayman Chemical

3.1.2. Plásmidos

Tabla 3.2: Plásmidos utilizados para el desarrollo de esta tesis

Nombre plásmido	Código	Compañía
pD1321-AP-SALL2	No especificado	ATUM
pD1321-AP-Jun-SALL2	No especificado	ATUM
pCW57-MCS1-2A-MCS2	Cat.No. 71782 8	Addgene
pCMV-dR8.2	Cat.No. 8455	Addgene
pCMV-VSV-G	Cat.No. 8454	Addgene
pSpCas9(BB)-2A-GFP	Cat.No. 48138	Addgene
psPAX	Cat.No. 12260	Addgene
pMD2.D	Cat.No. 12259	Addgene

3.1.3. Anticuerpos y sondas fluorescentes

Tabla 3.3: Anticuerpos y sondas fluorescentes utilizados para el desarrollo de esta tesis

Anticuerpo/Sonda	Código	Compañía	Dilución
SALL2	HPA004162	Atlas	WB: 1:500
E-cadherina	sc-8426	Santa Cruz	WB: 1:500
E-cadherina	24E10	Cell Signaling	WB: 1:1000, IF: 1:1600, IHQ: 1:400
N-cadherina	sc-393933	Santa Cruz	WB: 1:500
Snail	sc-271977	Santa Cruz	WB: 1:500
Vimentina	sc-373717	Santa Cruz	WB: 1:500
Integrina $\beta 1$	sc-374429	Santa Cruz	WB: 1:500
Integrina $\beta 3$	sc-6627	Santa Cruz	WB: 1:500
GAPDH	sc-32233	Santa Cruz	WB: 1:20000
β -actina	sc-47778	Santa Cruz	WB: 1:20000
β -catenina	sc-7963	Santa Cruz	WB: 1:500, IF: 1:100, IHQ: 1:100
Faloidina Alexa-488	A12379	Invitrogen	WB: 1:80
Ki-67	GA626	Dako Omnis	IHQ: 1:100
Hoechst 33342	H1399	Invitrogen	IF: 1:300
Anti-mouse	1705047	BioRad	WB: 1:20000
Anti-rabbit	1706515	BioRad	WB: 1:20000
Vinculina	sc-73614	Santa Cruz	WB: 1:100

3.1.4. Partidores

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo celular

Las líneas celulares SW480, SW620, HT-29 y HEK293T que se encuentran disponibles en el laboratorio de Transducción de Señales y Cáncer (TSC) fueron obtenidas desde ATCC. SW480, SW620 y HT-29 se cultivaron en medio RPMI-1640 (HyClone, Cat. No. SH30255.02) y HEK293T en medio DMEM (HyClone, Cat. No. SH30022.01), ambos suplementados con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1% del mix antibiótico penicilina/estreptomicina (HyClone, Cat. No. SV30010). Todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 . Se realizó cambio de medio entre 2 a 3 días y se utilizó la razón 1:6 para subcultivo de rutina. Para los modelos SALL2 inducible (sistema *Tet-On*) se utilizó FBS-TetOn (Thermo Fisher, Cat. No. A4736201). La inducción de SALL2 en estos modelos se realizó con doxiciclina a una concentración de 1 μ g/mL.

3.2.2. Generación de modelos celulares con pérdida de función de SALL2 mediante el sistema CRISPR/Cas9

Células SW480 fueron electroporadas utilizando el equipo Neon Transfection System (Invitrogen) con los plásmidos pD1321-AP-SALL2 y pD1321-AP-Jun SALL2 con el fin

Tabla 3.4: Partidores utilizados para el desarrollo de esta tesis

Nombre del partidor	Secuencia
<i>hCDH1</i> F	CGG ACG ATG ATG TGA ACA CC
<i>hCDH1</i> R	TTG CTG TTG TGC TTA ACC CC
<i>hSNAI1</i> F	CTA GAG TCT GAG ATG CCC CG
<i>hSNAI1</i> R	AGT TCT GGG AGA CAC ATC GG
<i>mSnai1</i> F	CTTGTGTCTGCACGACCTGT
<i>mSnai1</i> R	CAGGAGAATGGCTTCTCACC
<i>mTwist1</i> F	AGT CTT ACG AGG AGC TGC AG
<i>mTwist1</i> R	AGG AAG TCG ATG TAC CTG GC
<i>mZeb1</i> F	TGA GCA CAC AGG TAA GAG GCC
<i>mZeb1</i> R	GGC TTT TCC CCA GAG TGC A
<i>mVim</i> F	TGC GCC AGC AGT ATG AAA
<i>mVim</i> R	GCC TCA GAG AGG TCA GCA AA
<i>mCdh1</i> F	ATC CTC GCC CTG CTG ATT
<i>mCdh1</i> R	ACC ACC GTT CTC CTC CGT A
<i>mCdh2</i> F	GGT GGA GGA GAA GAA GAC CAG
<i>mCdh2</i> R	GGC ATC AGG CTC CAC AGT AT
Validación KO humano F	CCC AAC AGA GGA CAG GTG TG
Validación KO humano R	ATT TGT GCC TTC CAC CAG
Validación KO ratón F	GTG TGA TTC TGC ACA TAG GCC
Validación KO ratón R	GAC CAG GAA TTG CCC AGA AG
sgRNA (<i>SALL2</i> knockout) F	CAC GGG CTC CTT AGG CCA GAC GGT
sgRNA (<i>SALL2</i> knockout) R	AAA CAC CGT CTG GCC TAA GGA GCC
sgRNA-1 (<i>Sall2</i> knockout) F	CAC CGG TGA GCG AGG AAT TCG G
sgRNA-1 (<i>Sall2</i> knockout) R	AAA CGA CCG AAT TCC TCG CTC ACC
sgRNA-2 (<i>Sall2</i> knockout) F	CAC CGC AAT TAT CAC CAT TAC CGG T
sgRNA-2 (<i>Sall2</i> knockout) R	AAA CAC CGG TAA TGG TCA TAA TTG C

de generar la edición genómica de *SALL2* mediante el sistema CRISPR/Cas9. 24 horas posteriores a la electroporación, se verificó fluorescencia en el cultivo mediante la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP) codificada en ambos vectores. A través de un citómetro de flujo activado por fluorescencia (FACS) (BD FACSAria III cell sorter, BD Biosciences; San Jose, CA, USA) se logró separar la población de células RFP positivas, las cuales fueron sembradas en placas de 96 pocillos para obtener clones independientes deficientes de *SALL2*. Estos clones estuvieron en cultivo hasta que se alcanzaron alta confluencia para posterior subcultivo a placas de mayor tamaño. Se verificó la correcta edición genómica a través de secuenciación y se validó el modelo pérdida de función de *SALL2* mediante inmunodetección por westernblot. Modelos generados y metodología descrita en [Hermosilla et al., 2024, Farkas et al., 2021b].

3.2.3. Generación de modelos celulares con ganancia de función de SALL2 mediante el sistema inducido por tetraciclina

La generación de modelos inducibles se realizó siguiendo el procedimiento descrito en [Quiroz, 2023] y consta de varios pasos principales que se detallan a continuación:

3.2.3.1. Transfección de células HEK293T con lipofectamina

Para transfectar de forma transiente células HEK293T, se utilizó lipofectamina 2000 (ThermoFisher Scientific, Cat.No.1668) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello, se sembraron 2×10^6 células en placas de 100 mm para alcanzar una confluencia del 80 % en aproximadamente 24 horas. Al momento de la transfección, se preparó la mezcla de los plásmidos en un volumen final de 250 μL de medio RPMI sin suero y sin antibióticos, utilizando los plásmidos para el empaquetamiento viral pCMV-dR9.2 y pCMV-VSVG (Addgene), y el plásmido inducible por tetraciclina pCW57-MCS1-2A-MCS2 (Addgene) portador del gen *SALL2* que codifica la isoforma E1A, en una proporción 5 μg : 1 μg : 5 μg (tubo A). En paralelo se disolvieron 15 μL de lipofectamina en 235 μL de medio de cultivo RPMI sin suero y sin antibióticos (tubo B). La solución del tubo A se agregó gota a gota sobre el tubo B y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se cambió el medio de las células HEK293T a medio sin suero y sin antibióticos para aumentar la eficiencia de transfección y se agregaron los 500 μL de suspensión lípido-ADN. Las células se incubaron durante 6 horas en presencia de los complejos, tras lo cual se reemplazó el medio de cultivo por medio de cultivo fresco con FBS y antibiótico y finalmente, 24 horas posteriores a la transfección, se cambió el medio nuevamente.

3.2.3.2. Transducción de células SW480, SW620 y HT-29 con partículas lentivirales

Transcurridas 48 horas posteriores a la transfección, se tomó el medio de las células HEK293T, en donde se encuentran las partículas lentivirales, con una jeringa de 5mL y se transfirió a un tubo de centrifuga. Se eliminó el medio del cultivo de células blanco y se agregó el medio con lentivirus. Se agregó medio nuevo al cultivo de células HEK293T y se repitió el proceso los dos días posteriores. Luego de tres rondas de transducción, se cambió el medio de las células blanco y se trataron con antibiótico de selección (puromicina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) realizando subcultivo cuando fue necesario. Una vez transcurridos 5 días en tratamiento con antibiótico y contrastando con la placa control del antibiótico, se cultivaron estas células para su posterior validación mediante inmunodetección por western blot.

3.2.4. Ensayo de proliferación mediante conteo celular

Todas las líneas celulares se sembraron en placas de 24 pocillos a una confluencia de 5×10^4 células por pocillo. Después de 48 horas, las células se tripsinizaron y contaron utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer). El conteo celular se realizó durante 5 días. Para los modelos con ganancia de función de SALL2, se agregó doxiciclina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 24 horas posteriores al sembrado.

3.2.5. Ensayo de proliferación clonal

Todas las líneas celulares se sembraron en placas de 6 pocillos a una confluencia de 5×10^2 células por pocillo. Después de 2 semanas, se visualizaron las colonias bajo el microscopio, se removió el medio de cultivo y se lavó cuidadosamente con PBS 1X (pH 7,4). Las células se fijaron con una solución de 10 % (v/v) de ácido acético, 10 % (v/v) de metanol and 80 % (v/v) de agua destilada durante 10 minutos. Para teñir las colonias, las células fueron tratadas con una solución preparada con 0,2 g de cristal violeta, 5mL de metanol, 5mL de ácido acético en 50 mL de agua destilada por 10 minutos. Posterior a la tinción, las placas fueron cuidadosamente lavadas con PBS 1X (pH 7,4) y secadas a temperatura ambiente. Se tomaron fotografías para poder calcular el número y el tamaño de las colonias. Para los modelos con ganancia de función de SALL2, se agregó doxiciclina 24 horas posteriores al sembrado.

3.2.6. Ensayo de migración en transwell

Los insertos transwell (Costar, 6,5mm de diámetro, tamaño de poro de 8 μm) se trataron previamente con colágeno tipo I (Sigma Aldrich) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se sembraron 1×10^5 células en la parte superior del transwell con medio sin FBS. En la parte inferior se agregó medio con FBS utilizado como quimioatrayente. Después de 48 horas se removió el medio del transwell y las células en la parte superior del inserto se eliminaron con un algodón. Las células que migraron localizadas en la cara inferior del inserto se fijaron con una solución de 10 % (v/v) de ácido acético, 10 % (v/v) de metanol and 80 % (v/v) de agua destilada durante 10 minutos y se tiñeron con una solución preparada con 0,2 g de cristal violeta, 5mL de metanol, 5mL de ácido acético en 50 mL de agua destilada por 10 minutos. Para los modelos con ganancia de función de SALL2, se agregó doxiciclina 24 horas posteriores al sembrado. Se tomaron fotografías con aumento de 10x utilizando un microscopio óptico invertido Olympus CKX-41. La metodología utilizada también se describe en [Riffo et al., 2022].

3.2.7. Ensayo de viabilidad celular utilizando XTT

El ensayo de viabilidad celular se realizó utilizando el reactivo XTT, basado en la reducción de sales de tetrazolio por la actividad metabólica de las células vivas. Una vez preparado el cultivo celular, se mezcla una solución activadora (100 μL) con 5 mL del reactivo XTT. De esta mezcla, se añaden 50 μL directamente al medio de cultivo de cada pocillo en una placa de 96 pocillos. La placa se incuba a 37 °C durante 4 horas. Tras la incubación, se homogeniza la solución mediante agitación suave para garantizar una lectura uniforme. Finalmente, la absorbancia se mide a 480 nm para cuantificar el producto de formazán, y a 660 nm para corregir lecturas inespecíficas, restando estos valores durante el análisis.

3.2.8. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

Las células se lisaron en el buffer de lisis (Tris/HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, MgCl_2 , glicerol al 5 %), suplementado con inhibidores de proteasa (P8340, Sigma Aldrich) y fosfatasa (P2850, Sigma Aldrich) al 1 %. Los lisados proteicos (50-70 μg) fueron separados utilizando electroforesis denaturante (SDS-PAGE), a un voltaje constante de 90V y en presencia del buffer de corrida (Tris 25mM; Glicina 192mM; SDS al 0,1 %

p/v). Como marcador de peso molecular se utilizó el estándar AccuRuler (MAESTROGEN, No. Cat. #02102-250). El gel separador fue preparado con acrilamina:bisacrilamina 29:1 (30%) desde el 6% hasta 12% p/v, Tris 375 mM pH 8,8; SDS al 0,1% p/v; persulfato de amonio al 0,1% p/v; N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) al 0,09% v/v). Por otra parte, el gel concentrador se preparó con acrilamina:bisacrilamina 29:1 (30%) al 5% p/v; Tris 125 mM pH 6,8; SDS al 0,1% p/v; persulfato de amonio al 0,1% p/v; TEMED al 0,1% v/v). Las proteínas se transfirieron durante 16-18 h a 25 mA a una membrana de PVDF (Immobilon, Merck, Kenilworth, NJ, EE. UU.) en buffer de transferencia (Tris 25mM; Glicina 192mM; SDS al 20% v/v). Las membranas de PVDF se bloquearon en leche descremada al 5% durante 1h a temperatura ambiente en TBS-T 1X (TBS-Tween20: Tris 20mM; NaCl 500mM; pH 7,4; Tween20 0,05% v/v)). Luego se incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C durante 16-18 h. Después del lavado, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (Bio-Rad) diluido en 5% en leche en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las proteínas inmunomarcadas se visualizaron mediante el kit de quimioluminiscencia Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences). Para realizar la cuantificación de las bandas se utilizó el software Image J, en donde se procedió a hacer una densitometría de las proteínas de interés normalizando con un control de carga como GAPDH. Finalmente se graficaron los datos utilizando Graph Prism 10. La metodología utilizada también se describe en artículos como [Riffo et al., 2022, Hermosilla et al., 2024].

3.2.9. Extracción de ARN y generación de ADNc

Para la extracción de ARN, se utilizaron placas de 60mm en donde las células fueron colectadas en 500 μ L del reactivo TRIZOL (ambion). Para la separación de las fases se agregaron 100 μ L de cloroformo, se realizó vortex y luego se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa fue traspasada a otro tubo, donde posteriormente se le agregaron 500 μ L de isopropanol a temperatura ambiente para la precipitación del ARN. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000 rpm (10 minutos a 4°C), y se removió el sobrenadante cuidadosamente. El pellet (ARN) se lavó con 500 μ L de etanol 75% en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se centrifugó a 10.000 rpm (5 minutos a 4°C). Para resuspender el ARN, se removió el sobrenadante, se dejó secar el pellet al aire por 20-30 minutos y se adicionó 50 μ L de agua DEPC para hidratar en hielo por 30 minutos. Las muestras fueron tratadas con el kit de turbo DNasa (Invitrogen) para eliminar cualquier residuo de ADN. Se cuantificó la concentración de ARN y su pureza a través de absorbancia en el lector de placas INFINITE 200 PRO NanoQuant Microplate readers (TECAN), considerando como óptimo una pureza entre 1,8 - 2, relación Abs 260-280 nm. Para realizar PCR transcriptasa reversa, se mezcló una concentración de 1000 ng de ARN total con 1,6 μ L de oligoDT (Promega) en 10 μ L de volumen final en agua grado biología molecular (Hyclone). El programa ocupado consta de una etapa de 5 minutos a 70°C y una segunda etapa a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV (PROMEGA), usando el programa de una etapa a 60°C por 42 minutos y una segunda etapa a 65°C por 15 minutos en un termociclador de PCR convencional (Veriti).

3.2.10. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

Se realizaron las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) por triplicado utilizando KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Kit (Kapa Biosciences) con una concentración de partidores de $0,4 \mu\text{M}$ (ver tabla 2). Cada reacción contenía: $0,4 \mu\text{L}$ de cada partidor, $5 \mu\text{L}$ del kit 2X, $1 \mu\text{L}$ de ADNc y $3,2 \mu\text{L}$ de agua grado biología molecular. Las condiciones usadas en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 5 segundos, hibridación a 60°C por 20 segundos y extensión a 72°C por el tiempo correspondiente. La curva de *melting*, fue usada para verificar la T_m de los partidores. La expresión de cada gen fue relativa a la expresión del gen normalizador *GAPDH*. La representación de los datos fue como veces de cambio en comparación con el control, para cada caso, esto utilizando la formula $\Delta\Delta\text{CT}$. La metodología tanto de la qRT-PCR como de la extracción de ARN y generación de ADNc también se describe en artículos como [Riffo et al., 2022, Hermosilla et al., 2024].

3.2.11. Inmunocitoquímica

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células SW480 o HT-29 en cubreobjetos de 12 mm en placas de 24 pocillos. Luego de 48 horas de incubación las células se fijaron en 4% paraformaldehído en 1X PBS no estéril por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en 1X PBS por 10 minutos. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido en 3% BSA por 16-18 horas a 4°C en cámara húmeda. Luego, se realizaron tres lavados con 1X PBS por 5 minutos y se incubó por 2 horas con el anticuerpo secundario correspondiente, en BSA al 1% incluyendo la tinción nuclear hoechst (dilución 1:300) y la tinción de F-actina faloidina (1:80). Finalmente, se montaron los cubreobjetos en portaobjetos, usando $6 \mu\text{L}$ de medio de montaje (Fluorescence Mounting Medium Dako) para su posterior análisis bajo microscopía confocal. El microscopio confocal empleado fue un microscopio espectral confocal LSM780 NLO Zeiss (objetivos 40X y 63X) ubicado en el Centro de Microscopía Avanzada (CMA) Bio Bio. En cada inmunofluorescencia además se incluyó un control negativo, que involucra un cubreobjeto sin la incubación de anticuerpo primario. Para el análisis de las imágenes se utilizó el software Image J, con el cual se calculó la máxima intensidad de fluorescencia de un *Z-stack* para los diferentes experimentos realizados. Para determinar la distribución de E-cadherina, se evaluó la intensidad de fluorescencia a lo largo de una línea generada entre el centro de los núcleos de dos células adyacentes, y por tanto, la mayor intensidad del marcador nuclear Hoechst se observa en los extremos de esta línea. La zona central corresponde a la región de la membrana plasmática. Para determinar la cantidad relativa de β -catenina nuclear, se identificaron y delimitaron los núcleos de las células, con el objetivo de determinar la intensidad de fluorescencia en el interior de esta región. La metodología utilizada también se describe en [Riffo et al., 2022].

3.2.12. Transformación bacteriana

La transformación fue realizada por la técnica de shock térmico. Para ello, se incubaron $50 \mu\text{L}$ de bacterias XL1-Blue competentes en un tubo Eppendorf de 1,5 mL con aproximadamente 100 ng de plásmido, en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, las bacterias junto con el ADN se incubaron a 42°C por 40 segundos en una termoplaca y

nuevamente los tubos volvieron al hielo por 5 minutos. Se agregó 250 μL de medio LB al tubo de bacterias. Se dejó en recuperación durante 1 hora en agitación a 37°C y posteriormente este volumen fue transferido a una placa estéril con medio sólido LB-agar con antibiótico de selección (ampicilina 100 ng/mL, United States Biological). Estos procedimientos fueron realizadas bajo mechero en todo momento. Las bacterias se dejaron crecer por 14-16 horas en la placa a 37°C. Al día siguiente, se seleccionó una o más colonias aisladas con una punta de 10 μL y se traspasó de forma individual cada colonia desde la placa a un tubo de ensayo con 5mL de caldo LB con antibiótico selección (5 μL de ampicilina 100 ng/mL, United States Biological) en orbital *shaker incubator* (MRC). Finalmente se incubó el cultivo durante toda la noche a 37°C con agitación a 210 rpm (14-16 horas). Se utilizaron 800 μL de este cultivo bacteriano para almacenar stock con glicerol al 20% v/v a -80°C.

3.2.13. Purificación de plásmidos

1 mL del cultivo bacteriano fue inoculado en 500 mL de caldo LB con el antibiótico correspondiente (500 μL de ampicilina 100 ng/mL, United States Biological) por 16-18 hrs a 37°C en agitación a 210 rpm. Luego, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm en centrífuga Hitachi CR22GIII (3920 xg) durante 15 minutos a 4°C y se procedió a la purificación de plásmidos a gran escala con kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel), guiándose de las instrucciones del fabricante. La concentración del plásmido obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm, utilizando el equipo TECAN. De la relación A260/A280 se establece la pureza, considerando una razón óptima sobre 1,8.

3.2.14. Obtención de organoides AKP y cultivo de organoides

El colon de un ratón macho B6-Tg(Vil1-CreERT2)23Syr/J; Apctm1Tno; Krastm4Ty/J; Trp53tm1Brn (AKP) fue aislado a partir de él se generaron organoides colónicos. Estos organoides fueron tratados con 4-OHT para inducir la actividad de la enzima Cre. La recombinación de alelos condicionales se validó mediante PCR, y las células se cultivaron en un medio sin R-spondina y EGF. Los tumores intestinales fueron disociados enzimáticamente para obtener células individuales que fueron sembradas en BME (Cultrex Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract, BME; R&D Systems, 3433-005-01) para generar organoides. Estos organoides fueron cultivados en una gota de BME y pasajeados rutinariamente. Las gotas fueron enjuagados con 1X PBS frío a 4°C para desprender el BME. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante, dejando un pellet de BME y organoides. Para disgregar los organoides, se añadieron 150 μL de PBS 1X frío a 4 °C y se pipetearon vigorosamente y repetidamente. Posteriormente, se añadieron 5 mL de PBS y se centrifugó a 1300 rpm durante 3 minutos. Se aspiró el sobrenadante, y los organoides se suspendieron en BME (20 μL por domo) y se colocaron en placas precalentadas. Los organoides se dividieron en una proporción de 1:2 o 1:3 y se mantuvieron en *Advanced* DMEM/F12 (Gibco, 12634028) con 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, P4458-100ML), 1% de D-Glutamina (Gibco, 25030024), 1% de HEPES (Sigma-Aldrich, h0887-100), 1X B27 (Gibco, 12587010) y 1X N2 (Gibco, 17502048). La metodología también se describe en [Vaquero-Siguero et al., 2022].

3.2.15. Generación de organoides AKP deficientes de *Sall2*

Los organoides AKP murinos fueron cultivados y disgregados como se mencionó anteriormente. El día de la electroporación, se disociaron en células individuales usando 1X TrypLE Express (Invitrogen, Waltham, MA, USA, 12605010). Posteriormente, se agregaron 5 mL de PBS y 50 μ L de FBS (Gibco, 16000044) y se centrifugaron a 1300 rpm durante 3 minutos. Se aspiró el sobrenadante y los organoides se resuspendieron en 100 μ L de OptiMEM (Gibco, 11520386). Se añadieron 10 μ g de pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (*Sall2*-sgRNA-1 Fwd: 5'-CACCGGTGAGCGAGGAATTTCGG-3', REV: 5'-AAACACCGGTAATGGTGATAATTGC-3'; *Sall2*-sgRNA-2 Fwd: 5'-CACCGCAATTATCACCATACCGGT-3', Rev: 5'-AAACGACCGAATTCCTCGCTCACC-3'), se homogeneizó y se transfirió a una cubeta de electroporación. Se utilizó el sistema de electroporación NEPA21 con los siguientes parámetros: pulso de poro: voltaje 175 V, duración del pulso 5 ms, intervalo entre pulsos 50 ms, número de pulsos 2, tasa de decaimiento 10 %, polaridad positiva. Pulso de transferencia: voltaje 20 V, duración del pulso 50 ms, intervalo entre pulsos 50 ms, número de pulsos 5, tasa de decaimiento 40 %, polaridad positiva/negativa. Después de la electroporación, las células se recuperaron en 1 mL de medio de cultivo suplementado Y-27632 (72308, StemCell Technologies) a una concentración de 10 μ M y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante, el pellet celular se suspendió en BME y se sembró en placas precalentadas. Los organoides se cultivaron durante tres días para seleccionar aquellos que expresaban la proteína GFP mediante el sistema de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los organoides incrustados en BME se disociaron en células individuales con 1X TrypLE Express durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células individuales se resuspendieron en PBS con 1 % de FBS y se pasaron a través de un filtro de 40 μ m. Las células positivas para GFP se enriquecieron usando un sistema de clasificación celular BD FACSAria. Después de centrifugar (1300 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente), las células se resuspendieron en BME y se sembraron. Los organoides individuales se seleccionaron con una punta de 10 μ L para escoger colonias y se cultivaron solos en una placa de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia óptima para determinar el estado de knockout mediante secuenciación Sanger.

3.2.16. Ensayo de crecimiento de organoides

Los organoides incrustados en BME se disociaron en células individuales con 1X TrypLE Express durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se sembraron 2000 células por domo de BME en placas de 24 pocillos precalentadas. Se dejó el cultivo bajo las condiciones mencionadas anteriormente y transcurridos 3 y 5 días, se fotografiaron las placas utilizando un equipo de imagen en vivo Omni™ (Axios Biosystems). El número y tamaño de los organoides formados fue cuantificado utilizando el software ImageJ.

3.2.17. Ensayo de viabilidad de organoides

Se realizó el mismo procedimiento que el descrito en el ensayo de crecimiento de organoides. Transcurridos 3 días, se realizó el ensayo utilizando el kit CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega Cat.No. G8081) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En resumen, se eliminó el medio de cultivo y se agregó a cada pocillo 300 μ L de una mezcla del reactivo CellTiter-Blue y medio *Advanced* DMEM/F12 (proporción 1:5). Se

dejó la placa bajo las condiciones de incubación anteriormente descritas durante 4 horas. Finalmente, se determinó la absorbancia a 570 nm de la solución de cada pocillo utilizando un lector SpectraMax iD3 (Molecular Devices) y el software SoftMax Pro 7.1. A la placa con organoides se le retiró el reactivo CellTiter-Blue y se agregó en ella nuevamente medio de cultivo, para continuar con el crecimiento de los organoides y realizar el ensayo de viabilidad al día 5.

3.2.18. Microinyección guiada por colonoscopia en ratones

La colonoscopia en ratones se realizó utilizando una unidad de video endoscopio Karl Storz TELE PACK VET X LED, un sistema de endoscopio Karl Storz que incluye un dispositivo de succión e irrigación (Karl Storz, vetpump2), un sistema de documentación (Karl Storz, AIDA), una fuente de luz fría (Karl Storz, xenón 175), un sistema de imágenes (image1 S, Karl Storz, Tuttlingen, Alemania) y un telescopio Hopkins (parte 67030 BA). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano, se preparó el sistema de microinyección que consistió en una jeringa (Hamilton Inc., Reno, NV, EE. UU., 7656-01), una aguja de transferencia para absorber sustancias (Hamilton Inc., 7770-02) y una aguja de inyección (Hamilton Inc., 7803-05). La aguja de inyección se colocó sobre la mucosa del colon con el bisel orientado hacia la mucosa y se inyectaron 125.000 células de organoides AKP *Sall2* WT o AKP *Sall2* KO en la mucosa para formar una burbuja. El punto final del experimento *in vivo* se estableció como el momento en que los animales alcanzan una pérdida del 20 % de su peso corporal [Talbot et al., 2020]. Este criterio está directamente relacionado con un tamaño tumoral significativo que interfiere con las funciones básicas del animal, como la alimentación, lo que lleva a una progresiva pérdida de peso. Esta condición refleja un impacto crítico del crecimiento tumoral en el bienestar del organismo, marcando la necesidad de aplicar la eutanasia en cumplimiento de las normativas éticas para experimentos con modelos animales. Todos los experimentos con animales fueron realizados en las dependencias del Centro Alemán para la Investigación del Cáncer (DKFZ) cumpliendo con la Ley Alemana de Aprobación Bioética vía las autoridades locales bajo el protocolo DKFZ392 y número de experimento G-27/22. La metodología utilizada también se detalla en [Roper et al., 2018, Vaquero-Siguero et al., 2022].

3.2.19. Inmunohistoquímica

Los análisis de inmunohistoquímica se llevaron a cabo en la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción. Para esto se utilizaron secciones de 4 μ m de grosor en el EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizó el sistema PTLINK (Dako-Agilent) para el pretratamiento, lo que permitió la desparafinación, rehidratación y recuperación de antígenos simultáneamente. La peroxidasa endógena se bloqueó con el Flex Peroxidase Block (Dako-Agilent) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo seleccionado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en buffer 1X TBS, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo conjugado a un polímero marcado con peroxidasa de rábano picante por 20 min. Luego, se aplicó 3,3-diaminobencidina (DAB) en oscuridad durante 5 min. La contratincción se realizó con Hematoxilina Flex (Dako-Agilent) y a continuación se lavaron los portaobjetos con agua corriente durante 5 min. Por último, las muestras se deshidrataron y se montaron con

un cubreobjetos tras su deshidratación. El escáner MoticEasyScan permitió escanear 6 portaobjetos de vidrio con un solo clic, generando imágenes digitales de alta calidad en el servidor Motic DSAssistant. Se realizó análisis digital con Qupath, para procesar las imágenes y permitir la cuantificación objetiva de los marcadores. Para Ki-67 se realizó segmentación nuclear usando algoritmo de Threshold, obteniendo el porcentaje de células positivas. Para β -catenina, se utilizó el plugin de Image J *Cell counter* para contar las células con localización nuclear del marcador. El análisis de E-cadherina se realizó de manera cualitativa, utilizando microscopio óptico con aumento 10X. La metodología también se detalla en [Quiroz, 2023].

3.2.20. Métodos estadísticos

El análisis de los datos se llevó a cabo en el software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Para comparar más de dos grupos, los datos se analizaron mediante ANOVA (Analysis of Variance) de una vía para muestras que difieren en un solo factor (una sola variable independiente, e.g., tratamiento), o de dos vías para muestras que difieren en dos factores (e.g. tiempo de tratamiento 0, 4, 12, 24 hr). También se utilizó la prueba t-student (ejemplo: expresión de un target de la vía Wnt y expresión de *SALL2*). Las curvas Kaplan.Meier de sobrevivencia fueron analizadas mediante el test de Mantel-Cox. Las comparaciones se realizaron en unidades relativas a la condición control. Se trabajó usando el intervalo de confianza de un 95 % y el valor $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Objetivo Específico 1

Evaluar el impacto de la pérdida de *SALL2* en los cambios fenotípicos y moleculares asociados a la transición epitelio mesénquima en modelos celulares de cáncer de colon.

4.1.1. La pérdida de *SALL2* promueve un aumento en la proliferación celular

El aumento descontrolado en la proliferación celular y la alteración de los mecanismos que controlan la integridad de la región colorrectal, favorecen la formación de pólipos que, con el tiempo, pueden convertirse en adenocarcinomas. Considerando esto, se evaluó la capacidad proliferativa de modelos celulares de cáncer de colon con pérdida y ganancia de función de *SALL2*. Se utilizó SW480, una línea celular de tumor primario, la cual dentro de las líneas celulares de cáncer de colon, es una de las que más expresa *SALL2* (**Figura 4.1**). A partir de ella, se generó un modelo con pérdida de función de *SALL2* (SW480 *SALL2 knock out*). Adicionalmente, desde el modelo SW480 *SALL2 knock out* se originó un modelo *SALL2* inducible mediante el sistema *Tet-On*. Mediante el mismo sistema, se generó además un modelo inducible en la línea celular SW620, que corresponde a la línea celular obtenida del mismo paciente que SW480 pero aislada de metástasis en nódulo linfático un año más tarde, y en la línea celular HT-29, la cual corresponde a un modelo con características fenotípicas epiteliales, en comparación con las dos anteriores. Las principales diferencias entre estas líneas celulares se resumen en la **Tabla 4.1** y la **Figura 4.2**. Finalmente, se validaron todos los modelos generados mediante análisis de los niveles de proteína utilizando inmunodetección por *western blot* (**Figura 4.3**).

La capacidad proliferativa se evaluó mediante conteo celular durante un periodo de 2 a 8 días para el modelo con pérdida de función y de 1 a 5 días para los modelos con ganancia de función. Esta variación en los tiempos de análisis se debió a las distintas tasas de crecimiento observadas entre los modelos, lo que permitió ajustar el experimento para detectar diferencias significativas. En la **Figura 4.4** se puede observar que la pérdida de *SALL2* induce un aumento en la proliferación en comparación con el control a partir del segundo día, y esta diferencia se mantiene a través del tiempo por lo menos hasta el octavo día. Por otra parte, la ganancia de *SALL2* en el modelo SW480 inducible revierte este efecto, observando una diferencia significativa a partir del tercer día. La ganancia de *SALL2* en el modelo SW620 también disminuyó significativamente la proliferación

celular, observándose una disminución del 20,3% al segundo día y 26,7% al quinto día. Por otra parte, el modelo HT-29 *SALL2* inducible, que presenta un *background* genético diferente a las anteriores, mostró el mismo resultado, observándose una disminución en la proliferación, que varía entre un 20,6% y un 27,2%, luego de la sobreexpresión de *SALL2*. De manera complementaria, se realizó un ensayo de proliferación clonal con el objetivo de determinar la capacidad de crecimiento individual de las células, considerando la heterogeneidad clonal y su relación con procesos asociados a la EMT. Para esto, se cultivaron 500 células en condiciones normales de crecimiento y al cabo de 2 semanas se evaluó el número de colonias formadas. Los resultados indican que el modelo con pérdida de función de *SALL2* presenta un mayor número de colonias, aumentando aproximadamente de 300 (control) a 500 (*SALL2 knock out*) (**Figura 4.5**). En conjunto, estos resultados muestran que el factor de transcripción *SALL2* tiene un rol antiproliferativo en líneas celulares de cáncer colorrectal.

Tabla 4.1: Características de líneas celulares de cáncer de colon utilizadas

Característica	SW480	SW620	HT29
Origen	Derivada de un adenocarcinoma de colon primario de un paciente masculino de 51 años.	Derivada de una metástasis en ganglio linfático del mismo paciente que SW480 a los 52 años.	Derivada de un adenocarcinoma de colon primario de un paciente femenino de 44 años.
Mutaciones y Alteraciones Genéticas	Mutaciones en <i>APC</i> (codón de término 1338), <i>KRAS</i> (G12V), <i>NRAS</i> , <i>TP53</i> (R273H y P309S). CIN+. mCpG bajo. Amplificación del número de copias del oncogén <i>MYC</i> .	Mutaciones en <i>APC</i> (codón de término 1338), <i>KRAS</i> (G12V), <i>TP53</i> (R273H y P309S). CIN+. mCpG medio. Amplificación del número de copias del oncogén <i>MYC</i> .	Mutaciones en <i>APC</i> (inserción 1bp codón 1555), <i>BRAF</i> (V600E y T119S), <i>TP53</i> (R273H). CIN+. mCpG alto. Amplificación del número de copias del oncogén <i>MYC</i> .
Grado de Agresividad	Moderado; exhibe características de EMT y alta migración e invasión.	Alto; mayor capacidad metastásica y agresividad en comparación con SW480.	Bajo; muestra características más diferenciadas y menor potencial metastásico.
Subtipo Molecular	Asociada al subtipo CMS4 (mesenquimal), caracterizado por EMT y mal pronóstico.	Asociada al subtipo CMS4 (mesenquimal), similar a SW480.	Asociada al subtipo CMS3 (metabólico), caracterizado por alta diferenciación epitelial.

Nota: CIN+: Presencia de inestabilidad cromosómica, mCpG: Metilación de islas CpG, CMSX: Subtipo molecular consenso, donde X representa uno de los cuatro subtipos descritos. (Información tomada de [Ahmed et al., 2013, Berg et al., 2017, Shinji et al., 2025])

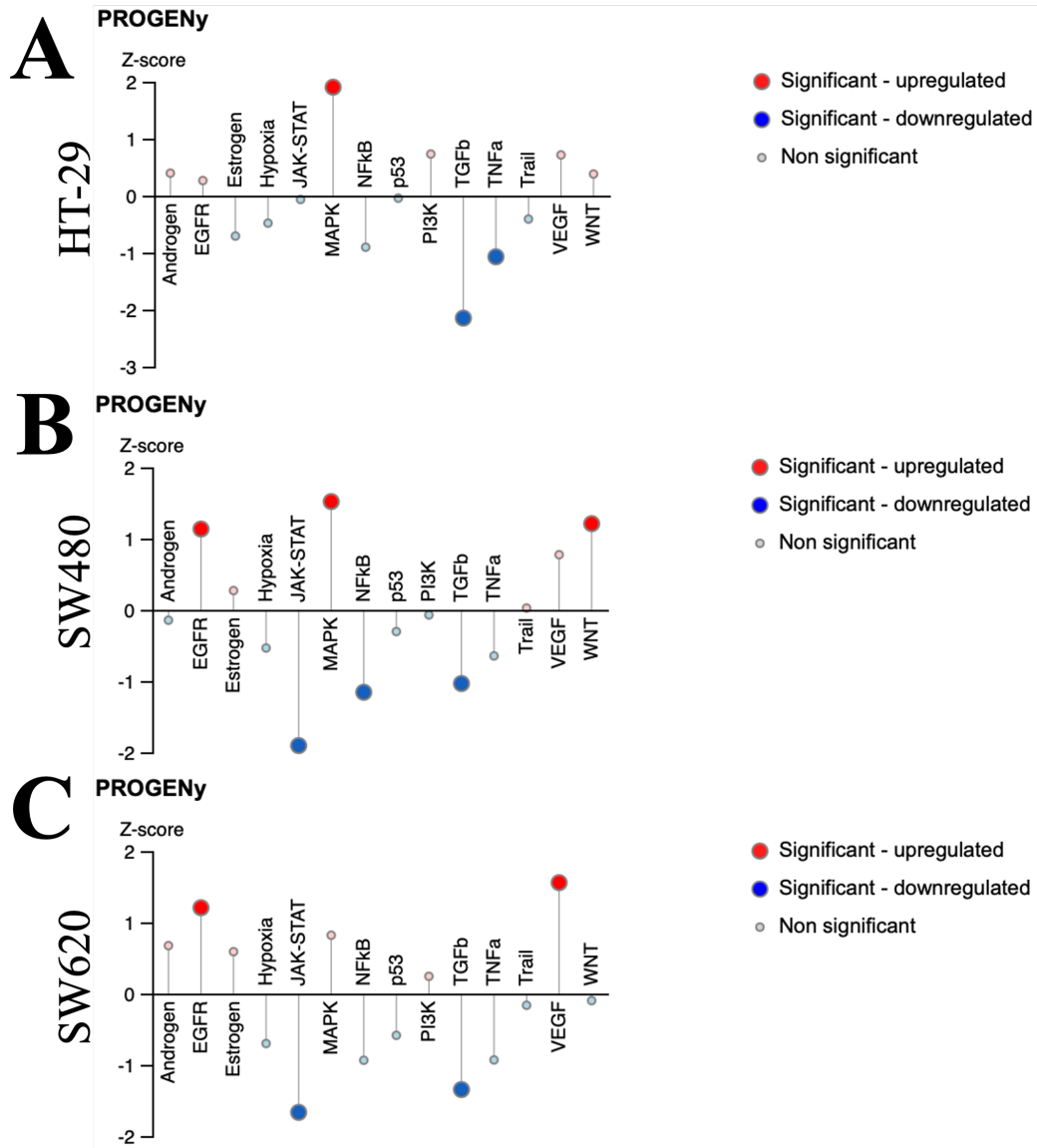


Figura 4.2: Vías de señalización activas en las diferentes líneas celulares de cáncer de colon.

Activación de distintas vías de señalización en las líneas celulares HT-29 (A), SW480 (B) y SW620 (C), analizada mediante la herramienta PROGENy (Pathway Responsive Genes) de The Human Protein Atlas. En los gráficos, las vías de señalización significativamente activas se representan con círculos rojos, mientras que aquellas no activas se indican con círculos azules, de acuerdo con el Z-score mostrado en el eje Y.

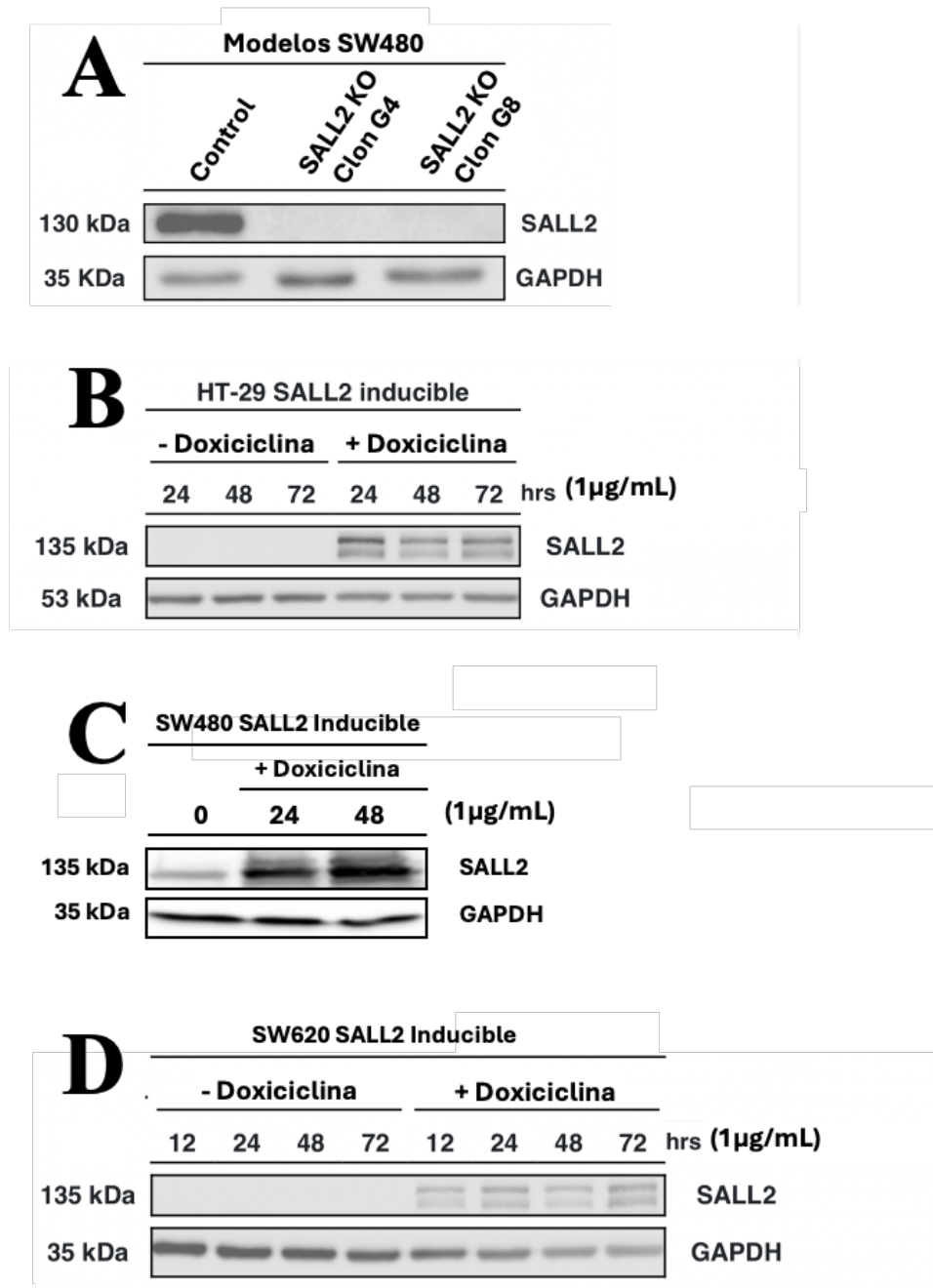


Figura 4.3: Validación de los modelos celulares con pérdida y ganancia de función del factor de transcripción *SALL2*.

Determinación de los niveles de SALL2 en los modelos celulares generados. Se realizó un análisis por western blot para evaluar la expresión de SALL2 en las líneas celulares SW480 SALL2 knockout (KO) (A), HT-29 SALL2 inducible (B), SW480 SALL2 inducible (C) y SW620 SALL2 inducible (D), con el objetivo de validar la generación de los modelos. Se cargaron 50 µg de proteína por carril y se utilizó el anticuerpo anti-GAPDH como control de carga. En los modelos inducibles, la expresión de SALL2 fue inducida mediante la adición de doxyciclina a una concentración de 1 µg/mL.

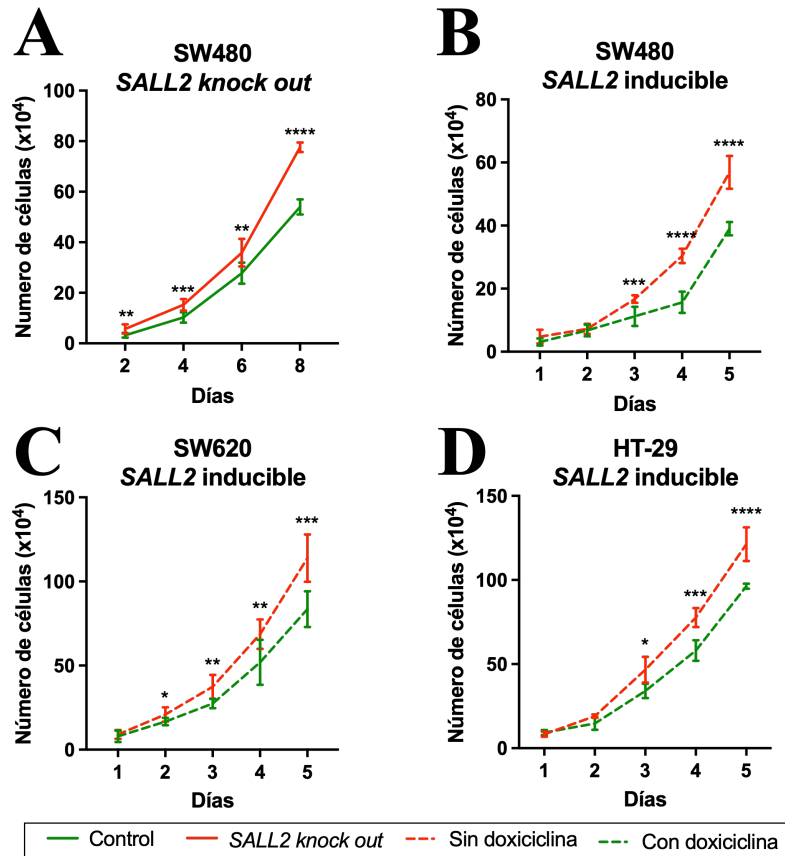


Figura 4.4: SALL2 inhibe la proliferación celular en modelos celulares.

Análisis de la proliferación celular en modelos con pérdida y ganancia de función de SALL2. Se evaluó el crecimiento celular en las líneas SW480 SALL2 knockout (KO) (A), SW480 SALL2 inducible (B), SW620 SALL2 inducible (C) y HT29 SALL2 inducible (D) mediante recuento celular en diferentes días de cultivo. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (SD). En los modelos inducibles, la expresión de SALL2 fue inducida con 1 μ g/mL de doxyciclina. La comparación estadística entre condiciones se realizó mediante test t no pareado para cada día evaluado (valor p: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, $n=3$).

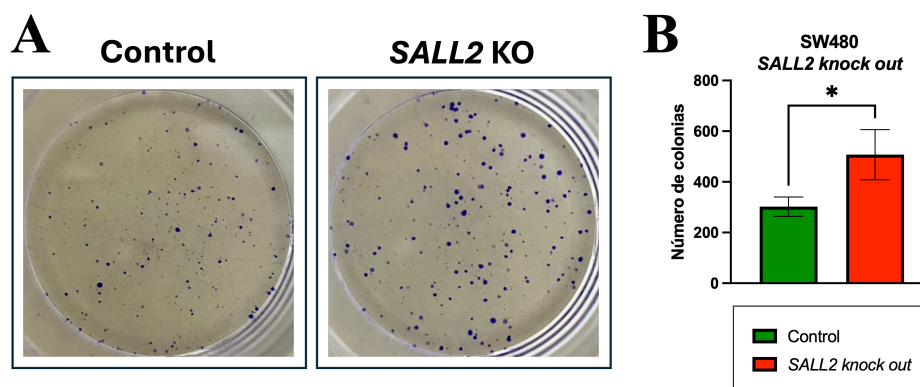


Figura 4.5: La pérdida de *SALL2* favorece la formación de colonias.

Ensayo de formación de colonias en células control y con pérdida de *SALL2*. (A) Imágenes representativas del crecimiento clonal para el modelo con pérdida de *SALL2* y su control correspondiente. Se sembraron 500 células en placas de 6 pocillos y se cultivaron por 2 semanas. La comparación estadística en (B) entre condiciones se realizó mediante test *t* no pareado (valor *p*: $*p < 0,05$, $n=3$).

4.1.2. La pérdida de *SALL2* promueve un aumento en la migración celular

Otra característica clave en la progresión tumoral, especialmente en la cascada metastásica, es la migración celular, un proceso intrínsecamente ligado a la EMT. Este fenotipo migratorio es crucial para que las células escapen del tumor primario y atraviesen la matriz extracelular, marcando el primer paso hacia la diseminación metastásica en el organismo. Para investigar cómo la ganancia y/o pérdida de *SALL2* impacta la migración celular, se realizaron ensayos utilizando insertos *transwell* (también llamadas cámaras de Boyden). Este sistema utiliza la quimiotaxis mediada por factores de crecimiento y citoquinas presentes en el suero, ubicado en la cámara inferior, como estímulo para favorecer el movimiento direccional de las células. Los resultados indican que la ausencia de *SALL2* provoca un aumento significativo en el número de células migratorias, observándose un cambio relativo de células migratorias de 1,7 en comparación con el control. Así, se destaca el papel *SALL2* en la regulación de este proceso. Además, la restauración de *SALL2* en los modelos inducibles de SW480 y HT-29 revierte este fenómeno, respaldando su función como un supresor de la migración celular (**Figura 4.6**). En el modelo SW480 *SALL2* inducible, se observó un cambio relativo del número de células migratorias de 0,6 en comparación con el control. De manera similar, en el modelo HT-29 *SALL2* inducible, este valor fue de 0,59 en comparación con el control. A pesar de que en ambos modelos la expresión de *SALL2* llevó a una disminución significativa en la capacidad migratoria de las células tumorales, en el modelo SW480 *SALL2* el número total de células migratorias fue mayor que en el modelo HT-29 *SALL2* inducible, lo cual podría estar relacionado con la menor capacidad migratoria basal de las células HT-29, vinculado principalmente a su fenotipo epitelial en el contexto de cáncer colon [Druzhkova et al., 2020].

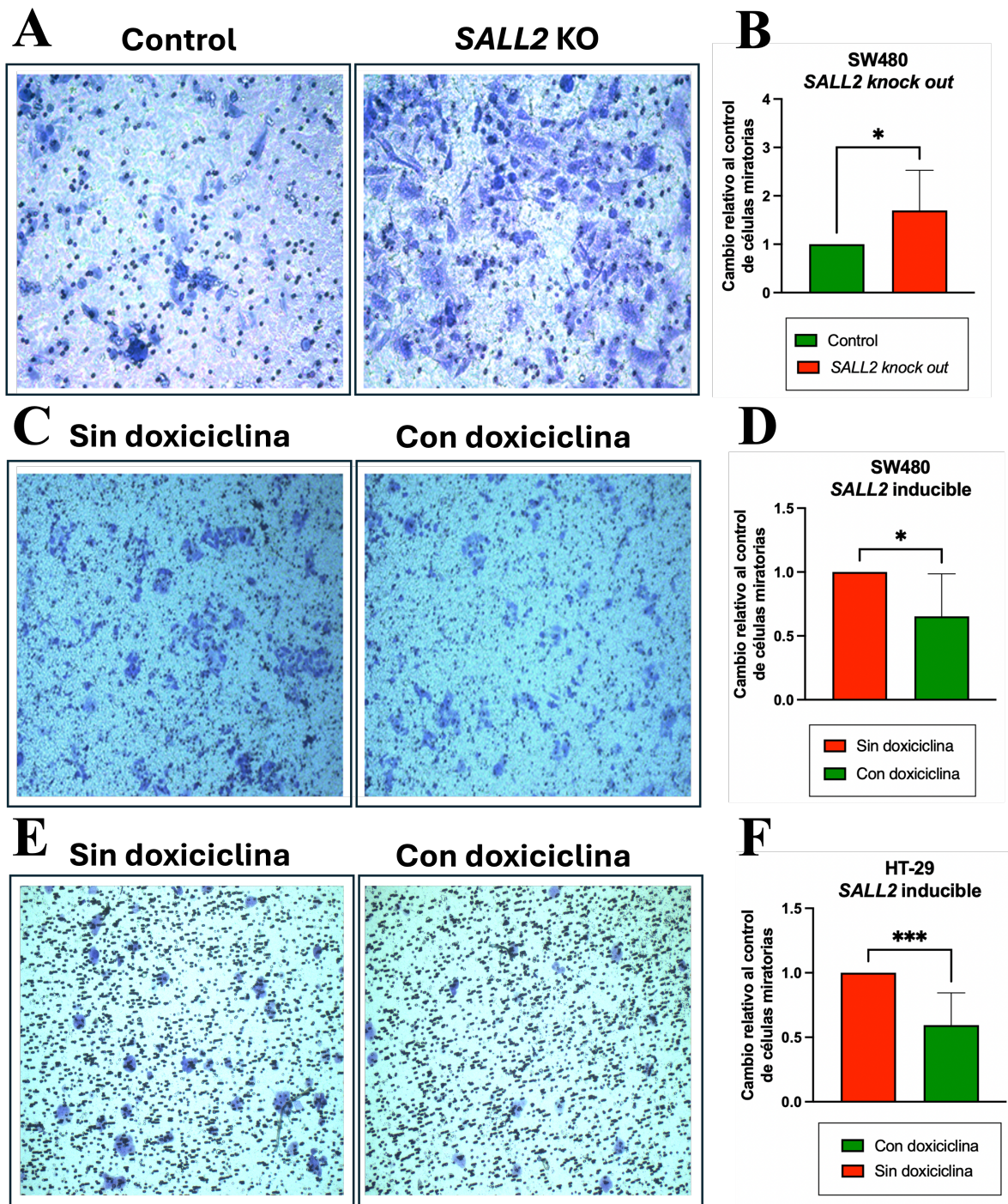


Figura 4.6: La pérdida de *SALL2* se asocia con un aumento de la capacidad migratoria en modelos celulares de cáncer de colon.

*Análisis de migración celular en los modelos de cáncer de colon mediante ensayos de transwell. En (A), (C) y (E) se muestran imágenes representativas de células migrantes teñidas con cristal violeta y fotografiadas con aumento de 10x, correspondientes a los modelos SW480 SALL2 knockout, SW480 SALL2 inducible y HT-29 SALL2 inducible, respectivamente. En (B), (D) y (F) se presenta la cuantificación del número de células migratorias. Para cada experimento, se realizaron triplicados y se capturaron imágenes de tres campos diferentes por cada réplica, sumando un total de 27 imágenes analizadas por condición. Los datos corresponden a la media \pm DE. Se utilizó la prueba t de Student no pareada para determinar diferencias significativas (p -valor: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$, $n=3$)*

Para complementar el estudio del rol de *SALL2* en la migración celular, se analizó la distribución de AFs en el modelo celular SW480 *SALL2* inducible. En la **Figura 4.7**, se observa que el número de AFs es mayor en ausencia de *SALL2*. Por el contrario, la reexpresión de *SALL2* reduce de manera significativa la cantidad de AFs, observándose un cambio relativo del número de *clusters* de vinculina por célula de 0,7 en comparación con el control. Las imágenes representativas muestran la distribución de estas estructuras con y sin el tratamiento. En conjunto, estos resultados indican que la pérdida de *SALL2* favorece un aumento en la capacidad migratoria y el número de AFs en modelos de cáncer de colon, sugiriendo un fenotipo tumoral mas agresivo y con un potencial metastásico en CCR.

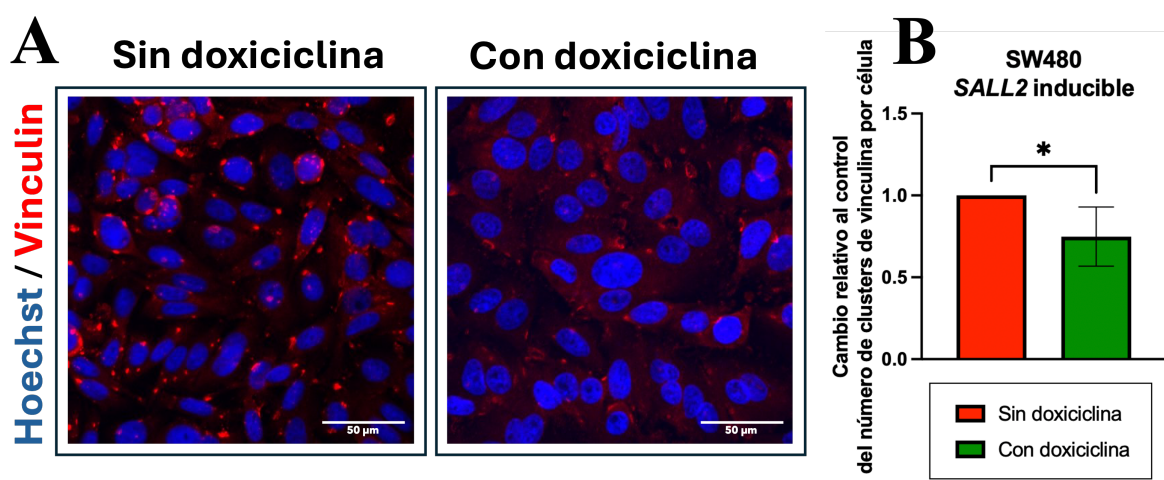


Figura 4.7: La expresión de *SALL2* induce una disminución en el número de adhesiones focales.

*Evaluación de adhesiones focales mediante inmunodetección de vinculina. (A) Imágenes representativas de la distribución de vinculina en el modelo SW480 SALL2 inducible. (B) Cuantificación del número de clusters de vinculina por célula. Las imágenes fueron tomadas con aumento de 40x en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss. Para cada experimento, se realizaron duplicados y se capturaron imágenes de tres campos diferentes por cada réplica, sumando un total de 12 imágenes analizadas por condición. Los datos corresponden a la media \pm DE. Se utilizó la prueba t de Student no pareada para determinar diferencias significativas (p -valor: $*p < 0,05$, $n=2$).*

4.1.3. La pérdida de *SALL2* promueve cambios morfológicos asociados a la reorganización del citoesqueleto de actina

La activación de los programas transcripcionales y postraduccionales asociados con la EMT favorecen la adquisición de un fenotipo mesenquimal, caracterizado por una organización del citoesqueleto que difiere marcadamente del fenotipo epitelial, generando un aumento en la capacidad migratoria de las células, inducida principalmente por gradientes de factores quimiotácticos. Para determinar si los cambios observados en la migración celular se correlacionan con alteraciones morfológicas en los modelos estudiados, se utilizó faloidina para visualizar la distribución de los filamentos de actina. En este análisis se empleó el modelo SW480 *SALL2* inducible, ya que presenta una mayor capacidad migratoria. Además, la diferencia en los niveles de expresión de *SALL2* en el modelo inducible es significativamente más alta que en el modelo con pérdida de función, lo que permite identificar

diferencias fenotípicas de manera más evidente. En la **Figura 4.8** se observa que, tras la inducción de *SALL2*, las células adquieren una disposición más agrupada y un citoplasma de forma poligonal, característico de un fenotipo epitelial. En contraste, la ausencia de *SALL2* favorece una morfología alargada o fusiforme, propia de un fenotipo mesenquimal migratorio, lo cual ya ha sido reportado por otros autores [Nurmagambetova et al., 2023]. Además, la intensidad de fluorescencia por célula es mayor sin expresión de *SALL2*, lo que sugiere que la pérdida de *SALL2* promueve un aumento en los niveles de filamentos de actina intracelular. Este comportamiento es típico de células con alta reorganización del citoesqueleto, un proceso clave para potenciar la migración celular.

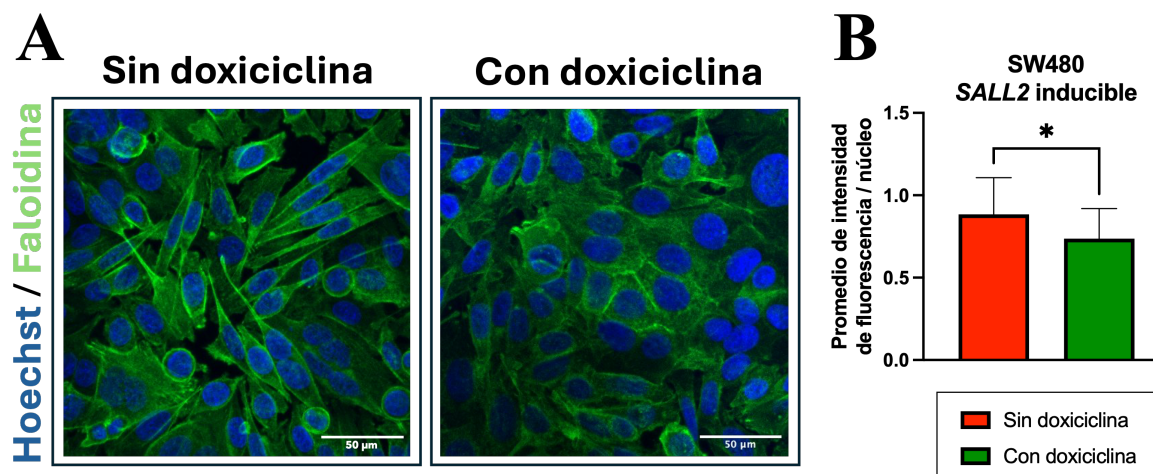


Figura 4.8: La expresión de *SALL2* genera una pérdida de la morfología alargada.

*Evaluación de los filamentos de actina mediante faloidina. (A) Imágenes representativas de la distribución de los filamentos de actina en el modelo SW480 SALL2 inducible. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia por núcleo. Las imágenes fueron tomadas con aumento de 40x en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss. Para cada experimento, se realizaron duplicados y se capturaron imágenes de tres campos diferentes por cada réplica, sumando un total de 18 imágenes analizadas por condición. Los datos corresponden a la media \pm DE. Se utilizó la prueba t de Student no pareada para determinar diferencias significativas (p-valor: * $p < 0,05$, $n=3$).*

Durante la EMT, no solo cambia la morfología general de la célula, sino también la del núcleo, un organelo rígido y voluminoso. En células migratorias, el núcleo adquiere una forma más alargada y, a menudo, reduce su área, facilitando así su paso por espacios confinados. Para evaluar estos cambios, se analizó el área y la circularidad nuclear, definida como la razón entre el largo y el ancho del núcleo. Valores cercanos a 1 indican una forma redondeada, mientras que valores mayores reflejan un núcleo alargado. En la **Figura 4.9**, se observa que la ausencia de *SALL2* se asocia con un núcleo más alargado, mientras que su reexpresión induce una morfología más redondeada. La cuantificación del área y la circularidad nuclear evidencia diferencias significativas en ambos parámetros, lo que sugiere que *SALL2* no solo reduce la capacidad migratoria de las células tumorales, como se observó en los ensayos de migración, sino que también promueve una reorganización estructural más estable, lo que refuerza este fenotipo menos migratorio. Estos cambios incluyen una menor intensidad de actina, una disposición celular más compacta y poligonal, y una transición nuclear hacia una forma más redondeada, características de células

menos migratorias [Brabletz et al., 2021, Nurmagambetova et al., 2023]. En ausencia de *SALL2*, las células adquieren una morfología alargada, asociada a una mayor capacidad de migración, lo que refuerza la idea de que la plasticidad estructural es clave en este proceso. Además, la organización celular más estructurada sugiere una posible reducción en la proliferación, destacando el papel central de *SALL2* en la regulación de procesos fundamentales del cáncer colorrectal.

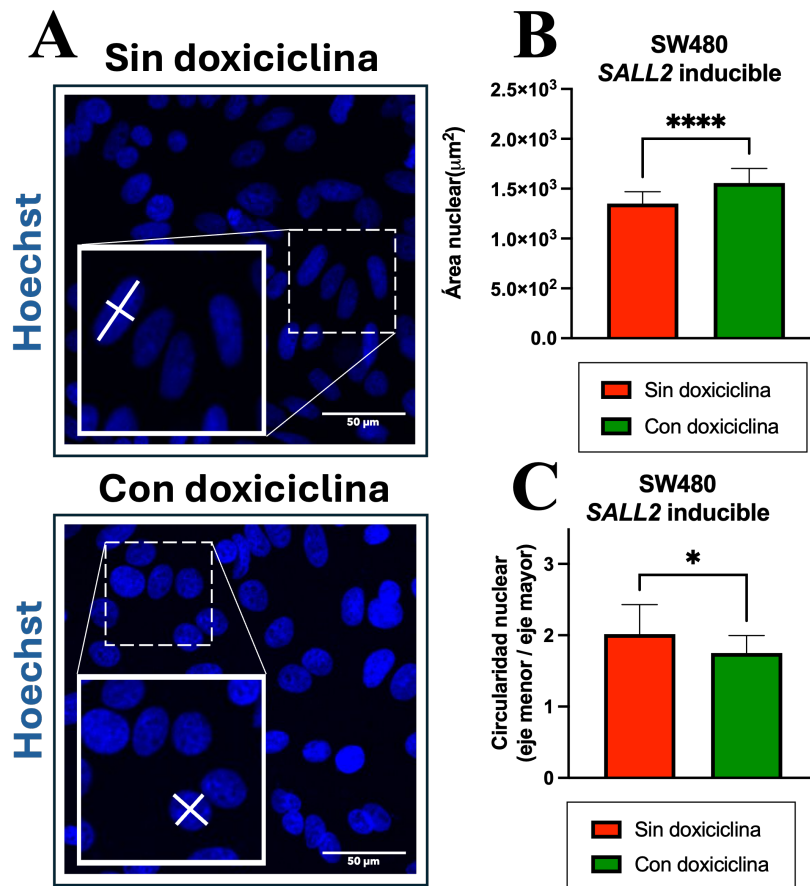


Figura 4.9: La expresión de *SALL2* induce un aumento en el tamaño y la circularidad nuclear.

*Evaluación del área y circularidad nuclear en el modelo SW480 SALL2 inducible. (A) Imágenes representativas de los núcleos celulares teñidos con Hoechst. El recuadro punteado resalta una región ampliada para una mejor visualización. La cruz blanca indica, a modo de referencia, la medición del eje mayor y menor utilizada para calcular la circularidad. (B) Cuantificación del área nuclear. (C) Cuantificación de la circularidad nuclear. Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 40x en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss. Para cada experimento, se realizaron duplicados y se capturaron imágenes de tres campos diferentes por cada réplica, sumando un total de 18 imágenes analizadas por condición. Los datos se presentan como media ± DE. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t de Student no pareada (valor p: *p < 0,05; ****p < 0,0001, n = 3).*

4.1.4. La pérdida de *SALL2* induce un aumento en la resistencia a quimioterapéuticos clásicos utilizados en pacientes con cáncer de colon

Además de proliferación y migración celular, la adquisición de resistencia a la terapia antitumoral es crucial para que las células cancerosas se mantengan en crecimiento y logren la diseminación en el organismo. En general, la EMT favorece un estado similar al observado en las células madres tumorales (CSC, *Cancer Stem Cell*), el cual potencia la resistencia a drogas por mecanismos como el aumento del flujo de drogas mediado por transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), por alteración de vías apoptóticas o por una mejora en los mecanismos de reparación de daño al ADN [Duan et al., 2022] [De Las Rivas et al., 2021]. En este contexto, se evaluó si la pérdida y reexpresión de *SALL2* se correlaciona con un aumento en la resistencia a 5-fluorouracilo (5-FU), un antimetabolito que interfiere con la síntesis de ADN y ARN, y un quimioterapéutico clásico utilizado para el tratamiento del cáncer colorrectal y otros cánceres [Vodenkova et al., 2020]. En primer lugar, se determinó la concentración de 5-FU a utilizar mediante un ensayo de viabilidad celular, evaluando el efecto del tratamiento con concentraciones entre 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y comparando los resultados obtenidos con lo previamente reportado en la literatura [Mhaidat et al., 2014]. En la **Figura 4.10 A** se observa que el patrón de sensibilidad a la droga se mantiene constante hasta los 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y que 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ provoca la muerte o detención del crecimiento celular de más del 50 %, lo que indica que esta concentración es demasiado alta para ser utilizada en los ensayos. Por otra parte, la literatura indica que las concentraciones óptimas de tratamiento con 5-FU para células SW480 varían entre 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lo cual es consistente con nuestros resultados. Es por ello que para los siguientes experimentos se estableció como concentración de trabajo 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se evaluó el tiempo en el cual esta concentración de 5-FU tiene un efecto sobre las células, utilizando tiempos de 24, 48 y 72 horas. El gráfico de la **Figura 4.10 B** muestra que diferencias significativas se observan a 24 horas posteriores al tratamiento con 5-FU en los modelos utilizados. De manera específica, se observa que la pérdida de expresión de *SALL2* se correlaciona con un aumento en la viabilidad celular en comparación con el control, y este efecto se revierte cercano a valores de la condición control en el modelo SW480 *SALL2* inducible luego de la reexpresión de *SALL2*.

A menudo, el 5-FU se utiliza en combinación con otras drogas para aumentar su eficiencia, reducir la resistencia y controlar la progresión tumoral en estadios avanzados donde la agresividad es mucho mayor. Una de las combinaciones más utilizadas en pacientes con cáncer de colon es el régimen de quimioterapia FOLFOX, el cual utiliza la combinación de ácido folínico (leucovorina), 5-FU y oxaliplatino (de los nombres de sus componentes deriva el nombre FOLFOX) y se administra en estadios tempranos de la enfermedad como agente adyuvante, en cáncer metastásico como agente paliativo y en muchos casos se utiliza como agente neoadyuvante antes de la cirugía. Sabiendo esto, se evaluó la viabilidad del modelo con pérdida de función de *SALL2* luego del tratamiento con FOLFOX durante 24 horas. Las concentraciones de los componentes fueron leucovorina 10 μM , 5-FU 50 μM y oxaliplatino 40 μM , según lo descrito en literatura [Roh et al., 2012]. La **Figura 4.11** muestra que la pérdida de expresión de *SALL2* produce un aumento en la viabilidad celular lo que se traduce como la adquisición de un fenotipo más resistente al tratamiento con FOLFOX.

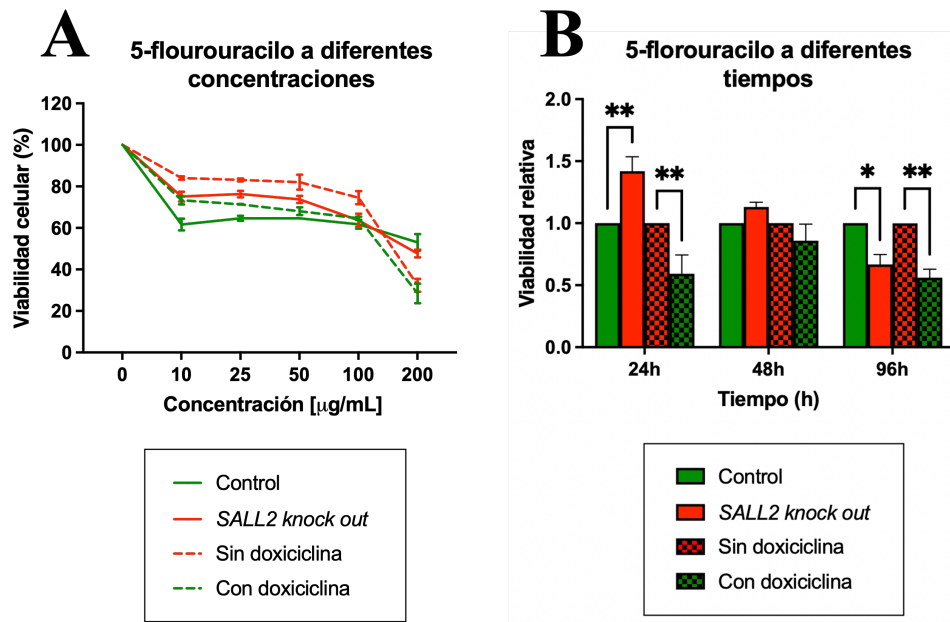


Figura 4.10: La pérdida de *SALL2* se correlaciona con una mayor resistencia a 5-FU.

Viabilidad celular frente al tratamiento con 5-fluorouracilo. (A) Los modelos SW480 con pérdida y ganancia de función de *SALL2* fueron tratadas con distintas concentraciones de 5-FU durante 24 horas. (B) Se utilizó una concentración de 75 µg/mL de 5-FU a diferentes tiempos bajo condiciones normales de cultivo. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT, midiendo la absorbancia a 480 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular ± DE. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba ANOVA de dos vías (valor p: **p < 0,01; ***p < 0,0001, n = 3).

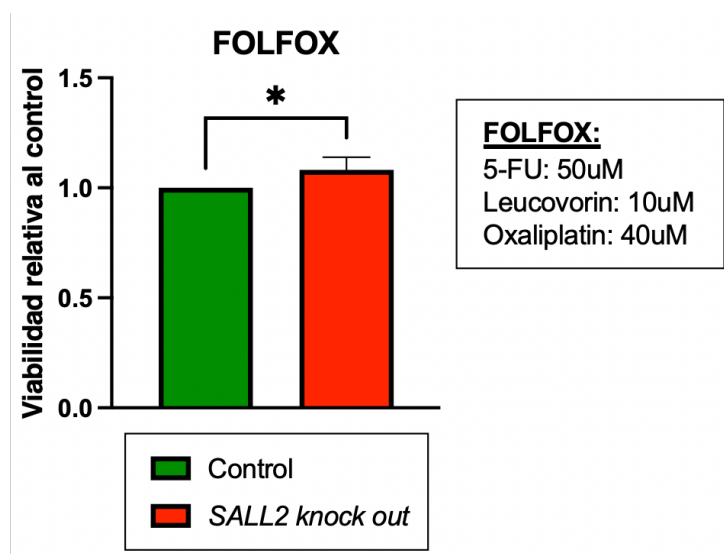


Figura 4.11: La pérdida de *SALL2* se correlaciona con una mayor resistencia a FOLFOX.

Viabilidad celular frente al tratamiento con FOLFOX. El modelo SW480 con pérdida de función de *SALL2* fue tratado con la combinación de leucovorina, 5-FU y oxaliplatino, (que comúnmente se conoce como FOLFOX) en concentraciones de 10 μM , 50 μM y 40 μM , respectivamente, por 24 horas en condiciones normales de cultivo. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT, midiendo la absorbancia a 480 nm. Los resultados se expresan como el cambio relativo al control \pm DE.

4.1.5. Cambios en la expresión de marcadores clásicos de EMT están asociados con la modulación de los niveles de *SALL2*

Los resultados anteriores nos sugieren que la pérdida de *SALL2* podría estar relacionada con la activación de la transición epitelio mesénquima, ya que todos los cambios fenotípicos analizados están relacionados con este programa. Para confirmar si efectivamente estos cambios se relacionan con la EMT, se analizó la expresión de algunos marcadores clásicos de la EMT a nivel de proteína y de ARN en los modelos celulares de cáncer de colon. Se analizaron los niveles de E-cadherina y N-cadherina, ya que se ha descrito que una característica clásica de la activación de la EMT es lo que se conoce como «*cadherin switch*» o «cambio de cadherinas», en el cual se observa una disminución de la cadherina epitelial (E-cadherina) y un aumento de la cadherina mesenquimal (N-cadherina). Además, se evaluaron los niveles de la proteína Snail, vimentina y FAK. Por último, se evaluaron los niveles de integrina $\beta 1$ e integrina $\beta 3$, ya que se ha descrito que la disminución de integrina $\beta 1$ y el aumento de integrina $\beta 3$, favorece un fenotipo más agresivo a través de la EMT y la resistencia a la muerte mediada por integrinas [Pan et al., 2018].

Interesantemente, la pérdida de *SALL2* en células SW480 produce un aumento significativo tanto en los niveles de E-cadherina como los de N-cadherina (Figura 4.12A-C). Este resultado se opone, de alguna manera, al cambio de cadherinas esperado. Por otra parte, a pesar de que los niveles de Snail son mayores en ausencia de *SALL2*, los de vimentina son similares en ambos casos (Figura 4.12A, F, G). Los resultados nos sugieren que a pesar de que un factor de transcripción clásico de la EMT como Snail está aumentado en ausencia de *SALL2*, este no es capaz de establecer el patrón clásico de marcadores asociados a un fenotipo completamente mesenquimal, lo que indica que mecanismos anexos

o compensatorios estarían favoreciendo el aumento de los niveles de E-cadherina, en los modelos con pérdida de función de *SALL2*.

De manera complementaria, para determinar si *SALL2* afecta los niveles de FAK en contexto de cáncer de colon, se evaluaron sus niveles totales y su estado de fosforilación en el residuo de tirosina 397 (Y397), una marca de activación funcional de esta quinasa. Esta fosforilación representa un paso clave en la señalización inducida por integrinas, favoreciendo la formación de adhesiones focales y la reorganización del citoesqueleto, lo que se traduce en una mayor capacidad migratoria celular. Como se muestra en la **Figura 4.12A, H**, la pérdida de *SALL2* reduce los niveles totales de FAK, pero induce un aumento significativo en la fosforilación de Y397, lo que implica una activación de esta quinasa a pesar de la reducción en su cantidad total. Este hallazgo sugiere que la ausencia de *SALL2* genera un cambio en la dinámica de activación de FAK, lo que podría compensar la disminución de sus niveles totales mediante una mayor eficiencia funcional. Así, es posible que a pesar de tener una disminución en FAK total, FAK fosforilado aumente su eficiencia desde un punto de vista enzimático, por ejemplo, mediante interacción con cofactores o proteínas reguladoras, o también cambios en su localización, trasladándose a zonas con mayor concentración de sustrato.

Por otra parte, y como se mencionó anteriormente, se observa una disminución de integrina $\beta 1$ y un aumento de integrina $\beta 3$ en el modelo *SALL2 knock out* (**Figura 4.12A, D, E**). Este cambio en los niveles de integrinas se ha asociado con un aumento de la agresividad [Parvani et al., 2013], sugiriendo que podría favorecer la malignidad de las células tumorales.

Un cambio interesante en el resultado anterior es el aumento de E-cadherina como respuesta de la pérdida de *SALL2*. Para corroborar este resultado y determinar si este aumento de E-cadherina es consistente durante el tiempo, se determinaron los niveles de proteína a 48, 72 y 96 horas posteriores al sembrado celular en condiciones normales de cultivo. En la **Figura 4.13** se observa que incluso 4 días posteriores al sembrado celular, donde las células ya habían alcanzado aproximadamente un 80-85 % de confluencia, el modelo con pérdida de función de *SALL2* tiene niveles mucho mayores de E-cadherina en comparación con el control.

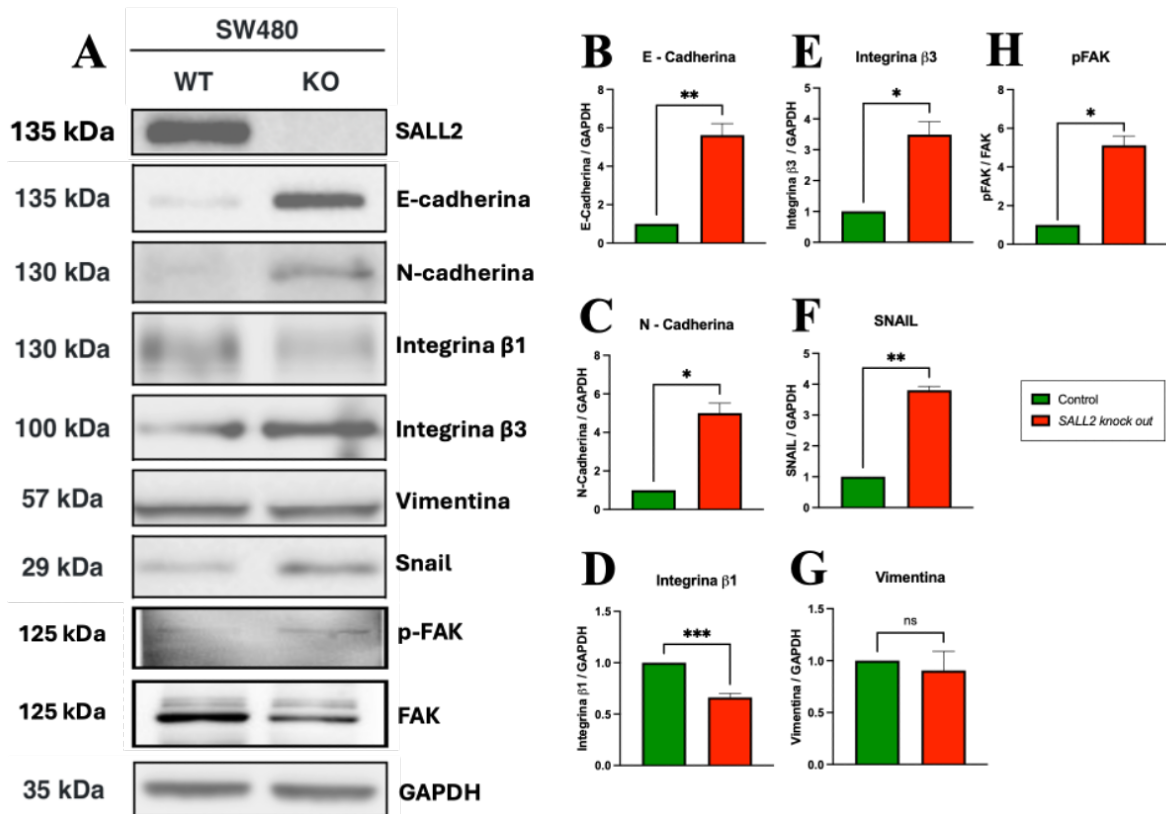


Figura 4.12: La pérdida de *SALL2* genera un fenotipo de EMT parcial

Análisis de marcadores de EMT en modelo SW480 *SALL2* knock out. (A) Imagen representativa de los niveles de diferentes proteínas asociadas a la EMT evaluadas mediante western blot. (B) - (H) Cuantificación de los niveles de proteína mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Los datos se presentan como media \pm DE. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t de Student no pareada (valor p: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 3$).

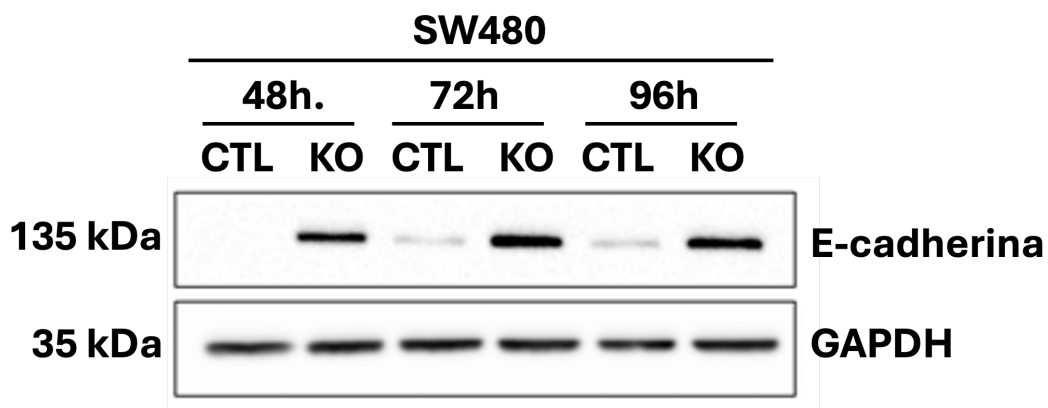


Figura 4.13: Los niveles de E-cadherina aumentan en ausencia de *SALL2*

Análisis de los niveles de E-cadherina en modelo SW480 con pérdida de función de *SALL2*. Se evaluaron los niveles de E-cadherina mediante western blot a 48, 72 y 96 horas posteriores al sembrado en placa. Se utilizó GAPDH como control de carga.

Ya que los cambios en E-cadherina a nivel de proteína pueden ser el resultado de diferentes tipos de regulación, se determinó el nivel de expresión de E-cadherina a nivel transcripcional mediante RT-qPCR, esta vez en los modelos de pérdida y ganancia de función de *SALL2*. En la **Figura 4.14**, se observa que la expresión de *CDH1*, el gen que codifica a E-cadherina, es mayor en el modelo SW480 *SALL2 knock out* en comparación con el control, y este efecto se revierte cuando se utiliza el modelo inducible, en donde se observa una diferencia significativa cuando se sobreexpresa *SALL2* en estas mismas células. La diferencia de expresión es mucho más significativa en el modelo inducible probablemente producto de la diferencia en los niveles proteicos de *SALL2*, ya que este modelo genera un aumento considerable de la proteína en la célula, lo que puede ser la causa de la gran diferencia de expresión del gen *CDH1*. De manera complementaria, el modelo de pérdida de función muestra niveles aumentados de *SNAI1*, gen que codifica al factor de transcripción Snail, asociándose este resultado con lo clásico esperado para la activación de la ETM. Tanto a nivel de proteína como de ARN mensajero se observa que la pérdida de *SALL2* aumenta los niveles de Snail. Sin embargo, los niveles de E-cadherina no se ven afectados por este aumento, y por tanto, los resultados sugieren que *SALL2* regula los niveles de expresión de E-cadherina de forma independiente de Snail, lo cual podría ser estudiado en modelos deficientes de Snail. Los resultados anteriores sugieren que, en ausencia de *SALL2*, se produce un proceso de EMT parcial o híbrido, en lugar de un fenotipo de EMT completo.

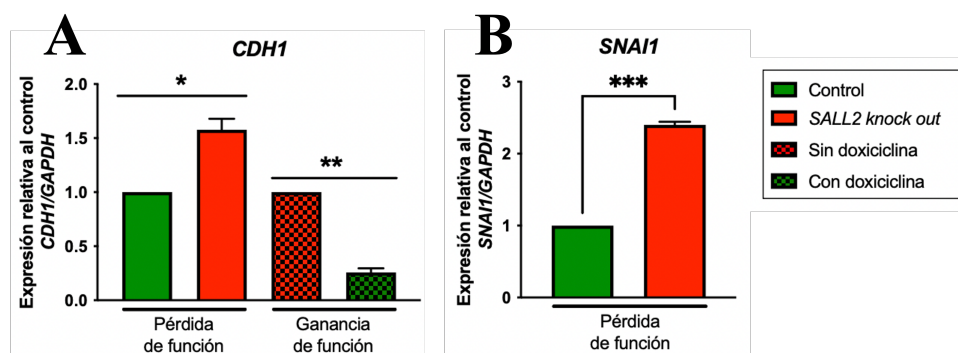


Figura 4.14: La pérdida de *SALL2* se correlaciona con el aumento de expresión de *CDH1* y *SNAI1*

Niveles de expresión de CDH1 y SNAI1. Los niveles de expresión se determinaron mediante RT-qPCR en los modelos celulares de SW480 con pérdida y ganancia de función de *SALL2*. La cuantificación de la expresión de *CDH1* (A) y *SNAI1* (B) se realizó por el método $\Delta\Delta CT$. La diferencia estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student no pareada (valor *p*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 3$).

4.1.6. La pérdida de *SALL2* favorece la localización intracelular de E-cadherina en los modelos celulares de cáncer de colon

Aunque previamente observamos un aumento en los niveles de E-cadherina a nivel de proteína y ARN mensajero, es importante analizar si esta proteína está localizada predominantemente en la membrana plasmática. En células con un fenotipo EMT parcial o intermedio, se ha descrito que E-cadherina puede ser endocitada para su degradación o

almacenamiento intracelular, lo que favorece una mayor dinámica en las uniones célula-célula [Pastorino et al., 2024]. Este proceso puede contribuir a una migración en estados híbridos entre fenotipos epiteliales y mesenquimales. En este contexto, se investigó si la localización de E-cadherina variaba al modular los niveles de *SALL2*. Para este análisis, se utilizó el modelo inducible HT-29, ya que estas células, al presentar un fenotipo más epitelial, son un modelo adecuado para estudiar la distribución de E-cadherina. Por otro lado, las células SW480, que poseen un fenotipo más mesenquimal y migratorio, presentan niveles significativamente bajos de E-cadherina, lo que dificulta detectar cambios sutiles relacionados con esta proteína. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para visualizar la localización de E-cadherina. En la **Figura 4.15**, se observa que, tras la inducción de *SALL2*, E-cadherina muestra un aumento notable en los contactos célula-célula, en comparación con el control. El mismo ensayo fue realizado en el modelo SW480 *SALL2* inducible observándose el mismo resultado **Figura 4.16**. Este resultado sugiere que *SALL2* favorece la localización de E-cadherina en membrana. Además, aunque *SALL2* se detecta en ambas condiciones, el cambio más evidente es el aumento de E-cadherina en la región intercelular, específicamente en la zona media entre núcleos, que corresponde al sitio de contacto entre células. Esta observación se basa en un análisis de intensidad realizado a lo largo de una línea trazada desde el centro del núcleo de una célula hasta el centro del núcleo de la célula adyacente. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *SALL2* favorece la estabilización de E-cadherina en la membrana plasmática. Sin embargo, se requiere el uso de marcadores específicos de membrana para confirmar la colocalización. Pese a la carencia de marcadores de membrana en el análisis, la cuantificación realizada revela una diferencia significativa entre las condiciones analizadas (**Figura 4.15 B**), destacando el papel de *SALL2* en la modulación de la localización de E-cadherina y, potencialmente, en la regulación de la dinámica celular asociada a las uniones célula-célula.

Adicionalmente, se realizó la inmunodetección de β -catenina en células SW480 para evaluar la localización de esta proteína. La idea de este análisis se basa principalmente en que E-cadherina cuando está en la membrana celular formando uniones adherentes, está unida a diferentes proteínas como las cateninas (α -catenina, β -catenina y p120-catenina), para conectar las uniones adherentes al citoesqueleto de actina, estabilizando la adhesión célula-célula y permitiendo la transmisión de señales mecánicas y químicas [Harris and Tepass, 2010]. Al estar β -catenina formando parte de la unión, la localización de esta proteína se asocia principalmente a la membrana celular. Sin embargo, si la unión se desestabiliza, además de la internalización de E-cadherina, β -catenina también se internaliza y, por consecuencia, se localiza en el citoplasma celular donde comúnmente es degradada a través del proteosoma. En cáncer colorrectal, el complejo encargado de degradar β -catenina intracelular se encuentra alterado, por lo que es común observar la traslocación de esta proteína al núcleo, donde actúa como un coactivador transcripcional al asociarse con factores TCF/LEF, regulando la expresión de genes relacionados con proliferación, diferenciación y supervivencia celular, como *MYC* y *CCND1*. En este contexto, la **Figura 4.17**, muestra que la reexpresión de *SALL2* en las células SW480 produce una disminución significativa de la localización de β -catenina en el núcleo de las células, lo que, en conjunto con **Figura 4.15**, sugiere que *SALL2* favorece un fenotipo epitelial al evitar la localización intracelular de las proteínas que forman parte de las uniones adherentes como E-cadherina y β -catenina.

Al observar que, en condiciones basales, la pérdida de *SALL2* induce un aumento en los niveles de E-cadherina, pero con una reducción de su localización en la membrana celular, se decidió evaluar el efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal*

Growth Factor), un potente inductor de la EMT, sobre la regulación de E-cadherina en los modelos de cáncer de colon, ya que se ha descrito que la internalización de E-cadherina, en parte, es mediada por la vía de señalización EGF [Pastorino et al., 2024, Xu et al., 2015]. En la **Figura 4.18**, se observa que el tratamiento con EGF disminuye los niveles de E-cadherina solo en presencia de SALL2 en el modelo inducible aproximadamente un 60 % del valor sin tratamiento con EGF. Este resultado sugiere que la regulación negativa de EGF sobre E-cadherina, depende de la presencia de SALL2, destacando su posible papel como modulador de esta señalización.

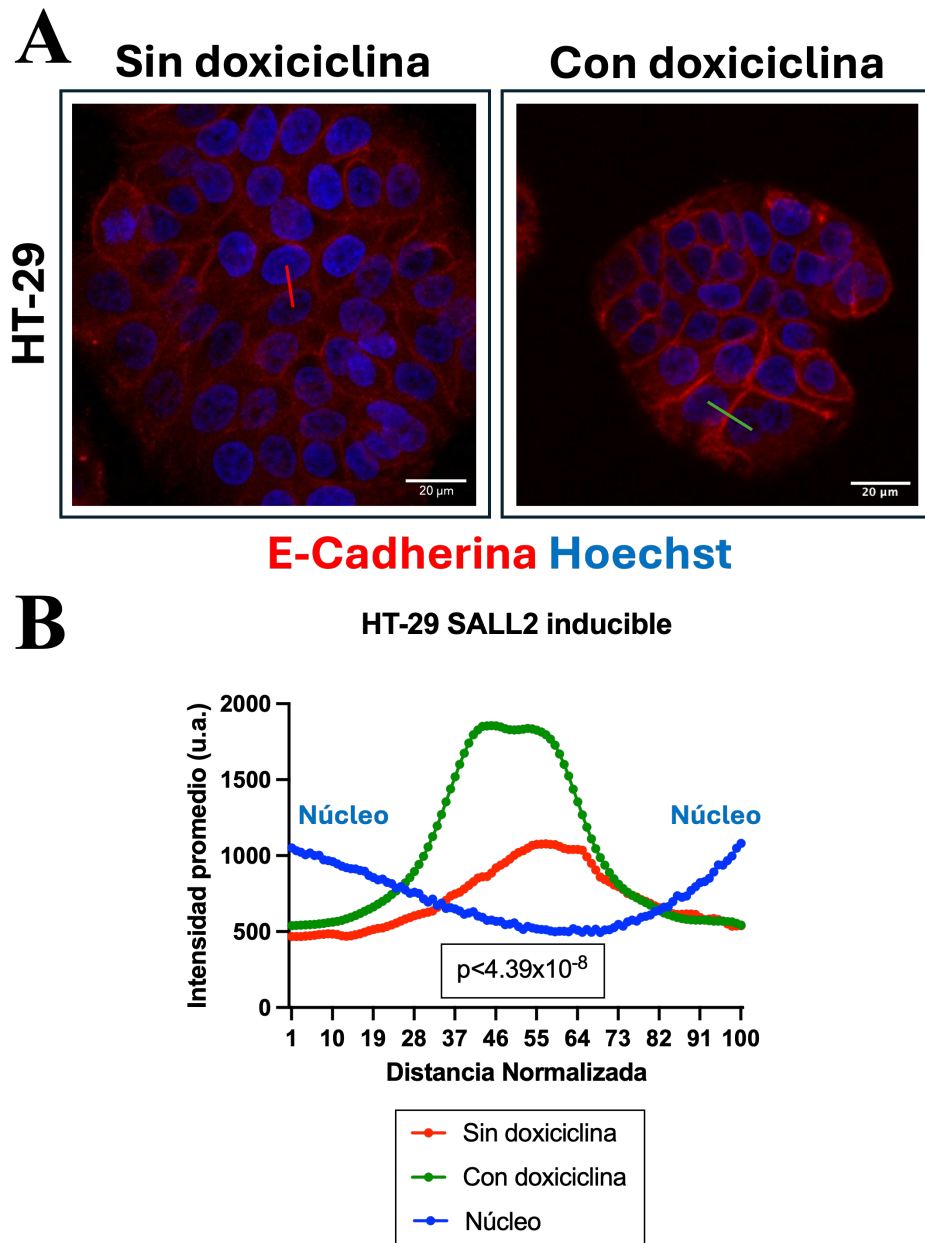


Figura 4.15: La expresión de *SALL2* induce un aumento en la localización de membrana de E-cadherina.

Localización de E-cadherina en el modelo HT-29 SALL2 inducible. (A) Imágenes representativas de la localización de E-cadherina (rojo) y núcleos (azul). Para la reexpresión de SALL2 se utilizó doxyciclina a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 horas. Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 40x en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss. En las imágenes la línea roja y verde ejemplifican la manera de realizar la cuantificación con la medición de intensidad de fluorescencia desde el centro de un núcleo hasta el centro del núcleo de la célula adyacente. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia medida a lo largo de una línea generada entre dos núcleos adyacentes. Los valores obtenidos se normalizaron en una escala de 1 a 100. Las curvas en rojo y verde representan la distribución de E-cadherina y en azul, la intensidad emitida por el marcador nuclear hoechst. La diferencia significativa entre las curvas se determinó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (valor p : **** $p < 0,0001$, $n = 2$).

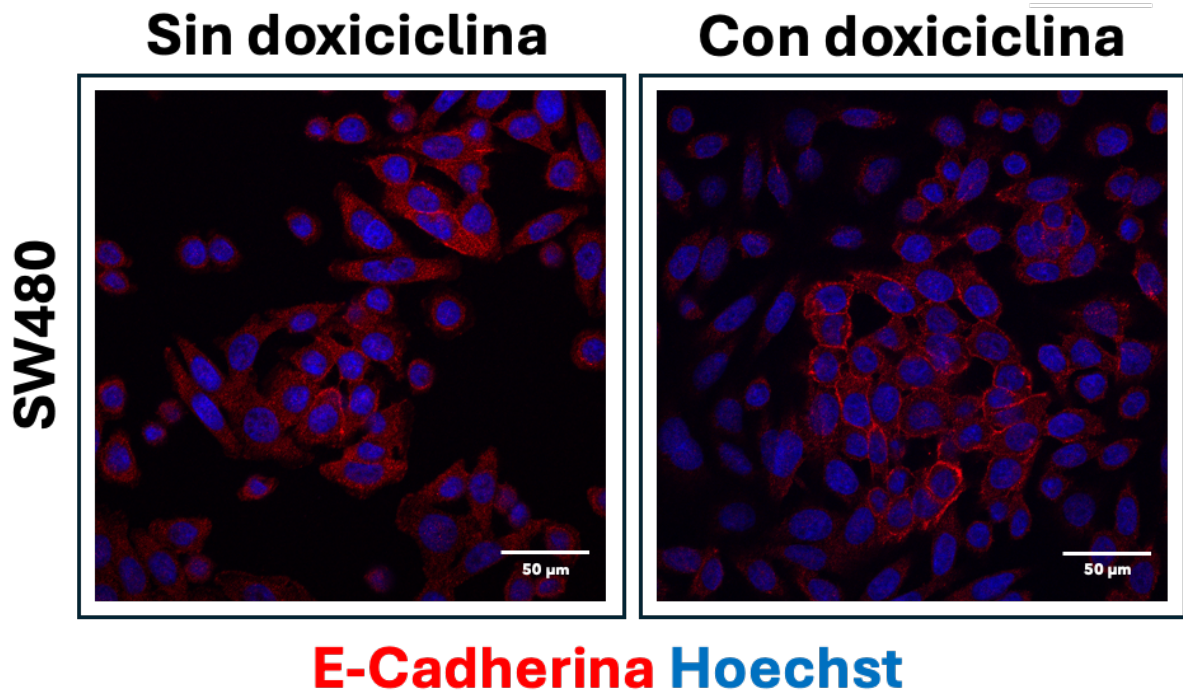


Figura 4.16: La expresión de *SALL2* induce un aumento en la localización de membrana de E-cadherina en células SW480

Localización de E-cadherina en el modelo SW480 SALL2 inducible. Imágenes representativas de la localización de E-cadherina (rojo) y núcleos (azul). Para la reexpresión de SALL2 se utilizó doxibicliclina a una concentración de 1 μg/mL durante 48 horas. Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 40x en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss. n = 2.

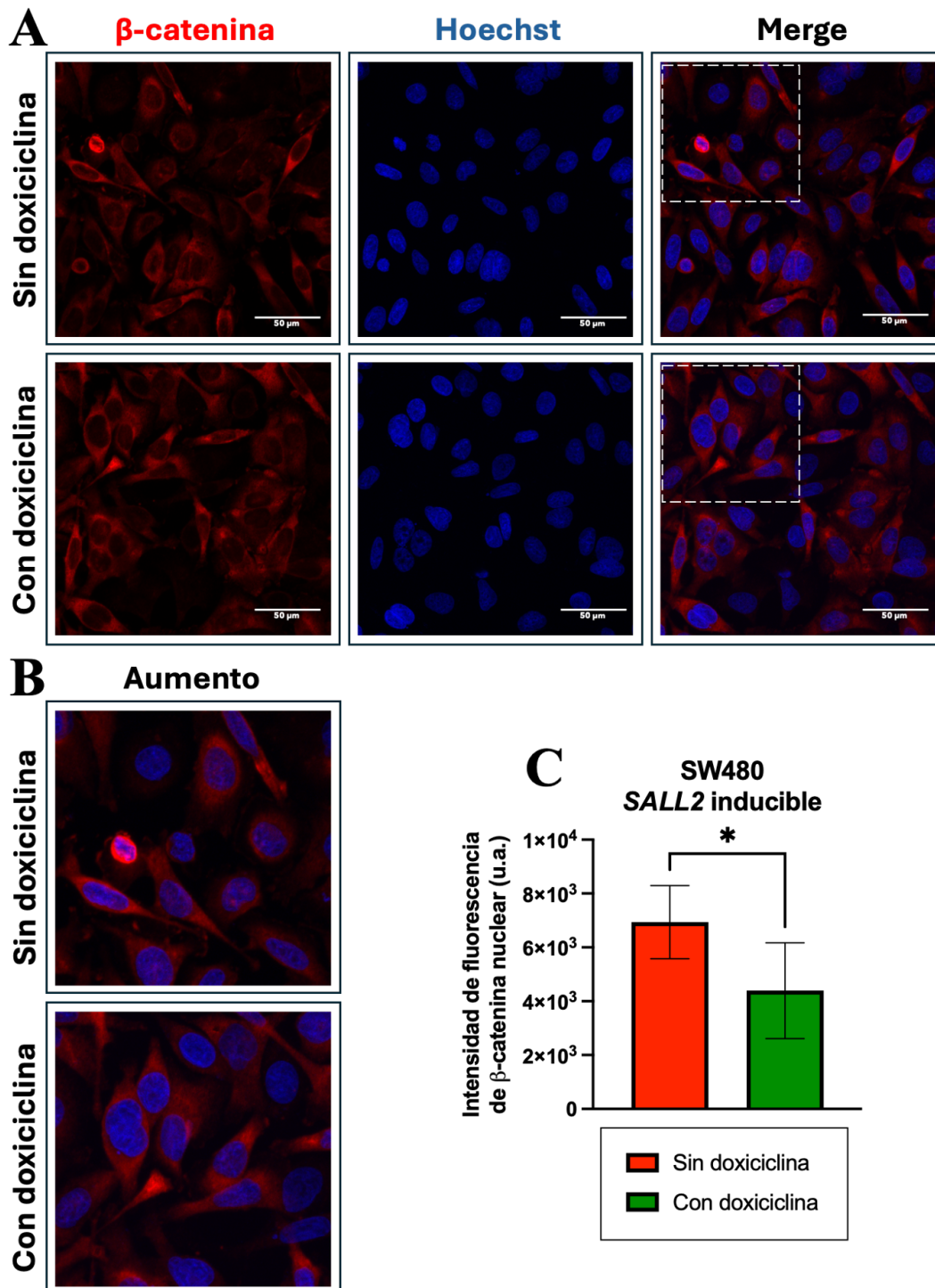


Figura 4.17: La expresión de *SALL2* induce una disminución de la localización nuclear de β -catenina.

Localización de β -catenina en el modelo HT-29 *SALL2* inducible. (A) Imágenes representativas de la distribución de β -catenina intracelular. Para la reexpresión de *SALL2* se utilizó doxiciclina a una concentración de 1 μ g/mL durante 48 horas. En la figura, la región delimitada con línea segmentada está ampliada para cada una de las condiciones. Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 40x en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media \pm DE evaluada dentro de la región nuclear.

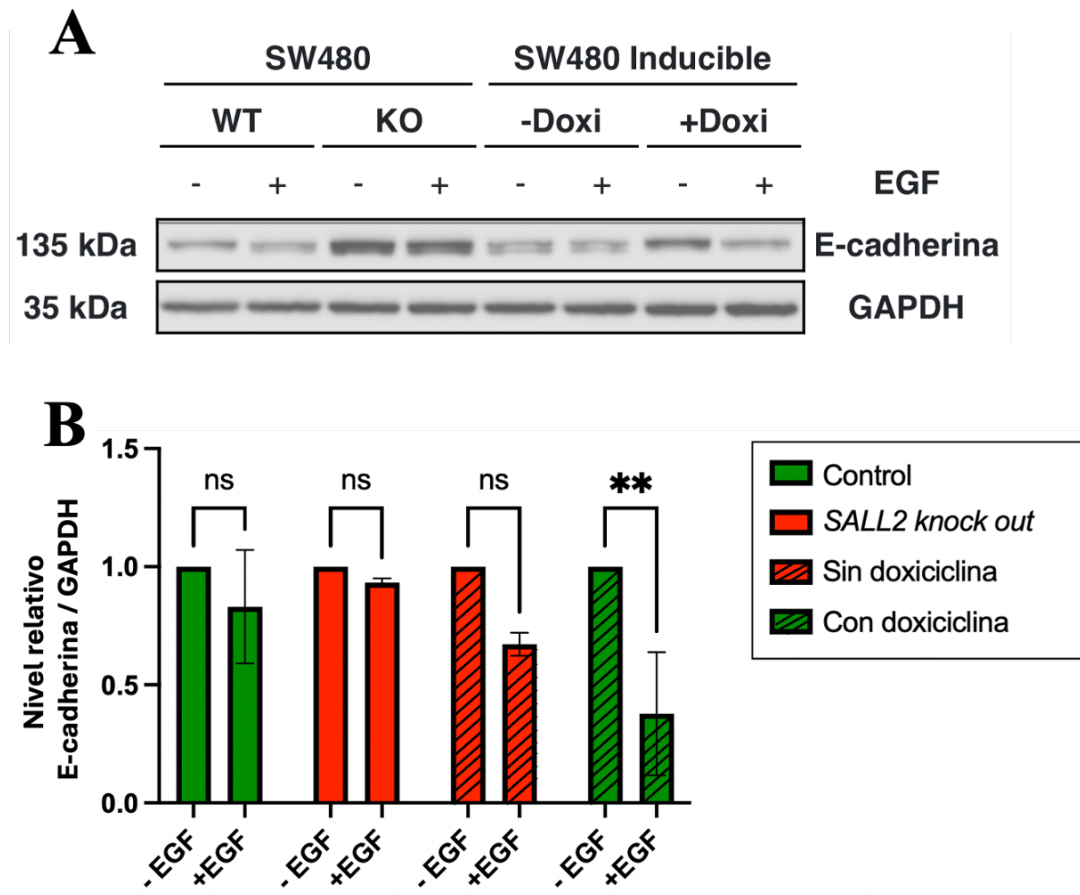


Figura 4.18: La disminución de E-cadherina inducida por EGF requiere la presencia de SALL2

Determinación de los niveles de E-cadherina a diferentes tiempos. (A) Se evaluaron los niveles de E-cadherina en los modelos SW480 con pérdida y ganancia de función de SALL2 luego del tratamiento con EGF (50 ng/mL por 48 horas) mediante western blot. El modelo SALL2 inducible fue tratado con doxyciclina a una concentración de 1 μ g/mL por 48 horas. Se utilizó GAPDH como control de carga. (B) Cuantificación de los niveles de proteína mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Los datos se presentan como la media \pm DE. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t de Student no pareada (valor p: $**p < 0,01$, $n = 3$).

4.1.7. Resumen de los resultados obtenidos en el objetivo específico 1 y la relación biológica que se establece entre ellos

Nuestros hallazgos indican que la pérdida de *SALL2* constituye un evento clave en la progresión del cáncer de colon, favoreciendo la EMT. Este proceso morfogenético está estrechamente vinculado con la proliferación celular desregulada, el aumento de la capacidad migratoria e invasiva y la reorganización del citoesqueleto. En conjunto, estas alteraciones contribuyen a la generación de tumores más agresivos, con una mayor capacidad de adaptación al entorno extracelular y una resistencia aumentada a los agentes quimioterapéuticos convencionales utilizados en el tratamiento del cáncer de colon.

La evidencia experimental obtenida sugiere que la pérdida de *SALL2* no solo amplifica algunas de las características que comúnmente se asocian con aumento de la agresividad, como el aumento de la proliferación y migración celular, sino que también parece modular un programa biológico complejo que induce múltiples cambios fenotípicos en las células tumorales, otorgándoles mayor plasticidad y potencial maligno. En este contexto, la EMT emerge como un eje central, al regular procesos críticos para la diseminación tumoral y la adquisición de fenotipos metastásicos.

Además, nuestros resultados revelan una interacción compleja entre la pérdida de *SALL2* y la regulación de la EMT, subrayando su papel como un factor clave en la modulación del fenotipo celular. Notablemente, se observó que la expresión de E-cadherina no sigue el patrón clásico de represión esperado durante la EMT en ausencia de *SALL2*, lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos o compensatorios independientes de reguladores tradicionales como Snail, como por ejemplo, modificación del estado de metilación del promotor de E-cadherina, factores de transcripción compensatorios que pueden regular la expresión de E-cadherina, entre otros. No obstante, en respuesta al EGF, un inductor clásico de la EMT, la expresión de E-cadherina disminuyó de manera dependiente de *SALL2*, es decir, los niveles de E-cadherina disminuyeron como respuesta al tratamiento con EGF únicamente en el modelo con sobreexpresión de *SALL2*. Asimismo, la sobreexpresión de *SALL2* promovió la localización de E-cadherina en la membrana plasmática, lo que sugiere un posible incremento en la estabilidad de las uniones adherentes, fundamentales para la arquitectura epitelial.

Por otra parte, los datos también evidencian un estado de EMT parcial en ausencia de *SALL2*, caracterizado por la coexistencia del marcador epitelial, E-cadherina, y mesenquimal, N-cadherina. Este fenotipo híbrido se asocia con un aumento en la capacidad migratoria y con características de mayor agresividad tumoral. Además, se identificó una interacción relevante entre *SALL2* y la señalización de β -catenina, donde la sobreexpresión de *SALL2* resultó en una reducción de la localización nuclear de β -catenina, sugiriendo un posible papel regulador sobre la vía de señalización Wnt canónica.

En conjunto, estos hallazgos posicionan a *SALL2* como un regulador crítico en la EMT, modulando el equilibrio entre fenotipos epiteliales y mesenquimales. La relación entre *SALL2* y β -catenina parece ser determinante, dado que la activación de esta señalización favorece el fenotipo mesenquimal asociado a la EMT, impulsando la progresión tumoral. Finalmente, la relación entre *SALL2* y la vía de señalización del EGF podría explicar la regulación observada sobre la expresión y localización intracelular de E-cadherina, favoreciendo en conjunto la malignidad tumoral.

Por lo tanto, es fundamental profundizar en el estudio de los mecanismos mediante los cuales la pérdida de *SALL2* regula directamente la expresión y función de factores

clave en la EMT, como Snail, Slug, Twist1, Twist2, Zeb1 y Zeb2, entre otros. El análisis detallado de estos factores, combinado con el estudio de los cambios en la dinámica del citoesqueleto y las adhesiones célula-célula, permitirá establecer una relación más sólida entre la pérdida de SALL2, la EMT y la progresión del cáncer de colon.

4.2. Objetivo Específico 2

Analizar el rol de *SALL2* en la progresión tumoral y la transición epitelio mesénquima mediante estudios *in vivo* en modelos murinos de cáncer de colon.

4.2.1. Organoides AKP murinos con pérdida de función de *Sall2* recapitulan las características evaluadas en cultivos de células de cáncer de colon humanas

El fenotipo observado anteriormente ante la pérdida de *SALL2* en los modelos celulares nos entrega gran información con respecto al rol que cumple este factor de transcripción en la progresión del cáncer de colon. Sin embargo, sistemas más complejos para el estudio del cáncer, como es el uso de modelos tridimensionales u organoides, validan los resultados ya que recapitulan aun mejor las condiciones fisiopatológicas de un organismo. En este contexto, se generó un modelo con pérdida de función de *SALL2* mediante el sistema CRISPR/Cas9 utilizando dos diferentes sgRNA en organoides de ratón AKP [Vaquero-Siguero et al., 2022], nombrado de esta manera ya que presentan alteraciones en los genes clave que dan origen a un adenocarcinoma de colon, ausencia de la expresión de *Apc*, inducción de la sobreexpresión del oncogen *Kras G12D* y ausencia de la expresión del factor de transcripción *Tp53* como se esquematiza en la **Figura 4.19**.

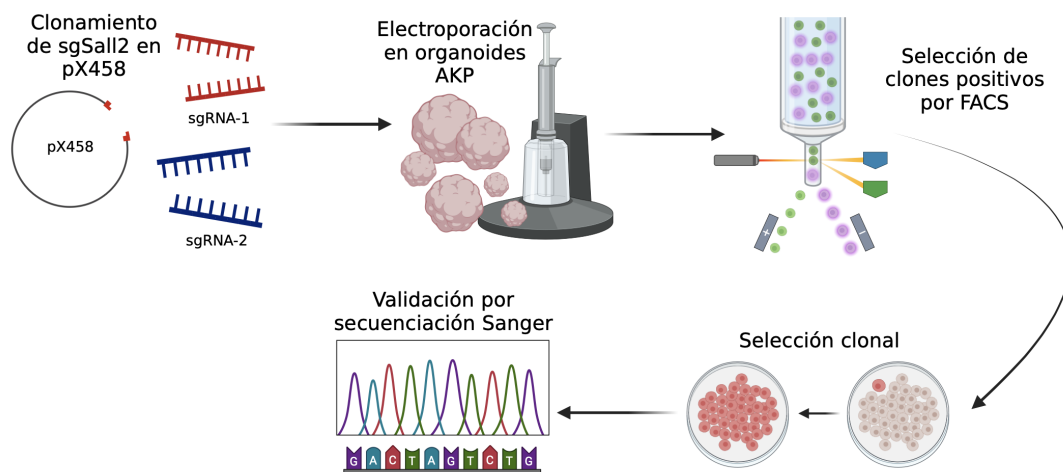


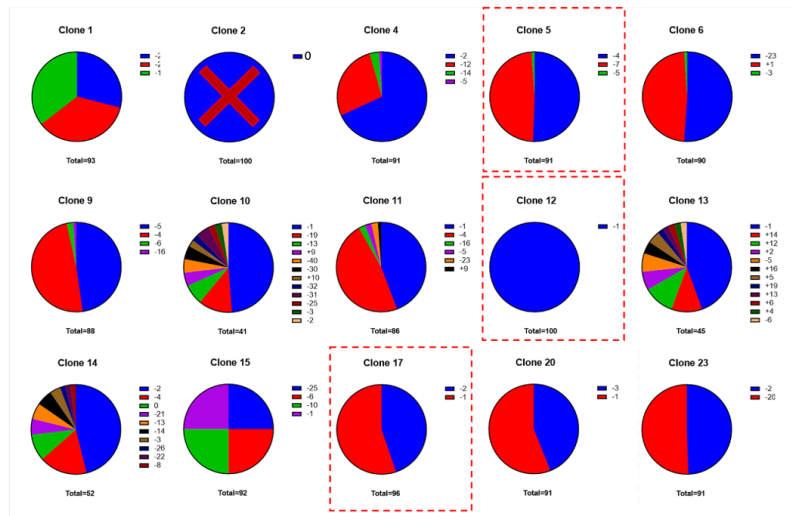
Figura 4.19: Metodología de la generación de organoides AKP *Sall2* KO.

Organoides de ratón AKP en cultivo se disociaron a células únicas y posteriormente fueron electroporados con vectores específicos que contienen sgRNA para el bloqueo de la expresión de *SALL2* mediante el sistema CRISPR/Cas9. Una vez electroporados, se seleccionaron las células positivas mediante un sistema FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) las cuales se sembraron como células individuales para permitir el crecimiento clonal. Luego del crecimiento de los clones, se verificó la edición genómica en cada uno de ellos por medio de secuenciación Sanger para validar el bloqueo de expresión de *Sall2*.

Una vez generados los diferentes clones de organoides AKP *Sall2* KO, se validaron por secuenciación Sanger, obteniéndose una gran diversidad de inserciones y deleciones (*indels*), representadas en la **Figura 4.20** para los clones utilizando sgRNA-1 y sgRNA-2, donde cada gráfico representa un clon específico generado y al costado se enumeran las diferentes contribuciones de edición de la subpoblación clonal. Esto significa, por ejemplo,

si el clon 1 presenta contribuciones +2, -2, -1, las células al momento de realizar la reparación de la ruptura del ADN mediado por el sistema CRISPR/Cas9, generaron en algunas de ellas la inserción de 2 nucleótidos extra o la delección de 2 o 1 nucleótido, respectivamente. Este número diferente en inserciones y delecciones en los clones generados puede producir diferencias a nivel genético, ya que luego del corte mediado por Cas9, el sistema de reparación no homólogo (*Non Homologous End Joining*) actúa de manera estocástica pudiendo tener implicancias funcionales y fenotípicas importantes.

A Organoides AKP *Sall2* knock out - sgRNA-1



B Organoides AKP *Sall2* knock out - sgRNA-2

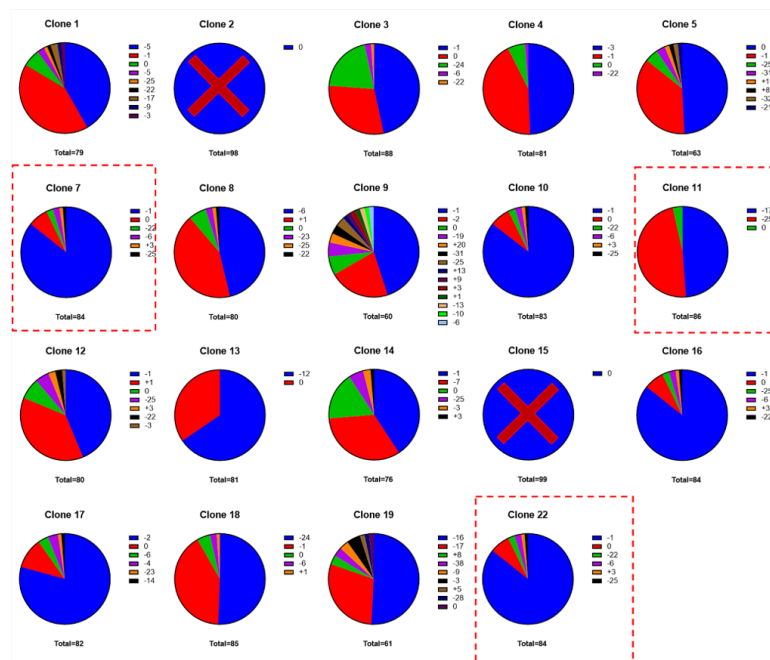


Figura 4.20: Contribución de inserciones y deleciones de los diferentes clones generados a partir de los organoides murinos AKP.

Se analizó por secuenciación Sanger la región particular de edición genómica donde se localiza *Sall2* mediante la herramienta de Inferencia de Ediciones CRISPR (ICE, Inference of CRISPR Edits) de la plataforma en línea Synthego, y se comparó con el ADN genómico parental, en este caso proveniente de organoides AKP. Cada gráfico representa un clon en particular y el porcentaje de contribución de indel en cada uno de ellos. Una **X** roja sobre el gráfico (clon 2 utilizando el sgRNA-1, y clones 2 y 15 utilizando el sgRNA-2) significa que el clon no fue editado y por tanto su secuencia es idéntica a la secuencia parental. Los gráficos enmarcados en líneas segmentadas (Clon 5, 12, 17 y 23) corresponden a los clones que se seleccionaron para análisis posteriores. Al costado de cada gráfico circular se encuentra la leyenda de los colores de cada uno, en donde cada color representa un evento de inserción o deleción en particular.

Así, la selección ideal de clones corresponde a aquellos en los que se observa una contribución total o mayoritaria de una única variante de *indel*, preferentemente con cambios distintos de múltiples de tres nucleótidos. Esta homogeneidad sugiere que toda la población celular presenta la misma edición, lo que es deseable para asegurar uniformidad funcional. En cambio, la presencia de múltiples contribuciones distintas de *indels* puede indicar una población heterogénea, lo que dificulta la interpretación de los efectos del *knockout*. Además, los *indels* de longitud múltiplo de tres podrían provocar un cambio de marco de lectura, permitiendo la producción de una proteína truncada pero funcional.

De los 34 clones analizados, se seleccionaron 4 generados con el sgRNA-1 y 3 con el sgRNA-2, ya que estos presentaban un alto porcentaje de una sola contribución o a lo menos cercano a un 50% compartido entre dos contribuciones diferentes, lo que sugiere o un cambio genómico clonal único o a lo menos un cambio generado en un solo alelo, respectivamente. Los clones seleccionados están marcados con líneas segmentadas en las **Figura 4.20**.

Para determinar con que clones específicos se trabajaría posteriormente, se realizó una evaluación de los niveles de *Sall2* mediante *western blot*. El resultado de la **Figura 4.21** muestra que la disminución de los niveles de proteína de *Sall2* ocurrió en todos los clones analizados. Sin embargo, aquellos que presentan mayor similitud con el control son los clones 5, 23, 7 y 22.



Figura 4.21: Niveles de proteína de los clones de organoides AKP *Sall2 knockout*.

Se realizó un *western blot* con los lisados de proteínas totales extraídos de los diferentes clones de organoides AKP *Sall2 KO* para validar el modelo con pérdida de función de este factor de transcripción. Se agregaron además 3 clones generados con sgRNA no específicos (Non Targeting NT1, NT2 y NT3) y también el clon parental AKP y un control positivo de la pérdida de *Sall2* (KO), que corresponde a un clon previamente validado. Se utilizó como control de carga β -actina.

De los resultados del **objetivo específico 1**, se ha demostrado que la pérdida de *SALL2* está asociada con un aumento en la proliferación celular. En este contexto y con el objetivo de determinar si la pérdida de *SALL2* también afecta el crecimiento en modelos tridimensionales, se cultivaron organoides bajo condiciones estándar, y se analizó el número y el tamaño después de 3 y 5 días en cultivo. Las observaciones se registraron mediante capturas fotográficas directas en la placa de cultivo. La **Figura 4.22 A-B** muestra imágenes representativas del crecimiento de los clones de organoides analizados, evidenciando un crecimiento significativamente mayor en los clones con pérdida de función de *Sall2* en comparación con el control NT3. Estos datos fueron cuantificados utilizando el *software ImageJ*, observándose variaciones en el número de organoides que van desde 27,8% a 216,7% el tercer día y 2,1% a 125,1%, el quinto día. El tamaño de los organoides

indico que el tercer día, la pérdida de *Sall2* indujo un aumento que va desde 2,2 % a 31,5 %, y el quinto día, este aumento varió entre 4,3 % a 80,9 % (**Figura 4.23 A-D**). De manera interesante, el clon 5, a pesar de tener un tamaño menor al control el tercer día, al quinto día presentó una de las mayores diferencias observadas en comparación con el control, lo que sugiere una mayor tasa proliferativa.

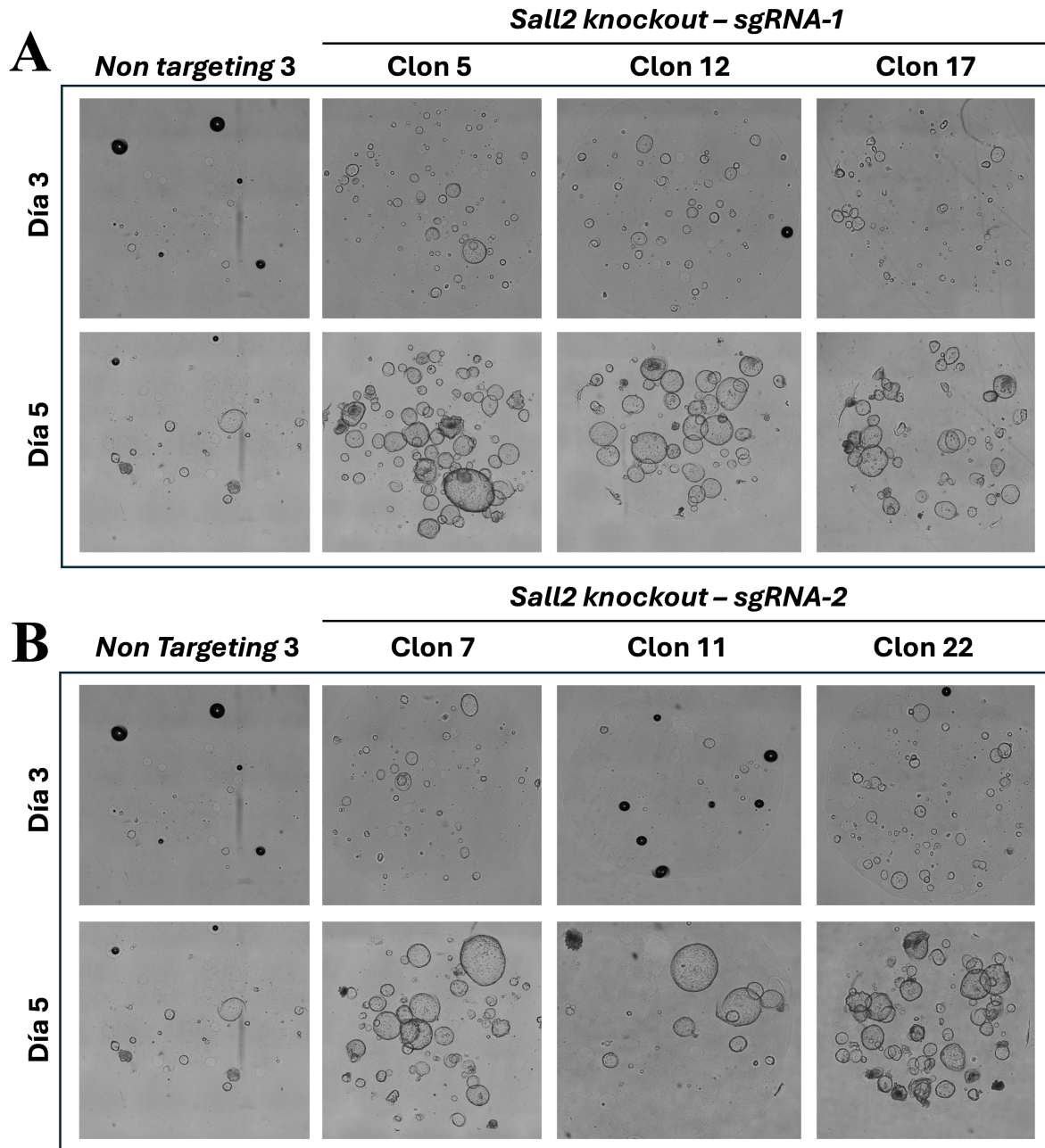


Figura 4.22: Crecimiento de los clones de organoides AKP *Sall2* knockout.

Para evaluar el crecimiento de los organoides en cultivo celular, se fotografiaron las placas correspondientes a los clones 5, 12, 17 y 23 generados con *sgRNA-1*, así como los clones 7, 11 y 22 generados con *sgRNA-2*. Las imágenes fueron capturadas al tercer y quinto día posterior a la siembra utilizando el equipo de imagen en vivo *Omni™* (Axios Biosystems). Como control, se incluyó el clon NT3. Posteriormente, el análisis cuantitativo del crecimiento se realizó empleando el software *ImageJ*.

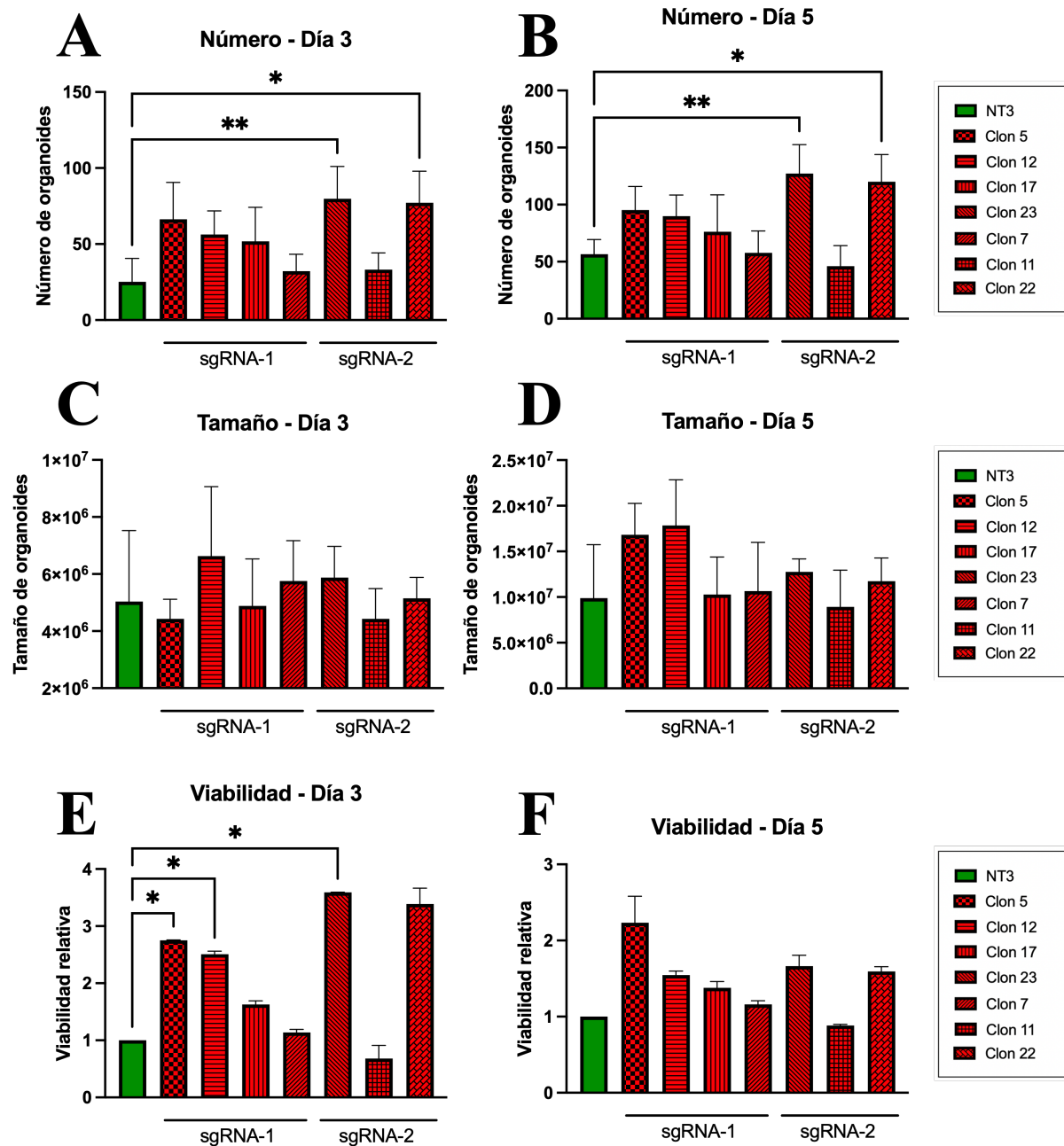


Figura 4.23: Cuantificación del número, tamaño y viabilidad de los clones de organoides AKP *SALL2* KO.

Las imágenes presentadas en la **Figura 4.22** fueron analizadas utilizando el software ImageJ, con el objetivo de cuantificar el número y tamaño de los organoides en cultivo tras la edición genómica mediada por el sistema CRISPR/Cas9. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo Cell Titer Blue™ en los días 3 y 5 posteriores a la siembra de células. Como control experimental se empleó el clon NT3. Los resultados presentados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Además, la viabilidad de los organoides se evaluó en los mismos tiempos utilizando el kit de viabilidad Cell Titer Blue. Este método permite medir de manera indirecta la viabilidad celular, ya que la señal fluorescente generada es proporcional al número de

células vivas y metabólicamente activas presentes en la muestra. La técnica se basa en la conversión enzimática de resazurina en resorufina, un compuesto fluorescente, mediante la actividad de oxidoreductasas intracelulares. Los resultados de este ensayo, observados en la **Figura 4.23 E-F** indican que el tercer día se observó un aumento que fue desde 14 % a 259 %, y el quinto día se registro un aumento desde 16 % a 123 %.

Finalmente, se evaluaron y compararon distintos clones generados con sgRNA-1 y sgRNA-2 en función de características como la expresión proteica determinada por *western blot*, el número y tamaño de los organoides, y la viabilidad celular. A partir de estos análisis, se seleccionaron los clones 5 y 7, correspondientes a sgRNA-1 y sgRNA-2 respectivamente, por presentar las diferencias más destacadas en los parámetros evaluados en comparación con el control. Estos clones fueron escogidos para los experimentos posteriores.

Luego de la selección de clones de organoides *AKP Sall2 knock out*, se realizó nuevamente el ensayo de crecimiento y viabilidad con el objetivo de definir con mayor precisión si la pérdida de *Sall2* promueve un aumento en estas características. En la **Figura 4.24 A**, se observa un mayor número de organoides en los modelos con pérdida de función de *Sall2* en comparación con el control tanto para el día 3 como el día 5.

La cuantificación del número y tamaño de los organoides, junto con la evaluación de la viabilidad celular, se presenta en la **Figura 4.24 B-D**. En ella, se observa una diferencia significativa en el número de organoides entre los modelos *Sall2 KO* y el control en ambos días evaluados, en donde el tercer día se observó un aumento que fue del 1,6 a 2,2 veces sobre el control, y el quinto día varió desde 0,7 a 1,3 veces sobre el control. Además, el tamaño de los organoides muestra un aumento al quinto día ambos modelos *Sall2 knock out* tienen mayor tamaño, observándose una variación entre 63,4 % y 97,4 %.

Es importante destacar que, aunque la viabilidad del clon 7 al día 5 es superior a la del clon 5, el tamaño de los organoides es menor en el primero. Esto sugiere que la tasa proliferativa del clon 7 podría ser mayor que la del clon 5, lo que lleva a que, luego de 5 días en cultivo, los organoides presenten una morfología más irregular. También es posible que ocurra muerte celular en el clon 7, contribuyendo a este efecto y reflejando un equilibrio dinámico entre proliferación y muerte celular.

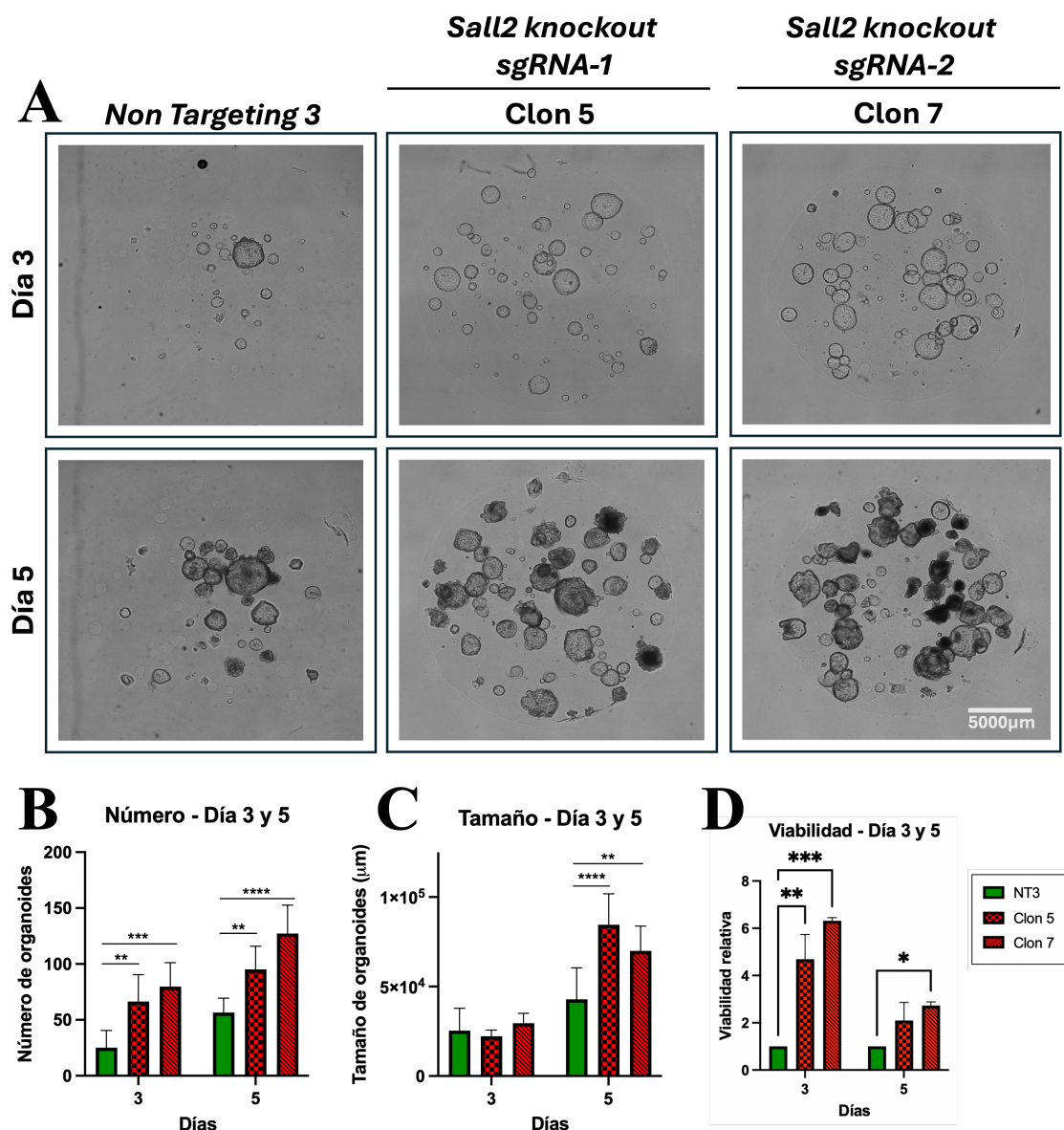


Figura 4.24: La pérdida de *Sall2* en organoides AKP favorece el crecimiento y la viabilidad celular.

*Evaluación del crecimiento de organoides AKP Sall2 knock out. (A) Imágenes representativas del cultivo celular del clon control (no específico) y los clones Sall2 knock out 5 y 7 generados con sgRNA-1 y sgRNA-2, respectivamente. Las imágenes fueron capturadas al tercer y quinto día posterior a la siembra utilizando el equipo de imagen en vivo Omni™ (Axios Biosystems). (B) y (C) Cuantificación utilizando el software ImageJ. (D) Viabilidad celular determinada mediante el ensayo Cell Titer Blue™. Los datos se presentan como la media ± DE. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t de Student no pareada (valor p: **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001, n = 3).*

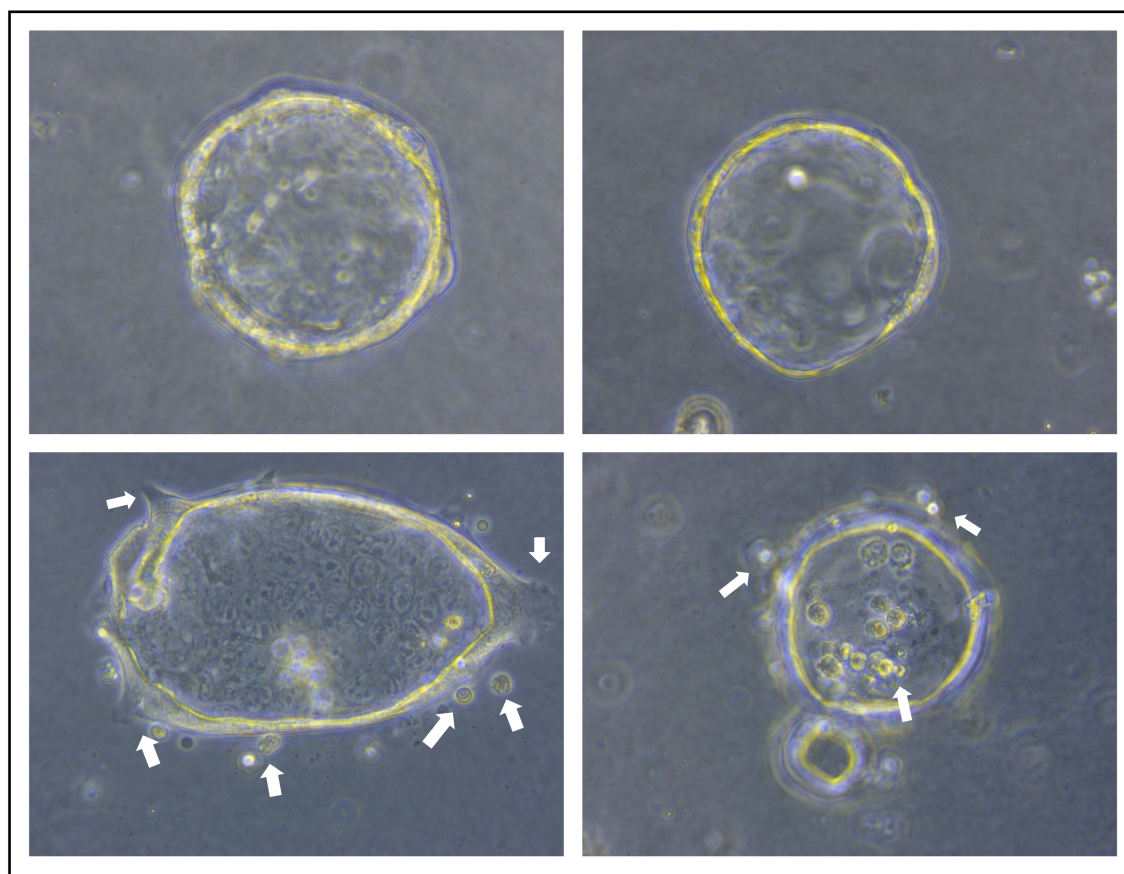


Figura 4.25: **La pérdida de *Sall2* en organoides AKP favorece el desprendimiento celular**

*Observación del crecimiento de los organoides bajo condiciones de cultivo normales. Imágenes superiores corresponden al crecimiento de organoides AKP control y las imágenes inferiores corresponden al crecimiento de organoides AKP con pérdida de función de *Sall2*. Las flechas blancas muestran las zonas donde se observa un desprendimiento celular o una extensión colectiva hacia la placa de cultivo. Fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico Primovert de Zeiss y cámara Axiocam 105 color (software ZEN 3.2) con una magnificación de 40x.*

Además, se sabe que la inducción de la EMT, puede provocar cambios morfológicos significativos en organoides. Entre estos cambios, se encuentran la pérdida progresiva de la forma quística, el aplanamiento del organoide, la formación de protrusiones multicelulares y, finalmente, la generación de grandes láminas celulares cohesivas y hebras extendidas de células que infiltran la matriz extracelular circundante [Flum et al., 2022]. Estos cambios están estrechamente asociados con la plasticidad celular que caracteriza a la EMT y con la capacidad de las células tumorales de invadir y colonizar nuevos entornos.

En este contexto, nuestras observaciones muestran que la pérdida de *Sall2* produce un mayor desprendimiento de células desde los organoides al entorno (**Figura 4.25**) lo que sugiere, en conjunto con los datos anteriores, que la pérdida de *Sall2* en organoides AKP podría estar promoviendo el desprendimiento de células debido a una disminución de E-cadherina en la membrana plasmática. Este efecto facilitaría que las células migren a través de la matriz extracelular y se adhieran a la placa de cultivo, favoreciendo interacciones célula-matriz. Dichas interacciones podrían activar vías de señalización mediadas por integrinas, las cuales son fundamentales para la adhesión, migración y supervivencia

celular en entornos tridimensionales, y se encuentran frecuentemente desreguladas en el cáncer. En la **Figura 4.26** se observa que la formación de láminas celulares bidimensionales producto del desprendimiento de células de organoides es mayor en el modelo con pérdida de función de *Sall2* en comparación con el control a los 3 y 5 días posteriores al sembrado de células.

Además de evaluar el crecimiento y la viabilidad celular en estos modelos, se investigó si la pérdida de *Sall2* en los organoides AKP podría favorecer la proliferación clonal, un fenómeno clave en la progresión tumoral. Para ello, siguiendo un enfoque similar al utilizado en el **objetivo 1**, se sembraron cantidades mínimas de células individuales de organoides AKP bajo condiciones de cultivo estándar. El propósito fue observar el crecimiento clonal de estas células durante un período de dos semanas, permitiendo así determinar el número y tamaño de las colonias formadas en las condiciones con y sin pérdida de *Sall2*.

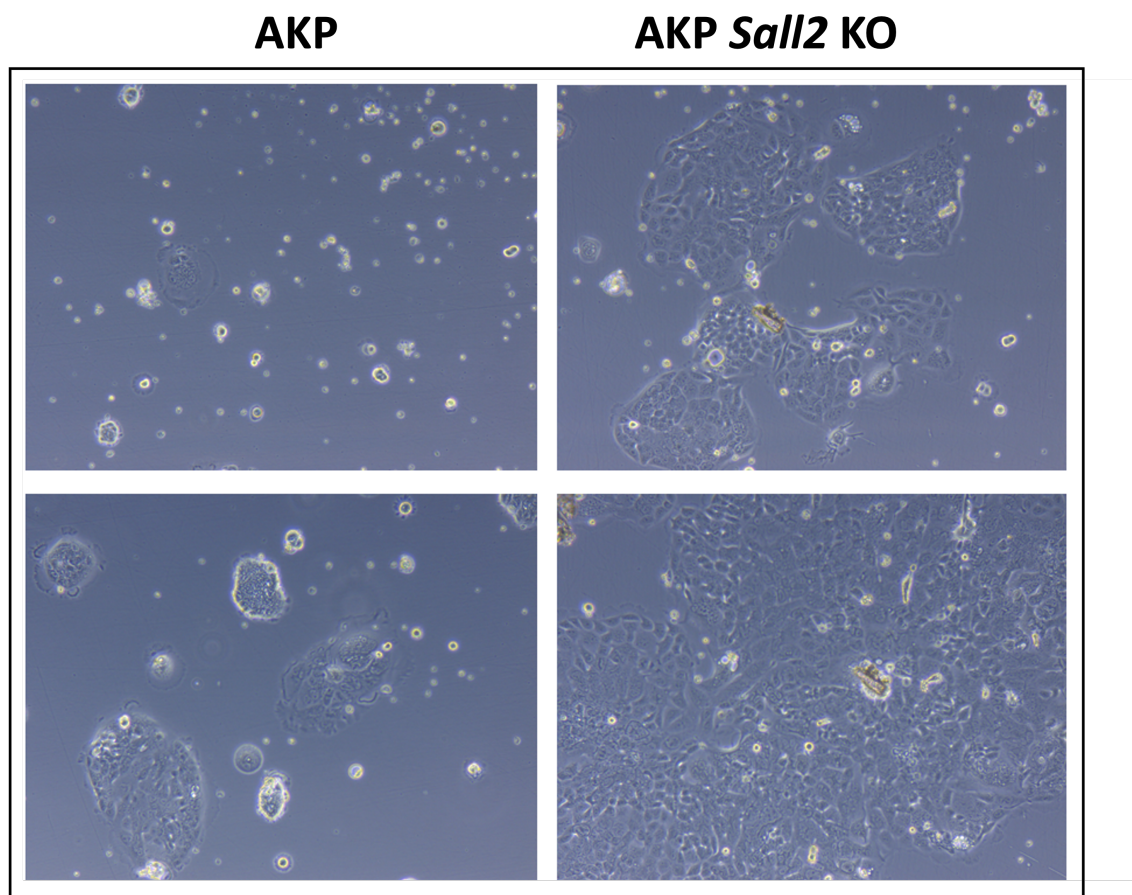


Figura 4.26: La pérdida de *Sall2* en organoides AKP favorece la formación de láminas celulares bidimensionales

Formación de láminas celulares cohesivas a partir de organoides AKP. Imágenes representativas de la formación de láminas celulares bidimensionales a partir del cultivo de organoides bajo condiciones estándar durante 3 y 5 días posteriores al sembrado en la placa. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio óptico Primoverb de Zeiss y cámara Axiocam 105 color (software ZEN 3.2) con una magnificación de 40x.

Los resultados, presentados en la **Figura 4.27**, muestran un aumento notable en el número y tamaño de las colonias formadas en los organoides con pérdida de función de *Sall2*, en comparación con las células control. Al cuantificar estos resultados, se observa

que el número de colonias en los organoides con pérdida de *Sall2* es aproximadamente el doble que en el control, lo que sugiere un efecto significativo de *Sall2* en la regulación de la proliferación celular. Estos hallazgos respaldan los resultados obtenidos anteriormente y corroboran el papel crítico de *Sall2* en la modulación del crecimiento y la proliferación de células tumorales, sugiriendo que su pérdida se asocia con mayor proliferación en el cáncer de colon, lo que favorece la progresión y malignidad tumoral.

Para vincular el efecto fenotípico observado en los cultivos tridimensionales con el programa transcripcional regulado por la EMT, se evaluó la expresión de varios marcadores relacionados con este proceso. En particular, se analizaron los niveles de ARN mensajero de los factores de transcripción *Twist1*, *Snail*, *Zeb1*, y los marcadores *Cdh1*, *Cdh2* y *Vimentina*. La **Figura 4.28** muestra que los organoides AKP con pérdida de *Sall2* presentan una mayor expresión de *Snail* y *Twist1*, mientras que los niveles de *Zeb1* son significativamente más bajos en este modelo. Asimismo, los organoides AKP *Sall2* *knock out* presentan un aumento en la expresión de los marcadores mesenquimales vimentina y N-cadherina, junto con una disminución en la expresión del marcador epitelial E-cadherina.

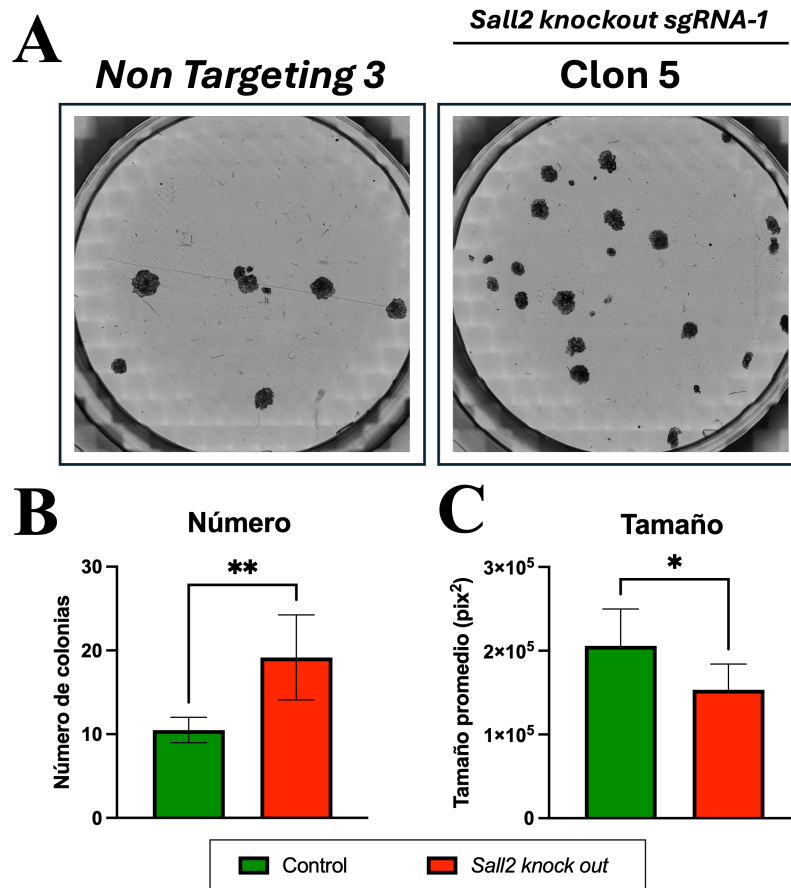


Figura 4.27: La pérdida de *Sall2* en organoides AKP favorece la formación de colonias

*Ensayo de formación de colonias con células de organoides AKP control y Sall2 knock out. (A) Imágenes representativas del crecimiento clonal para el control y el modelo con pérdida de Sall2. (B) y (C) representan la cuantificación del número y tamaño de las colonias, respectivamente, analizadas mediante el software ImageJ. Las fotografías se tomaron con el equipo de imagen Omni™ (Axios Biosystems). Los datos se presentan como la media ± DE. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba t de Student no pareada (valor p: *p < 0,05, **p < 0,01, n = 3).*

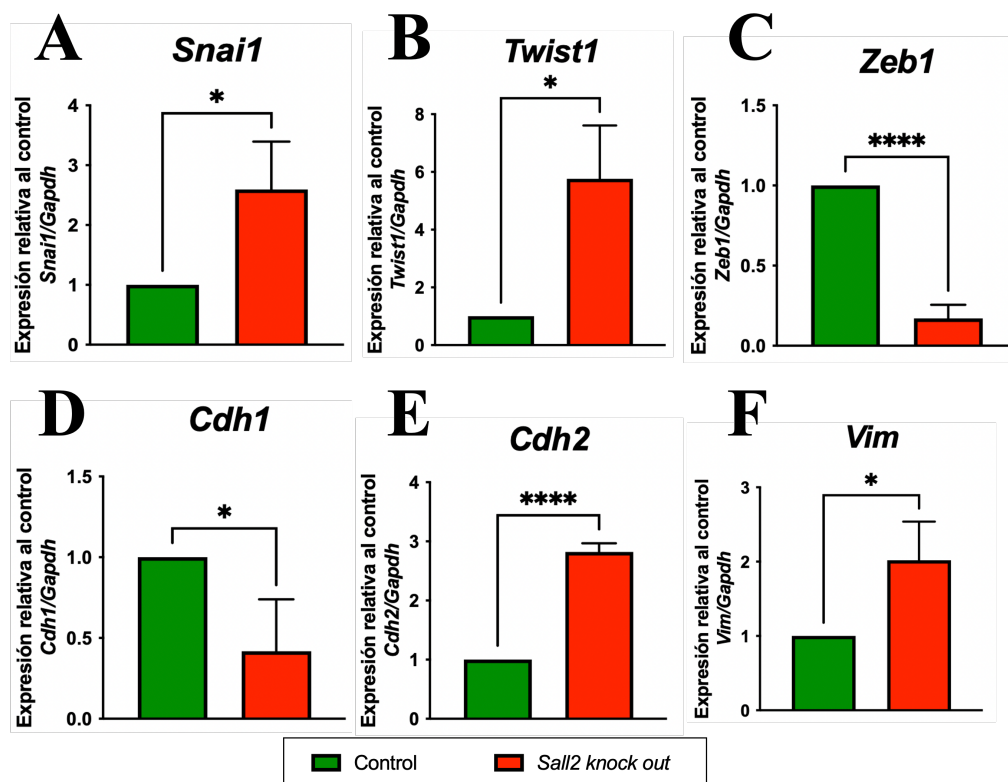


Figura 4.28: La pérdida de *Sall2* induce la expresión de marcadores asociados a la EMT en organoides AKP

Expresión de marcadores asociados a la EMT en organoides AKP. (A) - (F) Expresión relativa de diferentes marcadores asociados a EMT determinada mediante RT-qPCR. Se evaluó la expresión de *Snail* (A), *Twist1* (B), *Zeb1* (C), *Cdh1* (D), *Cdh2* (E) y *Vimentina* (F) y los datos se cuantificaron por el método $\Delta\Delta CT$. La información se presentan como la media \pm DE. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba *t* de Student no pareada (valor *p*: **p* < 0,05, *****p* < 0,0001, *n* = 3).

4.2.2. Tumores generados *in vivo* a partir de organoides AKP *Sall2* KO producen menor sobrevida en ratones

Para evaluar si el comportamiento de los modelos tridimensionales refleja las características observadas *in vivo*, considerando las limitaciones inherentes de los ensayos *in vitro* al no replicar completamente el microambiente fisiopatológico del organismo, se implementó un sistema avanzado de microinyección guiado por colonoscopia. Utilizando ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad, se inyectaron los diferentes modelos generados a partir de los organoides AKP directamente en el epitelio colónico. Este procedimiento se realizó empleando el sistema *ColoView*, que permite una visualización en tiempo real de la mucosa del colon mediante una cámara de alta precisión, garantizando una microinyección controlada y localizada, como se ilustra en la **Figura 4.29**. Los organoides inyectados fueron monitoreados longitudinalmente para evaluar el desarrollo y la progresión de los tumores. Los resultados revelaron que los organoides *Sall2* knock out exhiben un mayor crecimiento en comparación con los *Sall2* wild type. Este efecto resultó en la formación de tumores de mayor tamaño en el grupo con pérdida de *Sall2*, como se muestra en la **Figura 4.30**. Estos hallazgos destacan el papel crucial de *Sall2* como un regulador del crecimiento

tumoral, sugiriendo que su pérdida favorece la progresión y promueve características más agresivas.

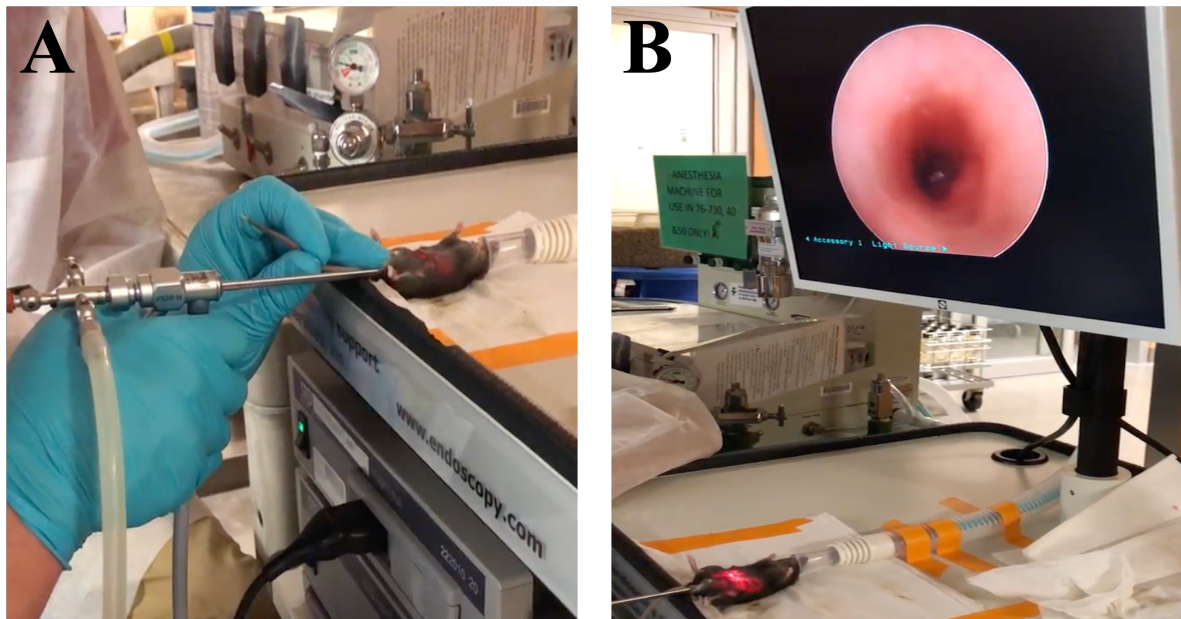


Figura 4.29: Sistema *ColoView* para la realización de microinyección en ratones guiado por colonoscopia

Para realizar las microinyecciones en la mucosa del colon de los ratones, se empleó el sistema ColoView, una plataforma que permite la visualización y el análisis en tiempo real de la mucosa del colon. Esta herramienta facilita la inyección controlada de células o fármacos para el estudio de diversas patologías. (A) Imagen que muestra el procedimiento de microinyección utilizando el scope, una vez que el ratón está anestesiado. (B) Imagen que muestra la visualización del lumen del colon del animal en la pantalla de trabajo.

Para analizar cuantitativamente el impacto de la pérdida de *Sall2* en la progresión del cáncer de colon, se construyó una curva de supervivencia basada en el tiempo transcurrido desde la microinyección intracolónica hasta el punto de eutanasia. En la **Figura 4.31** se observa una diferencia significativa en la supervivencia entre los grupos experimentales. En el grupo experimental con pérdida de *Sall2*, el primer animal requirió eutanasia a los 20 días posteriores a la inyección intracolónica, mientras que en el grupo control, el primer caso en alcanzar este umbral ocurrió aproximadamente 70 días después del procedimiento. La diferencia en los tiempos de supervivencia entre ambos grupos resalta el papel fundamental de *Sall2* como regulador en la progresión del cáncer de colon, ya que su pérdida se relaciona con un crecimiento tumoral acelerado que afecta significativamente la supervivencia de los animales. Estos resultados muestran que *Sall2* no solo es un modulador clave en la progresión tumoral, sino que su ausencia favorece un fenotipo más agresivo, lo que refuerza su relevancia en la regulación de mecanismos asociados al control del crecimiento tumoral y la agresividad del cáncer.

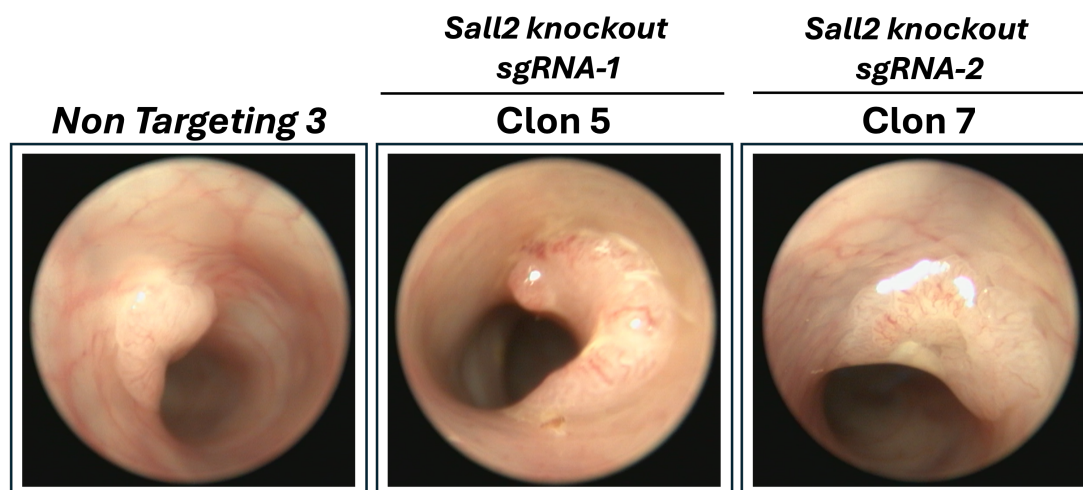


Figura 4.30: La pérdida de *Sall2* favorece el crecimiento tumoral *in vivo*

Evaluación in vivo del crecimiento de tumores en el colon de los ratones. Imágenes representativas del crecimiento tumoral en la mucosa del colon de los ratones inyectados con organoides AKP control y Sall2 knock out, tomadas dos semanas después de la inyección. La evaluación de los tumores se realizó semanalmente para monitorear su desarrollo. En la figura se observa el crecimiento de los tumores en el grupo control y con pérdida de SALL2 (clon 5 sgRNA-1 y clon 7 sgRNA-2). Las imágenes fueron tomadas con una unidad de videoendoscopia portátil (Karl Storz, Tele Pack Vet x Led).

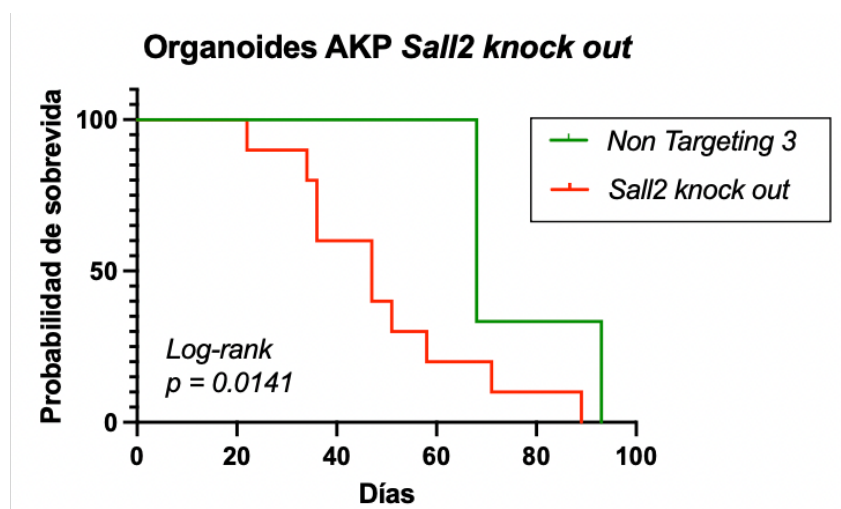


Figura 4.31: Tumores con pérdida de *Sall2* generan menor supervivencia en animales

Efecto del desarrollo tumoral en la supervivencia de ratones. Se registraron los datos de supervivencia al final del experimento tras el crecimiento de tumores en el epitelio del colon de ratones C57BL/6 inyectados con organoides AKP control (Non targeting 3) (n = 6) y Sall2 knock out (n = 10). A partir de estos datos, se construyó una curva de Kaplan-Meier para estimar la supervivencia de ambos grupos. Las diferencias entre las curvas se compararon mediante el test estadístico de Mantel-Cox. La curva correspondiente a Sall2 knock out incluye tanto los tumores generados con sgRNA-1 como los generados con sgRNA-2. La curva Sall2 knockout incluye la suma de datos generados con el clon 5 y el clon 7.

4.2.3. Análisis histológicos de tumores derivados de organoides AKP *Sall2* KO se asocian con mayor malignidad y EMT

Con el objetivo de realizar estudios histológicos que permitan la identificación de características asociadas con la malignidad tumoral en los diferentes modelos experimentales, se analizaron las muestras de tejidos en FFPE de los tumores formados. Se evaluaron los siguientes parámetros a través de tinción con hematoxilina y eosina: 1) permeación linfovascular, que corresponde a la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos y/o los vasos sanguíneos (capilares, vénulas o arteriolas) circundantes; 2) *budding* tumoral, caracterizado por la presencia de pequeñas agrupaciones o células tumorales individuales en el frente invasor o infiltrante del tumor, separadas del componente tumoral principal; 3) grado tumoral, que corresponde a una clasificación histopatológica que evalúa cuán diferenciado está un tumor en comparación con el tejido sano de origen y 4) el número de células tumorales, que se evalúa en función de si representan menos o más del 20% del total de células contadas en las regiones histológicas analizadas. Para el grado tumoral, se considera de grado bajo cuando las células tumorales mantienen características similares a las del tejido original, mientras que en tumores de grado medio o alto, las células presentan una morfología altamente indiferenciada y muestran escasa semejanza con el tejido sano.

La **Figura 4.32** muestra imágenes representativas de los tumores analizados en las cuales se pueden ver algunas de las características evaluadas y la diferencia que existe entre los tumores con pérdida de *Sall2* y el control, como las glándulas atípicas, correspondientes a adenocarcinoma moderadamente diferenciado. Además, la permeación linfovascular, el *budding* tumoral y frente tumoral invasor en túnica muscular propia se muestran de forma clara en la **Figura 4.33 A-C**, respectivamente.

En la **Tabla 4.2** se puede observar un resumen de las características analizadas en los cortes histológicos de los tumores generados en el modelo *in vivo* de cáncer de colon. Esta indica que a pesar que un bajo porcentaje de tumores deficientes de *Sall2* analizados presenta permeación linfovascular, en el control no se detectó ninguna. El análisis del *budding* tumoral no arrojó diferencias entre ambos grupos experimentales, a pesar de que en ambos se observó este fenómeno. Se observó también un menor grado tumoral en aquellos tejidos sin alteración de la expresión de *Sall2*, y un grado moderado o mayor en tumores deficientes de *Sall2*. Toda esta información se asocia con una enfermedad más avanzada, comportamiento más agresivo del tumor y peor desenlace clínico.

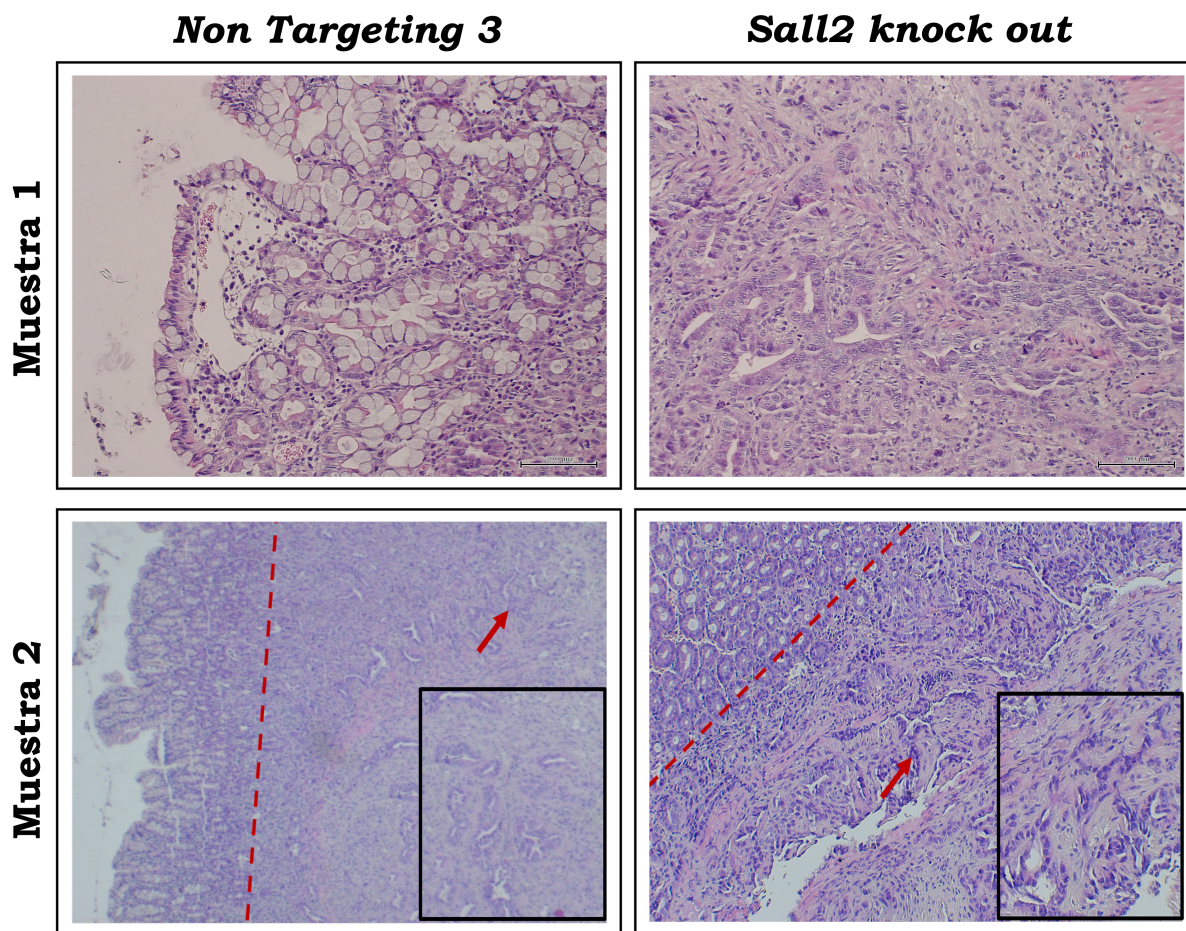


Figura 4.32: Análisis histológico de tumores generados a partir de organoides AKP

Imágenes representativas de inmunohistoquímica con tinción de hematoxilina y eosina en tejidos tumorales *Sall2* wild type (izquierda, *Non Targeting 3*) y *Sall2* knockout (derecha). En las imágenes de la muestra 2, la línea segmentada roja delimita la región no tumoral (izquierda) de la región tumoral (derecha). El cuadro dentro de la región tumoral muestra un área ampliada para destacar diferencias específicas entre ambas. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio óptico a un aumento de 10x.

Tabla 4.2: Características histopatológicas de los tumores analizados

Característica	<i>Sall2</i> control	<i>Sall2</i> knockout
Permeación linfovascular	0,00 %	16,67 %
Budding Tumoral	33,33 %	33,33 %
Grado bajo (altamente diferenciado)	33,33 %	16,67 %
Grado medio/alto (pobrementemente diferenciado)	66,67 %	83,33 %
Células tumorales <20 %	66,67 %	16,67 %
Células tumorales >20 %	33,33 %	83,33 %

Finalmente para vincular los resultados obtenidos en los estudios *in vivo* con la transición epitelio mesénquima y la posible regulación de SALL2 sobre localización de E-cadherina observada en el **objetivo 1**, se analizaron tres marcadores asociados a la

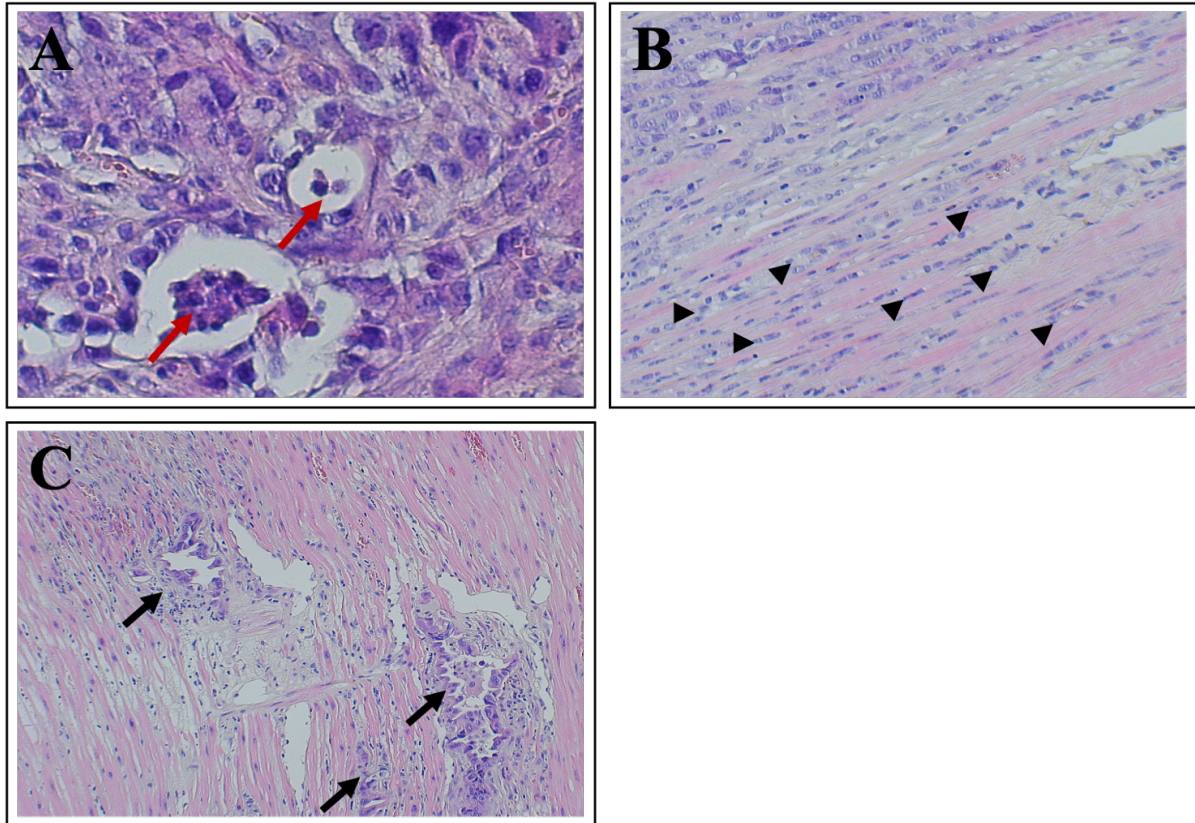


Figura 4.33: Representación de características histopatológicas asociadas a malignidad tumoral

Imágenes representativas de inmunohistoquímica con tinción de hematoxilina y eosina en los tejidos analizados, destacando tres características evaluadas. En (A) , la flecha roja señala un grupo de células tumorales dentro de un vaso sanguíneo, evidenciando permeación linfovascular. En (B), se observa budding tumoral, indicado por las cabezas de flecha negra que señala células tumorales en las capas internas del estroma. En (C) se observa el frente tumoral invasor en la túnica muscular propia. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio óptico a un aumento de 10x.

EMT. La **Figura 4.34** muestra la distribución del marcador de proliferación Ki-67, utilizado con este propósito ya que se expresa exclusivamente en células que están en ciclo celular activo, es decir, aquellas que están en las fases G1, S, G2 y mitosis. Aquí podemos observar que la marca de Ki-67 es de un 50 % en los tumores deficientes de *Sall2* en comparación con el control, donde los resultados entregan un valor del 33,3%. Al evaluar la distribución de β -catenina, se observa que los tumores con pérdida de expresión de *Sall2* presentan β -catenina principalmente localizada en el núcleo celular, cuyo valor es de un 83,3 % del total de células analizadas. Esto es diferente a lo que se observa en los tumores control, en los cuales el porcentaje de β -catenina nuclear es menor en comparación con su distribución en membrana, registrándose porcentajes de 33,3 % contra un 66,6 %, respectivamente. Esto sugiere que la pérdida de *Sall2* *in vivo* favorece la activación de la vía Wnt canónica. Además, en muchas de las células, la expresión es mucho mayor, pudiendo ser visualizado por la fuerte intensidad del marcaje. Por último, se evaluó la distribución de E-cadherina y se observan diferencias interesantes en los tejidos analizados. En el control, similar a lo observado para β -catenina, E-cadherina se encuentra principalmente asociado a la membrana celular. El resumen de la cuantificación de estos resultados se encuentra

en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3: **Inmunohistoquímica en tejidos tumorales de cáncer de colon**

Marcador	<i>SALL2</i> WT	<i>SALL2</i> KO
Ki67 >40 %	33,33 %	50,00 %
β -catenina nuclear >40 %	33,33 %	83,33 %
β -catenina membrana >40 %	66,67 %	50,00 %
Intensidad de β -catenina moderado/intenso	100,00 %	100,00 %
E-cadherina membrana	100,00 %	50,00 %
E-cadherina membrana/citoplasma	0,00 %	50,00 %

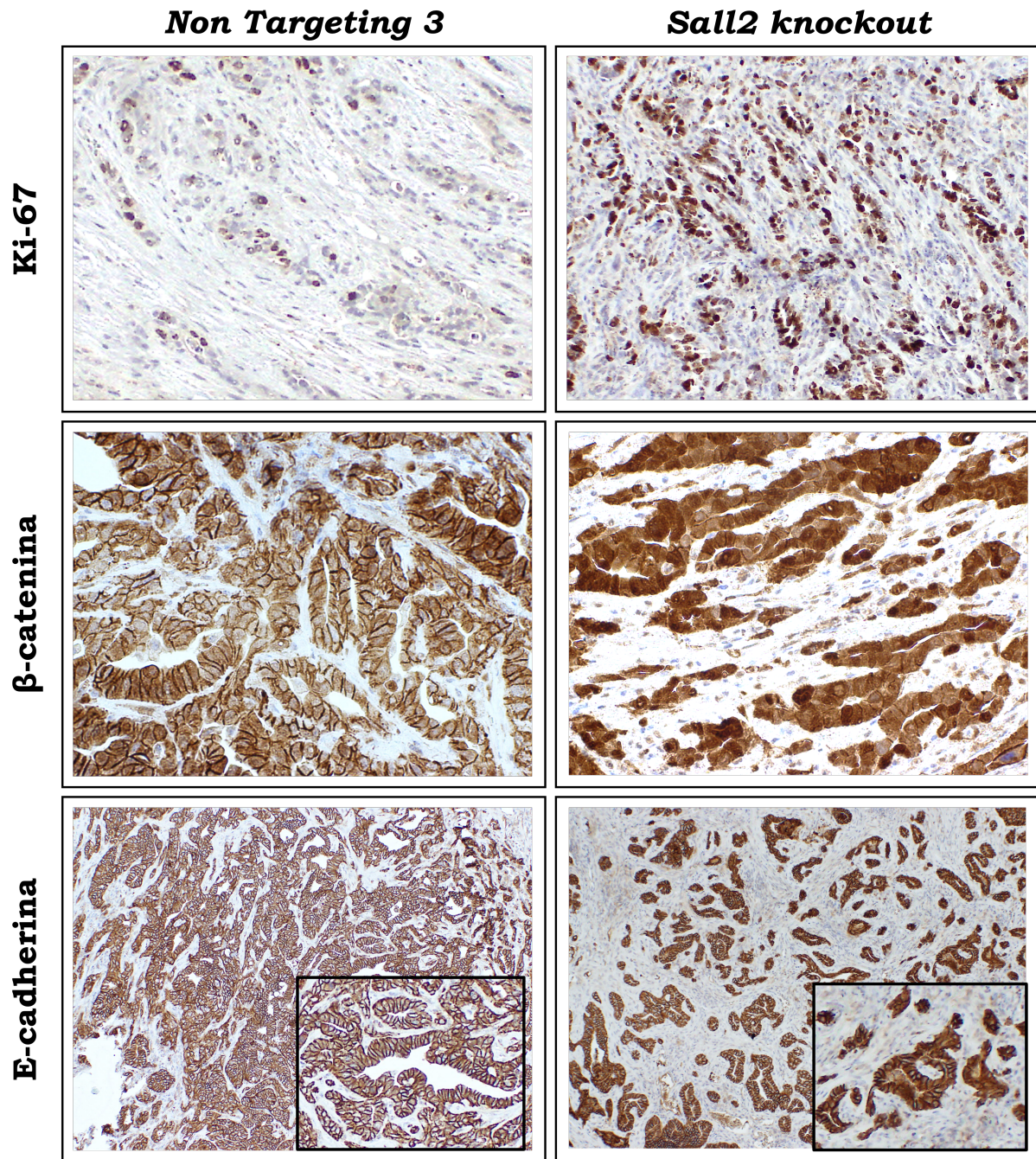


Figura 4.34: Análisis de marcadores específicos de proliferación y adhesión celular en tejidos tumorales

Imágenes representativas de inmunohistoquímica que muestran la expresión de Ki-67 (fila superior), β -catenina (fila intermedia) y E-cadherina (fila inferior) en tejidos tumorales de ratones Sall2 wild type (izquierda, Non targeting 3) y Sall2 knockout (derecha). La tinción para Ki-67 indica un aumento de la proliferación celular en Sall2 knockout. β -catenina muestra una distribución predominantemente en membrana en Sall2 wild type y una distribución más difusa en Sall2 knockout. E-cadherina exhibe un patrón de tinción principalmente en membrana en Sall2 wild type, mientras que en Sall2 knockout se observa tanto en membrana como citoplasmática, consistente con un fenotipo más invasivo. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio óptico a magnificación de 10x para Ki-67 y E-cadherina, y 20x para β -catenina.

4.2.4. Resumen de los resultados obtenidos en el objetivo específico 2 y la relación biológica que se establece entre ellos

En este objetivo, se estableció un modelo tridimensional utilizando organoides AKP con pérdida de función de *Sall2*, empleando la tecnología CRISPR/Cas9. La validación genética, proteica y transcripcional de los clones generados confirmó la efectividad de la edición, seleccionándose los clones más representativos para estudios posteriores. Los resultados demostraron que la pérdida de *Sall2* induce un crecimiento acelerado y descontrolado de los organoides, asociado con una mayor viabilidad celular, tanto en cultivos tridimensionales como en modelos *in vivo*. Estos hallazgos sugieren un papel crítico de *Sall2* como un regulador negativo de la proliferación tumoral en el cáncer de colon. De manera complementaria, se identificaron cambios significativos en la localización subcelular de β -catenina y E-cadherina en los modelos deficientes de *Sall2*, pasando de una localización predominantemente de membrana a una citoplasmática y nuclear. Este fenómeno, junto con el aumento en la expresión de marcadores mesenquimales como vimentina y N-cadherina, así como de factores transcripcionales como *Twist1* y *Snail*, sugiere que la pérdida de *Sall2* promueve un fenotipo asociado a la transición epitelio-mesénquima (EMT). No obstante, los niveles reducidos de *Zeb1* indican que este proceso es parcial y podría estar regulado por otros factores. Los estudios *in vivo* confirmaron los resultados observados *in vitro*, evidenciando tumores de mayor tamaño y agresividad en los modelos *Sall2 KO*, junto con una reducción significativa en la supervivencia de los animales experimentales. La progresión tumoral estuvo acompañada de características histopatológicas relacionadas con mayor malignidad, como la permeación linfovascular y el grado tumoral moderado o alto. En conjunto, estos resultados establecen que *Sall2* desempeña un papel central en la regulación de la progresión tumoral, actuando como un modulador clave de la proliferación, adhesión celular y transición epitelio-mesénquima. Su pérdida no solo favorece el crecimiento tumoral descontrolado, sino que también promueve un microambiente propicio para la invasión y migración celular, destacándolo como un posible objetivo terapéutico en el cáncer de colon.

Capítulo 5

Discusión

El cáncer colorrectal es una patología altamente heterogénea y multifactorial, donde la desregulación de múltiples vías de señalización promueve la progresión tumoral, la invasión, la diseminación metastásica y la adquisición de características asociadas a mayor agresividad y resistencia terapéutica, en parte mediante la activación de la transición epitelio mesénquima.

En este estudio, identificamos a SALL2 como un regulador clave del crecimiento tumoral y la EMT en el cáncer de colon. Nuestros resultados demuestran que la pérdida de SALL2 induce un aumento en la proliferación celular y en la capacidad migratoria, con reorganización del citoesqueleto de actina y adhesiones focales, y la recuperación de la expresión de *SALL2* en modelos inducibles, revierte este fenotipo. Además, se observó resistencia a quimioterapéuticos como 5-FU y FOLFOX. Estas características correlacionaron con cambios en la expresión de marcadores de la EMT, pero con un perfil no convencional, sugiriendo que la pérdida de *SALL2* se asocia a una EMT parcial o híbrida. Finalmente, los resultados obtenidos *in vitro* se validaron en modelos de organoides de CCR de ratón, y se observó *in vivo* un aumento tanto en el crecimiento tumoral como en la infiltración del frente invasor hacia capas más profundas, incluyendo la túnica muscular propia, lo que correlacionó con una disminución en la sobrevida de los ratones inyectados con organoides deficientes en *Sall2*.

Estos hallazgos posicionan a SALL2 como un nuevo supresor tumoral en el cáncer de colon, regulando múltiples procesos que contribuyen a la progresión y agresividad tumoral. A continuación, se analizarán estos hallazgos en el contexto de la literatura científica actual, explorando posibles mecanismos moleculares involucrados y se discutirán sus implicaciones biológicas y clínicas.

5.1. La proliferación celular en el cáncer colorrectal y el posible rol de SALL2

El crecimiento celular descontrolado es una de las principales características del cáncer, impulsado por alteraciones genéticas y epigenéticas en factores que regulan el ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular. En este contexto, múltiples estudios han identificado la inactivación de genes supresores de tumores clásicos, como *TP53*, *APC* y *SMAD4* o la hiperactivación de oncogenes como *KRAS*, como eventos clave en la progresión del cáncer colorrectal. Sin embargo, la contribución de otros factores de transcripción claves, como SALL2, aún no ha sido completamente dilucidada en este tipo de cáncer.

Nuestros resultados coinciden con estudios previos y demuestran que la pérdida de *SALL2* promueve un aumento en la proliferación celular en modelos de cáncer de colon. Específicamente, en la línea celular SW480 *SALL2 knockout*, observamos una tasa de proliferación significativamente mayor en comparación con el control. En contraste, también se observó un aumento en la tasa proliferativa en los modelos inducibles generados con las líneas celulares SW620 y HT-29. Lo interesante de estos resultados es que, a pesar de que SW620 y HT-29 presentan contextos genéticos distintos al de SW480, se mantiene la misma tendencia en cuanto al rol de *SALL2* en la regulación de la proliferación celular. Esto sugiere que el efecto antiproliferativo de *SALL2* no depende de un trasfondo genético específico, sino que podría representar un mecanismo conservado en distintos modelos de cáncer colorrectal, ya que las líneas celulares utilizadas tienen diferencias en las mutaciones que presentan, como es el caso de la alteración de BRAF únicamente en HT-29, o KRAS en SW480 y SW620. Por otra parte, p53 se encuentra con menor grado de mutaciones en HT-29 en comparación con las otras dos líneas celulares. Además, nuestros experimentos con organoides AKP revelaron que la pérdida de *Sall2* favorece el crecimiento de estos organoides en condiciones estándar de cultivo, como lo evidencian tanto el número como el tamaño de los mismos. Al inyectar estos organoides en el epitelio del colon de ratones, se observó un marcado incremento de la proliferación celular, evaluado mediante el análisis histopatológico utilizando la tinción con el marcador Ki-67, en los tumores generados, en comparación con el control. Estos datos sugieren que *SALL2* podría actuar como un supresor del crecimiento tumoral en cáncer de colon, desempeñando un papel clave en la regulación del ciclo celular y la homeostasis epitelial intestinal. La observación de un aumento en la proliferación tras la pérdida de *SALL2* es sugerente con la idea de que este factor actúa como un supresor tumoral al regular la expresión de p21. Sería relevante en estudios futuros evaluar directamente si la pérdida de *SALL2* en CCR reduce los niveles de p21 a nivel transcripcional y proteico.

Además, *SALL2* podría tener una relación con otras vías clave en el control del ciclo celular. Por ejemplo, se ha descrito que p53 es capaz de reprimir la expresión de *SALL2* bajo estrés genotóxico [Escobar et al., 2015]. p53 se ha denominado el guardián del genoma al ser capaz de inducir un arresto del ciclo celular mediado, entre otras, por p21. En este contexto, sería contradictorio que p53 regule negativamente a *SALL2*, ya que, como se mencionó anteriormente, *SALL2* favorece la expresión de p21. Sin embargo, considerando los mecanismos temporales y contextuales, se puede integrar la información como una regulación dinámica de p21. En una fase inicial, p53 se activaría e induciría directamente a p21 para detener el ciclo celular en G1/S, permitiendo la reparación del ADN. Simultáneamente, p53 reprimiría a *SALL2* al unirse a su promotor P2, reduciendo sus niveles de ARN y proteína. Este doble efecto garantizaría que la señal en favor del arresto de p21 domine, mientras se suprime temporalmente la vía proapoptótica asociada a *SALL2*. En la fase tardía, *SALL2* se reexpresaría de manera independiente de p53, activando su propio programa transcripcional, por una parte induciría la expresión de p21, potenciando el arresto celular, y por otra, activaría a BAX y NOXA [Escobar et al., 2015], proteínas proapoptóticas esenciales para la muerte celular. Esta segunda oleada de p21 dependiente de *SALL2* colaboraría con BAX y NOXA para promover apoptosis si el daño es irreparable. Dado que p53 está mutado en más del 50% de los casos de cáncer de colon, la pérdida de represión de *SALL2* mediada por p53 podría explicar su papel como supresor tumoral.

Una de las vías clásicas involucradas en la proliferación celular y la iniciación del cáncer de colon es la vía de señalización Wnt/ β -catenina. La activación aberrante de esta

vía, principalmente a través de mutaciones en *APC*, *CTNNB1* o *AXIN2*, conduce a la acumulación nuclear de β -catenina, favoreciendo la transcripción de genes promotores del crecimiento [Zhao et al., 2022]. En este contexto, el aumento de la proliferación observado en ausencia de *SALL2*, podría también explicarse como resultado de la regulación de *SALL2* sobre la vía Wnt/ β -catenina. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que *SALL2* regula de manera positiva la expresión de *AXIN2*, un inhibidor clave de la vía Wnt/ β -catenina. En el mismo estudio, se ha observado un aumento en los niveles de β -catenina nuclear tanto en modelos celulares deficientes en *SALL2* como en tejidos tumorales de pacientes con baja o nula expresión de este factor de transcripción [Quiroz, 2023]. Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados *in vitro* e *in vivo*, donde evidenciamos un aumento de la localización nuclear de β -catenina en células SW480 *SALL2 knockout*, así como en análisis histopatológicos de tumores derivados de organoides AKP deficientes en *Sall2* inyectados en colon de ratones. Además de lo observado, sería relevante investigar si *SALL2* puede interactuar directamente con β -catenina en contextos donde sus niveles no estén completamente reducidos, y si dicha interacción ejerce un efecto inhibitorio sobre la vía Wnt/ β -catenina. A modo de comparación, se ha reportado que *SALL4*, otro miembro de esta familia de factores de transcripción, se une directamente a β -catenina y activa dicha vía [Ma et al., 2006]. En este sentido, resultaría interesante evaluar si en modelos con alta expresión de *SALL2*, como las células COLO320, o en pacientes con CCR que presentan altos niveles de esta proteína, podría producirse una interacción análoga pero con un efecto supresor tumoral. Bajo esta hipótesis, la ausencia de *SALL2* permitiría una mayor activación de la vía por parte de β -catenina, promoviendo la expresión de genes asociados a proliferación tumoral y favoreciendo así la progresión del CCR.

Al analizar con mayor detalle los resultados de proliferación en células SW480, observamos una leve diferencia entre el modelo knockout de *SALL2* y la condición sin doxyciclina del modelo inducible. Es importante destacar que ambas condiciones carecen de expresión de *SALL2*, ya que el modelo inducible fue generado a partir del *knockout* mediante la introducción de un sistema de expresión regulado por doxyciclina. Por lo tanto, en ausencia de doxyciclina, este modelo inducible debiese comportarse de manera equivalente al *knockout*. Sin embargo, detectamos una tasa proliferativa ligeramente mayor en la condición sin doxyciclina del modelo inducible en comparación con el *knockout*. Esto podría ser una consecuencia del tratamiento experimental al cual se someten ambos modelos durante su generación. En primer lugar, se realiza la edición genómica a través del sistema CRISPR/Cas9 para generar el modelo *SALL2 knockout* y a partir de este, se genera el modelo inducible utilizando transducción lentiviral, que permite la incorporación del cassette de expresión inducida de *SALL2* en el genoma celular. Este último es un proceso aleatorio mediado por la integrasa viral codificada por el gen *pol* del vector psPAX2, y no sigue una secuencia predeterminada en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, existen algunos factores que pueden influir en la ubicación de la integración, como la disponibilidad de sitios de integración en el ADN de la célula, la fase del ciclo celular en la que se encuentra la célula, y la presencia de secuencias o estructuras específicas que favorecen la integración [Ciuffi, 2008]. En este caso particular de las células SW480 *SALL2 knockout*, al no estar sincronizadas, es probable que la variabilidad de regiones de inserción al ponerse en contacto con las partículas lentivirales genere pequeños cambios a nivel global, que aunque no generen cambios significativos a nivel fenotípico, si se traducen como pequeñas variaciones a nivel general, al comparar ambos modelos. Así, aunque ambas condiciones no expresan *SALL2*, diferencias sutiles en el contexto genético podrían

explicar la variación observada.

Además, es interesante mencionar que las sutiles diferencias en los resultados obtenidos, por ejemplo, dentro de un mismo modelo, pueden ser el resultado de la heterogeneidad que existe dentro de una línea celular. En este contexto, se ha descrito que las células SW480 tienen dos morfologías en cultivo, una alargada y otra redondeada, las cuales coexisten sin afectarse entre ellas. Sin embargo, no está claro bajo qué condiciones se favorece un fenotipo sobre el otro [Palmieri et al., 2015]. Más aún, se han descrito tres subpoblaciones distintas en cultivos de SW480, lo que podría influenciar la respuesta frente a ciertos estímulos. Estas subpoblaciones son las células madres tumorales residentes (rCSCs, *resident cancer stem cells*), las células madres tumorales migratorias (mCSCs, *migratory cancer stem cells*) y las células de alta recaída (HRCs, *high-relapse cells*). Todas ellas varían en los niveles de activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y perfiles de expresión genéticos que reflejan sus propiedades funcionales y características de pluripotencia [Verhagen et al., 2024].

5.2. La migración celular como eje central de la progresión tumoral en el cáncer colorrectal

La migración celular es un proceso fundamental en la progresión del cáncer, siendo uno de los primeros pasos en la cascada metastásica, lo que permite que las células tumorales escapen del tumor primario e invadan tejidos circundantes o entren en la circulación sanguínea y linfática. Como se mencionó antes, este fenómeno está estrechamente relacionado con la EMT [Fares et al., 2020].

En este contexto, nuestros hallazgos indican que la pérdida de *SALL2* favorece un fenotipo migratorio en modelos celulares de cáncer de colon. Específicamente, los ensayos de migración en *transwell* demostraron que las células SW480 *SALL2 knockout* presentan un aumento significativo en la migración celular, en comparación con el control. Este efecto fue revertido en modelos inducibles, donde la restauración de la expresión de *SALL2* redujo la capacidad migratoria en SW480 y HT-29. Si bien la migración fue mayor en las células SW480, este efecto también se observó en la línea HT-29. La diferencia observada entre ambos modelos se debe probablemente al fenotipo que presentan ambas líneas celulares. Se ha descrito que SW480 tiene un fenotipo mucho más mesenquimal y migratorio, en cambio HT-29 se asocia con un fenotipo principalmente epitelial, y por tanto, la capacidad de migración de éstas es menor [Druzhkova et al., 2020].

De manera interesante, un estudio que comparó 68 líneas celulares de CCR describió que entre la línea celular SW480 y HT-29 existen diferencias relacionadas a su sensibilidad en ambientes ácidos, así como también asociados a su tasa metabólica [Michl et al., 2024]. Si bien HT-29 tiene una mayor resistencia al pH ácido en comparación con SW480, esta última tiene una mayor tasa metabólica. Lo interesante de este descubrimiento es que en cultivo celular, aquellas células con mayor resistencia al pH ácido, tienden a permanecer más unidas entre ellas, mostrando niveles mucho más bajos de filamentos de actina en comparación con aquellas que son más sensibles, quienes crecen de manera más independiente. Esto podría ser una explicación al hecho de observar mayor migración de células tumorales en SW480, en donde esta independencia de crecimiento en cultivo celular y los altos niveles de filamentos de actina podrían favorecer el proceso migratorio.

Además, nuestros resultados enfocados en la cantidad de adhesiones focales presentes en las células en ausencia y presencia de *SALL2* apoyan la idea de que la pérdida de *SALL2*

favorece la migración. Así, observamos una disminución significativa en el número de *clusters* de vinculina por célula en condiciones estándares de cultivo en el modelo SW480 *SALL2* inducible. Estos *clusters* o agregados son indicativos de AFs activas y maduras, ya que estas se organizan en agregados para dar mayor estabilidad, facilitando la transmisión de fuerzas mecánicas entre actina y la matriz extracelular [Thievessen et al., 2015].

Por otra parte, vinculina regula la direccionalidad y polaridad celular al estabilizar las AFs, activando la quinasa FAK. Estudios previos, han demostrado que la activación de FAK es fundamental para la adhesión y migración celular en cáncer, favoreciendo la formación de adhesiones focales y la interacción con la matriz extracelular [Schlaepfer et al., 2024]. En este contexto, nuestros resultados muestran que la pérdida de *SALL2* induce un aumento en la fosforilación de FAK en el residuo Y397, lo que sugiere una mayor activación de esta vía en ausencia de *SALL2*, y además se correlaciona con el aumento de vinculina mencionado anteriormente. Esta relación entre *SALL2* y FAK en la migración celular es un aspecto clave que requiere más estudios. Una posibilidad es que *SALL2* actúe como un regulador transcripcional de FAK, modulando directamente su expresión, o que interactúe con vías de señalización río arriba que controlan su activación. Es posible además que la regulación de la activación de FAK por *SALL2* ocurra de manera indirecta, ya que FAK detecta las fuerzas generadas por la contracción de fibras de actina durante la migración, que en parte, podría estar siendo inducida por *SALL2*. Así, estas fuerzas inducen cambios conformacionales en FAK, liberando su dominio autoinhibido y permitiendo su autofosforilación en el residuo Y397.

Además, la migración celular está intrínsecamente ligada a la reorganización del citoesqueleto de actina, que permite la formación de estructuras dinámicas como lamelipodios y filopodios, esenciales para el movimiento celular dirigido [Izdebska et al., 2020]. En este contexto, nuestros ensayos con faloidina, una molécula que se une a los filamentos de actina, mostraron que la pérdida de *SALL2* en células SW480 induce un aumento en la intensidad de fluorescencia y la aparición de una morfología celular más alargada, sugiriendo una mayor capacidad migratoria. Si bien no se evaluó directamente la formación de filopodios y lamelipodios, el aumento en la migración celular podría estar asociado a una mayor dinámica del citoesqueleto de actina. Esto se sugiere por el incremento en la señal de fluorescencia de faloidina, lo que indica un aumento de fibras de actina y, por ende, una posible mayor formación de estructuras protrusivas como filopodios y lamelipodios, tal como cabría esperar en células con mayor capacidad migratoria. Este hallazgo es consistente con la idea de que *SALL2* podría estar modulando la dinámica del citoesqueleto, probablemente a través de la regulación de proteínas asociadas a la migración, como las GTPasas pequeñas y/o proteínas de adhesión focal (FAK, paxilina, vinculina). De manera similar aunque en un contexto diferente, se ha determinado que *SALL2* regula la diferenciación de células madre neurales mediante la expresión de *Tuba1a* (α -tubulina), esencial para la dinámica del citoesqueleto durante la neurogénesis [Xiong et al., 2024]. Así, se pone en evidencia el rol de *SALL2* en la reorganización del citoesqueleto, probablemente a través de la regulación de diferentes proteínas que permiten la reestructuración de sus componentes, permitiendo la activación de diversos procesos celulares como la migración y la diferenciación.

Si nos enfocamos en la morfología nuclear, esta también está en línea con los resultados asociados a la migración celular, ya que se ha descrito que la circularidad y el tamaño del núcleo en una célula está estrechamente relacionado con la morfología celular general, dada por la organización del citoesqueleto de actina, y esta, a su vez, con la motilidad celular [Chen et al., 2015]. Las células que migran más tienen núcleos más deformables y

alargados, especialmente en microambientes restrictivos. Esto se debe a que la plasticidad nuclear es crítica para sortear espacios estrechos. Por ejemplo, la acumulación de Rac1 en el núcleo altera la actina nuclear, permitiendo deformaciones que favorecen la invasión y la migración tumoral [Colón-Bolea et al., 2020]. De esta manera, el hecho que SALL2 regule el proceso de migración en modelos de cáncer de colon sugiere un rol clave de este factor de transcripción en la regulación de la migración, posiblemente a través de mecanismos que favorecen la reorganización del citoesqueleto.

Dado que la EMT está asociada con la migración celular en cáncer, es probable que la pérdida de SALL2 module este proceso mediante la regulación de genes y vías de señalización involucradas en la EMT. Así, nuestros resultados muestran que la pérdida de SALL2 en los modelos bidimensionales *in vitro*, induce un perfil atípico de EMT, caracterizado por un aumento simultáneo en la expresión de E-cadherina y N-cadherina, lo que sugiere un estado de EMT parcial o híbrido, asociado con mayor agresividad tumoral y plasticidad celular, lo que explicaría el aumento en la migración celular sin una pérdida completa de E-cadherina. En este contexto, la expresión tanto de E-cadherina como de N-cadherina podría favorecer la motilidad celular colectiva, favoreciendo la formación de uniones célula-célula más flexibles, dinámicas y transitorias. Además, observamos que la pérdida de *SALL2/Sall2* correlaciona con una distribución citoplasmática de E-cadherina, observada en modelos bidimensionales y tumores AKP, un fenómeno que ha sido descrito en células en transición mesenquimal como un mecanismo para modular la adhesión celular y permitir una migración más eficiente [Xu et al., 2015]. Este resultado es interesante ya que pone de manifiesto el rol de E-cadherina en favor de la progresión tumoral, el cual ha sido descrito en diferentes tipos de cáncer durante los últimos años. Además, los resultados muestran que esta relación entre la pérdida de SALL2 y el aumento de E-cadherina es sostenida en el tiempo, por lo menos durante las 96 horas analizadas. Estos resultados también se confirmaron mediante análisis histopatológicos en experimentos *in vivo*, donde se observó que, en tumores con pérdida de SALL2, E-cadherina no solo se localiza en la membrana, sino que además presenta una acumulación aumentada en el citoplasma. Por otra parte, en los modelos de pérdida de *SALL2* en SW480 no se observaron cambios en el marcador mesenquimal vimentina, proteína de los filamentos intermedios que se caracteriza por aumentar en células migratorias y mesenquimales, y que proporciona elasticidad y un fuerte soporte mecánico a las células con alta capacidad migratoria [Wang et al., 2021]. De manera interesante, la posible inconsistencia que se observa entre E-cadherina y Snail, un conocido represor de E-cadherina podría deberse principalmente a la compleja regulación de la EMT, la cual no está basada únicamente en algunos factores de transcripción, sino que se asocia con una gran cantidad de vías de señalización y reguladores celulares que son quienes favorecen el fenotipo observado [Migault et al., 2022]. Además, a pesar de que los niveles de Snail estén aumentados, estos no son suficientes para reprimir la expresión de E-cadherina. Aun así, se ha reportado que una elevada expresión de Snail constituye un evento clave en el incremento del *budding* tumoral, la invasión linfovascular y la metástasis en adenocarcinoma de colon, lo cual se asocia con un pronóstico desfavorable para los pacientes [Hutasoit et al., 2024]. En este contexto, nuestros hallazgos son consistentes con dichos antecedentes, ya que la pérdida de *SALL2*, que promueve la sobreexpresión de Snail, conlleva *in vivo* a un aumento de la permeación linfovascular y de la invasión del frente tumoral hacia la túnica muscular propia. Estas alteraciones se tradujeron en una disminución de la supervivencia en los modelos animales portadores de tumores deficientes en *SALL2*. Es interesante destacar que Snail es un factor de transcripción cuya expresión se incrementa como consecuencia de la activación

de la vía de señalización TGF- β , la cual, como se mencionó en los antecedentes de esta investigación, podría estar involucrada en la regulación de la expresión de *SALL2*. En este mismo contexto, no sería improbable que *SALL2*, a su vez, regule negativamente la vía de señalización TGF- β , estableciendo así un posible bucle de retroalimentación negativa que podría formar parte de los mecanismos de regulación subyacentes a la correlación observada.

Otra evidencia, asociada a nuestros resultados, que refuerza el rol de *SALL2* en la EMT, es el cambio en los niveles de integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$. Se ha descrito que existe un balance entre estas dos integrinas en cáncer, en donde integrina $\beta 1$ reduce la tasa de metástasis en células tumorales y además, reprime a $\beta 3$, quien promueve la EMT y la muerte mediada por integrinas, como es el caso de la anoikis, lo que favorece la cascada metastásica [Pan et al., 2018]. Esto se debe principalmente a que integrina $\beta 1$, durante la migración celular, tiene una mayor dinámica con su sustrato, lo que induce señales intracelulares de antiproliferación y muerte. Sin embargo, integrina $\beta 3$, tiende a favorecer la señalización mediada por TGF- β , favoreciendo la EMT [Liu et al., 2023]. En nuestros resultados se observa el mismo comportamiento en los niveles de estas integrinas en el modelo de pérdida de *SALL2*. Aquí, la pérdida de la expresión de *SALL2* favorece un aumento de integrina *beta3* y la disminución de *beta1*, lo que va en línea con los resultados anteriores.

A nivel mecanístico, existen diferentes vías que podrían estar cumpliendo un rol importante para regular la migración a través de *SALL2*. Por ejemplo, la vía de señalización Wnt/ β -catenina, además de estar regulando la proliferación celular como se mencionó anteriormente, regula la expresión de genes clave involucrados en la reorganización del citoesqueleto y la adhesión celular [Zhao et al., 2022]. Al observar en nuestros resultados que β -catenina presenta una localización principalmente nuclear en ausencia de *SALL2*, sugiere que a través de la activación de esta vía se produzca una mayor activación transcripcional de genes que favorecen la migración y además están asociados con la EMT, como los factores de transcripción Snail y Twist. Además de la vía Wnt/ β -catenina, diversos estudios han vinculado a *SALL2* con la regulación de vías de señalización donde participa Akt. Se ha descrito en cáncer de ovario que la pérdida de *SALL2* favorece la activación de la vía PI3K/Akt mediante la fosforilación de Akt, con lo cual es capaz de regular proteínas asociadas a la migración e invasión celular como MMP9 [Miao et al., 2017]. Por otra parte, en cáncer de mama, el silenciamiento de *SALL2* induce una disminución de la expresión de PTEN y la activación de la señalización Akt/mTOR [Ye et al., 2019]. Además, Akt activado aumenta la contractilidad y la tracción celular a través de Rho GTPasas pequeñas y proteínas asociadas como ROCK. Además, Akt fosforila a GSK3 β , inhibiendo su actividad y regulando a β -catenina [Leiphrahpam and Are, 2024]. De manera interesante, se ha descrito en un contexto no patológico utilizando células MEF *Sall2 knockout* immortalizadas, que la migración celular disminuye de manera significativa en comparación con el modelo control [Riffo et al., 2022]. Esta evidencia sugiere un rol contexto dependiente de *SALL2* sobre la migración celular, observándose un rol positivo en modelos embrionarios no patológicos, y un rol negativo en modelos de cáncer. Por último, como los resultados indican que *SALL2* regula la activación de FAK, se ha descrito que FAK una vez fosforilado en el residuo Y397 activa PI3K mediante interacción con la quinasas SRC, generando PIP3 y activando AKT [Rangaswami et al., 2012]. Esta activación a través de FAK podría ser uno de los posibles mecanismos que favorecen la reorganización del citoesqueleto y el aumento de la migración celular mediado por *SALL2*.

5.3. SALL2 y la resistencia a quimioterapéuticos en CRC

A pesar de los avances en los tratamientos para el cáncer de colon, la resistencia a la quimioterapia sigue siendo un obstáculo crítico en la terapia oncológica. El régimen de quimioterapia estándar para el cáncer de colon avanzado incluye 5-fluorouracilo, un antimetabolito que interfiere con la síntesis de ADN y ARN, así como combinaciones con oxaliplatino y ácido folínico en el esquema FOLFOX. Sin embargo, muchos pacientes desarrollan resistencia a estos tratamientos, lo que reduce la eficacia terapéutica y contribuye a la recurrencia tumoral.

En este contexto, nuestros hallazgos sugieren que SALL2 podría desempeñar un papel clave en la modulación de la sensibilidad a la quimioterapia en cáncer de colon. Específicamente, observamos que la pérdida de SALL2 en células SW480 confiere mayor resistencia a 5-FU y FOLFOX, aumentando la viabilidad celular en comparación con células control. Este efecto fue revertido en modelos inducibles, donde la restauración de SALL2 favoreció la sensibilidad a la quimioterapia. Considerando los resultados previos de proliferación, donde se observó que la pérdida de *SALL2* favorece el crecimiento celular, es posible que el mayor porcentaje de viabilidad observado tras el tratamiento con 5-FU en células deficientes en *SALL2* se deba, en parte, a la mayor cantidad de células presentes al inicio del ensayo. Para controlar este efecto y obtener una comparación más precisa del impacto del tratamiento, los resultados de viabilidad luego de aplicar 5-FU o FOLFOX fueron normalizados según los niveles de proliferación medidos a las 24 horas. Así, los resultados sugieren que 5-FU, que actúa principalmente sobre las células que están en división como un antimetabolito, tiene mayor eficacia cuando las células expresan *SALL2*. Estos resultados en conjunto apoyan la idea de que SALL2 estaría cumpliendo un rol importante también en la resistencia a quimioterapéuticos.

El tratamiento con 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 5-FU produjo un cambio significativo en los modelos analizados con pérdida y ganancia de función únicamente a 24 horas posteriores al tratamiento. En general, se esperaría también ver un efecto a más largo plazo, ya que el proceso de división celular aproximado de una célula ocurre en 24 horas. Sin embargo, en el caso de las células SW480, que presentan una alta inestabilidad de microsátélites y cromosómica, se ha descrito que su tiempo de duplicación puede partir desde 20 horas en adelante, lo que al cabo de un día de tratamiento, sería posible ver el efecto citostático y/o citotóxico, mediado principalmente por la detención del ciclo celular en fase S y por la apoptosis inducida por el daño irreparable al ADN y ARN, respectivamente.

De manera particular, el 5-FU es un análogo de pirimidina que inhibe la timidilato sintasa, bloqueando la síntesis de timidina y generando daño en el ADN y ARN de las células tumorales, producto de la alteración del pool de nucleótidos durante la síntesis de estas macromoléculas. Sin embargo, la resistencia a 5-FU puede surgir por varios mecanismos, incluyendo la sobreexpresión de timidilato sintasa, reduciendo la eficacia del fármaco, el aumento en la actividad de dihidropirimidina deshidrogenasa, que metaboliza y desactiva 5-FU y la activación de vías de reparación de ADN, permitiendo la recuperación de células dañadas [Longley et al., 2003]. Se ha descrito que el aumento de estas enzimas está regulado, en parte, por la acción de diversos miRNA que también regulan la activación de la EMT [Escalante et al., 2021]. Nuestros resultados sugieren que la pérdida de SALL2, a través de la regulación de la EMT, podría estar modulando alguna de estas vías que favorecen la resistencia a 5-FU. En este contexto, sería interesante investigar si la pérdida de SALL2 en CRC se correlaciona con niveles elevados de timidilato sintasa,

dihidropirimidina deshidrogenasa o de los miRNAs involucrados en la regulación tanto de la EMT como la resistencia terapéutica, lo que explicaría el aumento en la viabilidad celular tras la exposición a 5-FU.

Por otra parte, el tratamiento con FOLFOX, a pesar de inducir mayores efectos hematológicos como la disminución de neutrófilos y neuropatías periféricas, favorece la tasa de supervivencia libre de enfermedad (DFS, *Disease Free Survival*). En este régimen, la leucovorina se utiliza para potenciar el efecto del 5-FU, ya que mejora la estabilidad y eficacia de la unión del metabolito activo del 5-FU (FdUMP) al complejo timidilato sintasa. Esto aumenta la inhibición de esta enzima, lo que impide la síntesis de timidina, un componente esencial del ADN, y amplifica la citotoxicidad del 5-FU sobre las células tumorales. Por otro lado, el oxaliplatino se utiliza como agente alquilante que induce daño directo al ADN mediante la formación de enlaces covalente cruzados (aductos de ADN) impidiendo la replicación y transcripción del ADN, lo que finalmente lleva a la muerte celular programada o apoptosis. En general, la leucovorina no reporta mayor resistencia por sí sola. Por el contrario, se han descrito mecanismos de resistencia a FOLFOX asociado principalmente al oxaliplatino, ya que este activa la vía de señalización cGAS/STING, que detecta ADN citosólico favoreciendo el aumento de PD-L1 en células tumorales, lo que permite la evasión inmune, inhibiendo la activación de linfocitos T [Liang et al., 2024]. Así, se hace interesante como proyección futura definir los mecanismos de resistencia a estos quimioterapéuticos y analizar la expresión de *SALL2* en muestras de pacientes con cáncer de colon tratados con 5-FU y FOLFOX, con el objetivo de correlacionar sus niveles con la respuesta clínica. Cabe mencionar además que en el tratamiento con FOLFOX la concentración de 5-FU utilizada fue mucho más baja que cuando se utilizó la droga de manera independiente. En este sentido, la disminución de la concentración de 5-FU también es algo que se ha establecido tanto en clínica como en ensayos experimentales a nivel de laboratorio, ya que la combinación con otras drogas requiere un balance de concentraciones para que el tratamiento sea lo suficientemente adecuado como para afectar a las células tumorales sin tener un gran efecto negativo sobre el resto del sistema sano [Shin et al., 2005].

Es interesante, además, destacar que nuestros resultados son consistentes con observaciones previas de resistencia a quimioterapéuticos en otros contextos celulares. Por ejemplo, se ha reportado que la toxicidad de doxorrubicina, un fármaco ampliamente utilizado en terapia oncológica, es menor en células MEF deficientes en *Sall2* en comparación con las células control, observándose una mayor viabilidad y resistencia a la muerte celular tras exposición prolongada a doxorrubicina [Escobar et al., 2015]. A pesar de que estas células no corresponden a un modelo de cáncer, puede darnos un indicativo de que la pérdida de *SALL2* afecta la respuesta al tratamiento en contextos que van más allá del fisiopatológico. De manera similar, el inhibidor de la proteína quinasa CK2, silmitasertib, empleado como agente adyuvante y terapéutico en distintos tipos de cáncer, mostró una mayor efectividad en modelos SW480 *SALL2 wild type* y en organoides AKP *Sall2 wild type*, en comparación con sus contrapartes deficientes en este factor de transcripción [Hermosilla et al., 2024]. En cáncer de mama se ha descrito por diferentes autores que el silenciamiento de *SALL2* por hipermetilación del promotor induce resistencia a la terapia con tamoxifeno [Ye et al., 2019] y con cisplatino [Li et al., 2024b]. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la idea de que la ausencia de *SALL2*, en diversos contextos celulares, promueve una mayor resistencia a terapias antitumorales.

En el contexto de esta investigación, la EMT se presenta como uno de los mecanismos implicados en la resistencia a 5-FU y FOLFOX, en concordancia con estudios previos que

han descrito la participación de factores de transcripción como Snail, ZEB1 y Twist en la regulación de genes asociados a la quimiorresistencia, incluyendo el aumento en la expresión de transportadores de la familia ABC, como *ABCB1* y *ABCC1*, responsables de la expulsión de fármacos desde el interior celular [Kim et al., 2015, Sousa-Squiavinato et al., 2022]. En línea con estos antecedentes, nuestros resultados muestran que el aumento de estos factores de transcripción, inducido por la pérdida de *SALL2*, se asocia también con una mayor resistencia a la terapia. Asimismo, observamos que la expresión conjunta de estos factores, junto con otros marcadores analizados, favorece un fenotipo EMT parcial, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura, donde este estado híbrido ha sido vinculado con una mayor resistencia a fármacos debido a su elevada plasticidad celular, en contraste con una EMT completa [Pastorino et al., 2024]. En este sentido, sería relevante evaluar en futuros estudios si la pérdida de *SALL2* impacta directamente en la regulación de transportadores ABC en cáncer colorrectal, lo que podría contribuir a explicar los mecanismos que subyacen al aumento observado en la resistencia a 5-FU y FOLFOX.

Por otra parte, la conexión entre la EMT y la resistencia a quimioterapéuticos no está dada únicamente por la expresión de transportadores ABC mediada por factores de transcripción asociados a la EMT, sino que además existen mecanismos como la evasión de la apoptosis en donde se reprimen proteínas proapoptóticas y se activan vías de supervivencia. En este contexto, la pérdida de *SALL2* a través de la regulación de BAX y NOXA, además de la conexión con la vía PI3K/Akt [Long et al., 2022], descrita en otros contextos, podría favorecer mecanismos de evasión de apoptosis y con esto aumentar la resistencia al tratamiento clásico para el cáncer de colon.

Otra vía también importante en el contexto de resistencia a terapias en CCR es la vía Wnt/ β -catenina. En particular, su activación aberrante favorece la expresión de genes antiapoptóticos, como *BCL2* y survivina, induce la proliferación descontrolada, reduciendo la efectividad de los quimioterapéuticos y contribuye a la expansión de células madre tumorales, las cuales son altamente resistentes a fármacos convencionales [Radu et al., 2024]. Nuestros estudios muestran que la pérdida de *SALL2* induce la traslocación nuclear de β -catenina, lo que sugiere una mayor activación de la vía Wnt y por consiguiente una mayor expresión de genes antiapoptóticos.

5.4. Validación en modelos tridimensionales e *in vivo*: impacto de la pérdida de *SALL2* en la progresión tumoral

Si bien los estudios en líneas celulares han sido fundamentales para comprender los mecanismos moleculares de la enfermedad, los modelos bidimensionales presentan limitaciones, ya que no reflejan fielmente la arquitectura tridimensional del tumor ni las interacciones complejas con el microambiente tumoral. Por ello, el desarrollo de modelos tridimensionales, como los organoides tumorales, y modelos *in vivo*, como los xenoinjertos e implantaciones ortotópicas en ratones, han permitido estudiar la biología tumoral en un contexto más cercano a la fisiología del paciente, lo que es fundamental para evaluar el impacto de alteraciones genéticas en un entorno fisiológico. Los organoides derivados de tumores representan una herramienta innovadora para estudiar la biología tumoral en un contexto tridimensional. Se ha demostrado que estos modelos recapitulan fielmente las características genéticas, transcriptómicas y fenotípicas del tumor original, permitiendo evaluar la respuesta a tratamientos en un contexto donde convergen distintas interac-

ciones entre las células presentes en el epitelio del colon [Kiwaki and Kataoka, 2022]. En este estudio, generamos organoides a partir de modelos murinos de CCR con mutaciones en *APC*, *KRAS* y *TP53* (organoides AKP) y modificamos genéticamente estas células mediante CRISPR/Cas9 para eliminar la expresión de *Sall2*.

Nuestros resultados muestran que los organoides *Sall2 knockout* presentan un crecimiento más acelerado en comparación con el control, además de mostrar una mayor viabilidad celular, sugiriendo una menor sensibilidad a señales apoptóticas. Estos hallazgos indican que la ausencia de SALL2 favorece la proliferación tumoral en un contexto tridimensional y respalda así los resultados obtenidos en modelos celulares bidimensionales. Es relevante mencionar que, incluso luego de 5 días en cultivo, los organoides muestran una proliferación descontrolada, evidenciada por su aspecto irregular y oscuro. Este fenómeno se atribuye a la heterogeneidad celular, que genera zonas de crecimiento desbalanceado dentro de los organoides, provocando un desarrollo irregular. En muchos casos, esto puede derivar en problemas como la falta de captación de nutrientes y oxígeno, particularmente en las zonas internas de los cultivos tridimensionales, favoreciendo la muerte celular. Sin embargo, este proceso no parece revertir el efecto general del aumento en el crecimiento en los modelos *Sall2 knock out*.

Una de las observaciones más relevantes en los organoides *Sall2 knockout* fue el aumento en el desprendimiento celular y la formación de láminas celulares con crecimiento bidimensional, lo que sugiere una disminución de la adhesión intercelular y, probablemente, un aumento en la capacidad migratoria. Este comportamiento se correlaciona con un aumento en la capacidad migratoria e invasiva de las células, características clave de la EMT [Stadler et al., 2018]. Además, este hallazgo es particularmente interesante ya que fenómenos similares han sido descritos en estudios donde se induce la EMT mediante el tratamiento con TGF β 1 en organoides murinos AKP de cáncer de colon, observándose un incremento en la migración celular y en la infiltración de células más allá del matrigel [Flum et al., 2022]. Aunque en nuestros experimentos no se utilizó TGF β para inducir la EMT, el hecho de observar un fenotipo comparable sugiere que la pérdida de *Sall2* podría estar promoviendo cambios asociados a un programa de transición epitelio-mesenquimal de forma endógena. La asociación con la EMT se refuerza aún más al evaluar los niveles de expresión de genes relacionados con este proceso en organoides AKP *Sall2 knockout*. En este contexto, observamos que la inhibición de la expresión de *Sall2* induce un aumento significativo en los marcadores clásicos de EMT. Sin embargo, la reducción en los niveles de *Zeb1* podría indicar que la pérdida de *Sall2* no está vinculada con un programa de EMT completo, sino con un fenotipo parcial. Esto se debe a que *Zeb1* es comúnmente reconocido como un factor clave en la regulación de una EMT completa [Perez-Oquendo and Gibbons, 2022]. Por lo tanto, la disminución de su expresión favorecería la adquisición de fenotipos intermedios, probablemente modulados por otros factores de transcripción. Estos hallazgos sugieren que la pérdida de *Sall2* promueve un fenotipo asociado a EMT mediante la regulación de marcadores clásicos de este programa transcripcional.

Cabe destacar que para el análisis de genes de referencia (*housekeeping*) se utilizaron tanto GAPDH como β -actina, sin observar diferencias en los resultados. Esto sugiere que los cambios en la expresión de *Sall2* no afectan significativamente la estabilidad de estos genes de referencia, y que el fenotipo celular más agresivo observado en los modelos deficientes en *Sall2* no se debe a variaciones en los niveles del *housekeeping*. Así, únicamente se muestran los resultados utilizando GAPDH como referencia.

De manera adicional, en este estudio se utilizó un modelo de microinyección ortotópica

en ratones C57BL/6, una técnica que permite la implantación precisa de células tumorales en el colon, lo que recapitula mejor la iniciación y progresión tumoral, y evita las limitaciones de los modelos subcutáneos. El uso de este sistema es particularmente relevante en el contexto de investigaciones oncológicas, ya que facilita la inyección ortotópica de células para inducir la formación tumoral en un entorno fisiológicamente relevante, permitiendo un análisis más preciso del crecimiento y comportamiento tumoral en condiciones cercanas a las fisiológicas. Los resultados obtenidos en este modelo *in vivo* fueron consistentes con los hallazgos en organoides y en líneas celulares, en donde se observó que los tumores generados a partir de células *Sall2 knockout* crecieron más rápido en comparación con los tumores control. Además, los ratones con tumores *Sall2 knockout* presentaron una menor sobrevida, con tiempos de sacrificio significativamente más cortos debido al tamaño tumoral y la pérdida de peso corporal. Como consecuencia de lo anterior, al realizar análisis histopatológicos, se observó que los tejidos tumorales deficientes de *Sall2* mostraron características asociadas con mayor agresividad, como un aumento en la invasión a tejidos circundantes. Esto se determinó mediante la observación de células tumorales en vasos sanguíneos, un menor grado de diferenciación y un avance del frente tumoral en la túnica muscular propia.

De manera complementaria a los estudios *in vitro*, uno de los hallazgos más relevantes del análisis histológico fue la redistribución de β -catenina en tumores *Sall2 knockout*. En presencia de *Sall2*, β -catenina se localizó predominantemente en la membrana celular, lo que indica una adhesión celular estable. En contraste, en los tumores deficientes de *Sall2*, β -catenina presentó una localización citoplasmática y nuclear, lo que sugiere una mayor activación de la vía Wnt/ β -catenina y una disolución de las uniones adherentes, lo cual fue corroborado por la localización citoplasmática de E-cadherina. Esto es lógico ya que β -catenina y E-cadherina se unen, en conjunto con otras proteínas, para formar uniones adherentes. Por lo tanto, la alteración de la localización de β -catenina tiene como consecuencia la alteración de la localización de E-cadherina [Campàs et al., 2024]. Esto hace que observemos, E-cadherina citoplasmática en ausencia de *Sall2*. No se puede definir con exactitud si la pérdida de *Sall2* favorece la localización intracelular de β -catenina y esto tiene, como consecuencia, la internalización de E-cadherina, o vice versa. Sin embargo, es posible sugerir que la reducción de SALL2 en el cáncer de colon promueve la redistribución de proteínas clave en las uniones intercelulares, lo que potencia la progresión y agresividad tumoral.

Además, en estos mismos tejidos tumorales se evaluó la expresión del marcador de proliferación ki67, observándose un mayor marcaje en los tumores generados en ausencia de *Sall2* en comparación con el control, lo que respalda los resultados obtenidos *in vitro* con las líneas celulares de cáncer de colon, donde la pérdida de *SALL2* se asoció a un aumento en la proliferación. En conjunto estos resultados ponen en evidencia una fuerte conexión entre *Sall2* y la vía Wnt/ β -catenina además del efecto negativo de la pérdida de *Sall2* en la progresión del cáncer colorrectal. De manera complementaria, se observó en este mismo análisis que el porcentaje de estroma fue mucho mayor en el modelo con pérdida de *Sall2* en comparación con el control, sugiriendo la posibilidad de que la disminución de la expresión de *Sall2* modifique el microambiente tumoral, y con ello, la respuesta inmunológica. Por ello también se plantea como proyección evaluar la infiltración de células inmunes en el tumor además de la evaluación del porcentaje de subpoblaciones celulares en el estroma, como indicador de la progresión tumoral.

5.5. Implicaciones clínicas y futuras direcciones

Con estos resultados, se pone de manifiesto la relevancia de *SALL2* en la biología del cáncer colorrectal. Nuestros hallazgos sugieren que *SALL2* tiene un rol clave en la progresión del CCR, con funciones en la proliferación celular, la migración, la resistencia a quimioterapia y, posiblemente, la regulación de la vía Wnt/ β -catenina. Los resultados también sugieren que este cambio a nivel morfogénico estaría asociado principalmente con un estado de EMT parcial o híbrida. En este contexto, diversos estudios indican que *in vivo* las transiciones completas son a menudo poco comunes, ya que muchas células parecen ocupar estados intermedios en lugar de realizar una transición completa de un fenotipo a otro. Además, la pérdida de *SALL2* se asocia con tumores más agresivos, mayor proliferación y menor respuesta a quimioterapéuticos estándar, lo que sugiere que este factor de transcripción podría tener aplicaciones clínicas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del CCR.

Dado el papel de *SALL2* en la inhibición de diferentes procesos que favorecen a la progresión tumoral, su modulación podría representar una estrategia terapéutica innovadora para el CCR. Se ha demostrado que en varios tipos de cáncer, la pérdida de genes supresores ocurre por silenciamiento epigenético a través de la hipermetilación del promotor. En cáncer oral y ovárico, se ha observado que *SALL2* está inactivado por mecanismos epigenéticos [Sung et al., 2013, Imai et al., 2019]. Sin embargo, en cáncer colorrectal, los mecanismos que generan la disminución de *SALL2* podrían ser diferentes, ya que, según bases de datos públicas, no se ha reportado en este tipo de cáncer un mecanismo epigenético para su silenciamiento [Chandrashekar et al., 2017], por lo menos, al analizar en conjunto diferentes estudios de cáncer de colon. De lo contrario, se podrían utilizar agentes demetilantes como opción de tratamiento futuro para activar la expresión de *SALL2* y frenar la progresión tumoral. Por otra parte, la regulación de *SALL2* podría incluso involucrar mecanismos postranscripcionales y postraduccionales que favorezcan su pérdida, como es el caso de la regulación negativa de *SALL2* mediada por CK2, en donde esta última fosforila a *SALL2* para su posterior degradación proteosomal [Hermosilla et al., 2024].

Como se mencionó antes, la vía Wnt/ β -catenina tiene un rol fundamental a la mayoría de los procesos evaluados. En este contexto, la inhibición de β -catenina en tumores con pérdida de *SALL2* podría ser una posible estrategia terapéutica. Fármacos en desarrollo como LGK974, un inhibidor de Porcupina (PORCN), y PRI-724, un bloqueador de la interacción β -catenina/CBP, han mostrado eficacia en la reducción de la proliferación tumoral en CCR. En estudios futuros, sería relevante evaluar si los tumores con pérdida de *SALL2* responden mejor a inhibidores de β -catenina, lo que abriría la puerta a estrategias de medicina personalizada.

Por otra parte, el microambiente tumoral juega un papel clave en la progresión del CCR, modulando la interacción entre células tumorales y el sistema inmunológico. Estudios recientes han demostrado que la vía Wnt/ β -catenina suprime la respuesta inmunitaria antitumoral, lo que sugiere que tumores con pérdida de *SALL2* y alta activación de Wnt podrían ser menos inmunogénicos. Para evaluar si la pérdida de *SALL2* afecta la respuesta inmunitaria en CCR, se podrían realizar estudios como el análisis del infiltrado inmunológico en tumores *SALL2 knockout*, evaluando la presencia de linfocitos T citotóxicos (CD8+), macrófagos y células dendríticas. Además, de la expresión de PD-L1 y otros puntos de control inmunológico, para determinar si la pérdida de *SALL2* correlaciona con un fenotipo de escape inmune. De aquí, se podrían realizar ensayos con inhibidores de puntos de control inmunológico, como anti-PD-1/PD-L1, en modelos de CCR con baja

expresión de SALL2. Así, si se confirma que la pérdida de SALL2 promueve un ambiente inmunosupresor, su evaluación podría ser relevante para predecir la respuesta a inmunoterapias en pacientes con CCR.

Finalmente, la evaluación de SALL2 en biopsias tumorales podría ayudar a estratificar pacientes según riesgo de progresión y metástasis, predecir la respuesta a quimioterapéuticos estándar e identificar subgrupos de tumores que podrían beneficiarse de terapias que involucren, de manera directa o indirecta, la regulación de SALL2.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la pérdida de *SALL2* contribuye al desarrollo de tumores colorectales de mayor tamaño, debido a su rol regulador negativo sobre la proliferación celular. Esta expansión tumoral, a su vez, podría aumentar la proporción de células con propiedades migratorias, facilitadas por la adquisición de un fenotipo de EMT parcial. Dado que este tipo de transición se asocia con una mayor capacidad de diseminación, el incremento en la migración celular podría favorecer la formación de metástasis, una de las principales causas de mortalidad en pacientes con cáncer colorrectal. Adicionalmente, observamos que la pérdida de *SALL2* se asocia con una mayor infiltración del tumor hacia capas más profundas de la pared colónica, lo que puede generar alteraciones fisiológicas locales y contribuir al daño sistémico. A este perfil más agresivo se suma una menor respuesta a la quimioterapia convencional, lo que sugiere que la ausencia de *SALL2* no solo promueve la progresión tumoral, sino que también compromete la eficacia del tratamiento. Así, finalmente, SALL2 se posiciona como un factor clave en la supresión de múltiples características malignas del cáncer colorrectal, y su pérdida representa un evento de alto impacto clínico en la progresión y manejo de esta enfermedad.

Conexiones moleculares de SALL2 en los procesos celulares asociados a la Transición Epitelio Mesénquima (EMT)

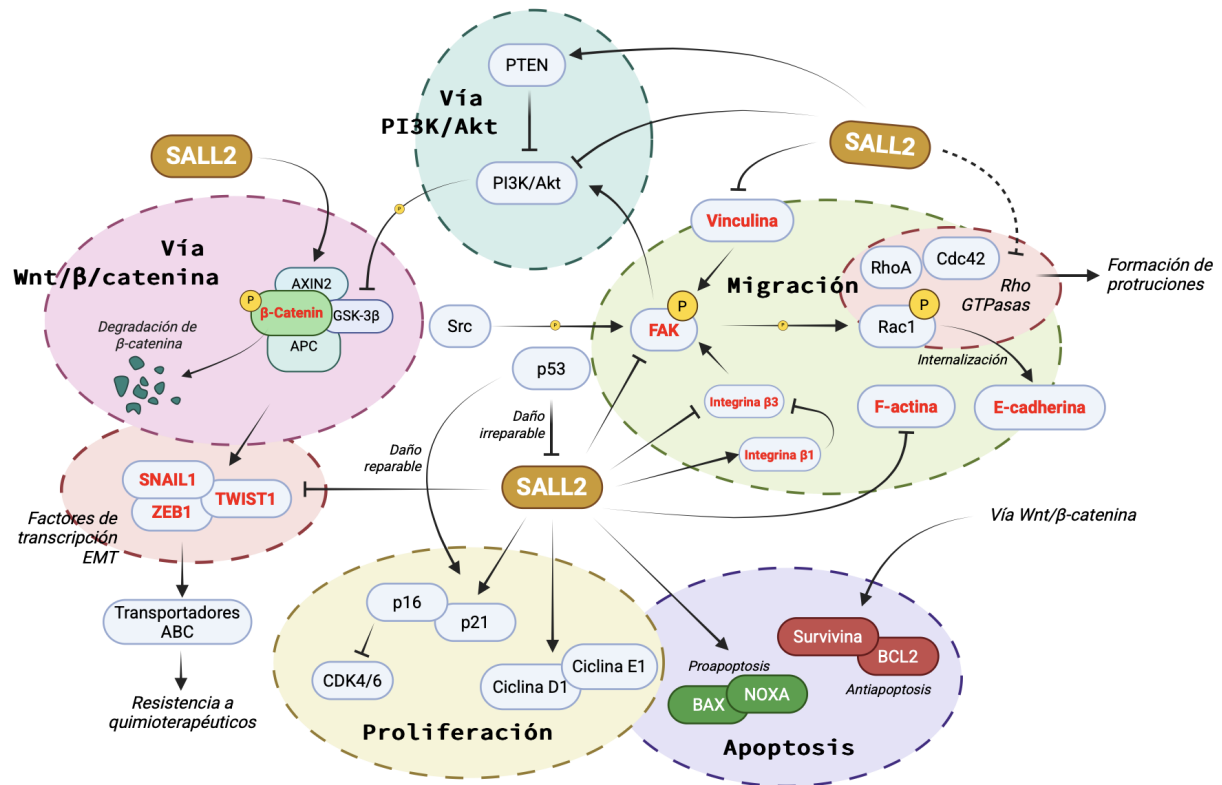


Figura 5.1: Conexiones moleculares de SALL2 en los procesos celulares asociados a la transición epitelio-mesénquima (EMT).

Esquema resumen de algunas de las conexiones moleculares asociadas a SALL2 en el contexto de EMT. A nivel molecular SALL2 está ligado con varios de los procesos que se asocian con la EMT y la agresividad tumoral, como la proliferación, la migración, la apoptosis y la resistencia a quimioterapéuticos. En este contexto, la pérdida del factor de transcripción SALL2, favorece estas características, lo que sugiere que SALL2 estaría actuando como un supresor tumoral. En la figura, los óvalos de colores representan los procesos celulares o vías de señalización en las cuales SALL2 está conectado de manera directa o indirecta. Las líneas punteadas corresponden a información que no se concluye de esta investigación ni tampoco hay artículos que lo confirmen, pero se sugiere de los datos en conjunto. Las proteínas en letras rojas corresponden a aquellas que fueron directamente evaluadas en el contexto de esta investigación.

Capítulo 6

Conclusiones

1. La pérdida de *SALL2* en modelos celulares de CCR (SW480, HT-29, SW620) promueve un aumento sostenido de la proliferación celular, reorganización del citoesqueleto de actina y migración celular, estableciendo a *SALL2* como un potencial supresor tumoral.
2. En organoides derivados de tumores murinos (AKP), la delección de *Sall2* incrementa el crecimiento, viabilidad y desprendimiento celular, lo que refleja un fenotipo tumoral más agresivo en un contexto tridimensional.
3. En modelos ortotópicos murinos, la ausencia de *Sall2* acelera la progresión tumoral, reduce la supervivencia de los ratones y se asocia a una mayor invasión tisular, consolidando su rol fisiopatológico *in vivo*.
4. La pérdida de *SALL2* está asociada con un fenotipo de EMT parcial, activación de FAK y traslocación nuclear de β -catenina, lo que sugiere su papel como regulador de la plasticidad celular y de la vía Wnt.
5. *SALL2* modula la sensibilidad a quimioterapias como 5-FU y FOLFOX, donde su ausencia se asocia con una mayor viabilidad post-tratamiento, implicando un rol en la respuesta terapéutica del CCR.
6. En conjunto, *SALL2* emerge como un regulador clave de la progresión tumoral en CCR y una posible diana terapéutica y biomarcador pronóstico, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de estrategias de medicina personalizada.

Bibliografía

- [Ahmed et al., 2013] Ahmed, D., Eide, P., Eilertsen, I., Danielsen, S., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G., and Lothe, R. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(9):e71–e71.
- [Al-Mulla et al., 2006] Al-Mulla, F., AlFadhli, S., Al-Hakim, A. H., Going, J. J., and Bitar, M. S. (2006). Metastatic recurrence of early-stage colorectal cancer is linked to loss of heterozygosity on chromosomes 4 and 14q. *Journal of Clinical Pathology*, 59(6):624–630.
- [Alarcon, 2021] Alarcon, C. (2021). El rol del factor de transcripción sall2 en la migración de células sw480 de cáncer colorectal.
- [Alinia et al., 2024] Alinia, S., Ahmadi, S., Mohammadi, Z., Rastkar Shirvandeh, F., Asghari-Jafarabadi, M., Mahmoudi, L., Safari, M., and Roshanaei, G. (2024). Exploring the impact of stage and tumor site on colorectal cancer survival: Bayesian survival modeling. *Scientific Reports*, 14(1).
- [Anupriya et al., 2022] Anupriya, S., Chakraborty, A., and Patnaik, S. (2022). Clonal evolution and expansion associated with therapy resistance and relapse of colorectal cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 790:108445.
- [Batlle and Clevers, 2017] Batlle, E. and Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature medicine*, 23(10):1124–1134.
- [Baulch et al., 2016] Baulch, J. E., Geidzinski, E., Tran, K. K., Yu, L., Zhou, Y. H., and Limoli, C. L. (2016). Irradiation of primary human gliomas triggers dynamic and aggressive survival responses involving microvesicle signaling. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 57(5):405–415.
- [Berg et al., 2017] Berg, K. C., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Johannessen, B., Bruun, J., Danielsen, S. A., Bjørnslett, M., Meza-Zepeda, L. A., Eknæs, M., Lind, G. E., et al. (2017). Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines—a resource for biomedical studies. *Molecular cancer*, 16:1–16.
- [Bergers and Fendt, 2021] Bergers, G. and Fendt, S.-M. (2021). The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 21(3):162–180.
- [Bowen et al., 2009] Bowen, K. A., Doan, H. Q., Zhou, B. P., Wang, Q., Zhou, Y., Rychahou, P. G., and Evers, B. M. (2009). Pten loss induces epithelial—mesenchymal transition in human colon cancer cells. *Anticancer research*, 29(11):4439–4449.
- [Brabletz et al., 2021] Brabletz, S., Schuhwerk, H., Brabletz, T., and Stemmler, M. P. (2021). Dynamic emt: a multi-tool for tumor progression. *The EMBO Journal*, 40(18).

- [Bray et al., 2024] Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3):229–263.
- [Böhm et al., 2008] Böhm, J., Buck, A., Borozdin, W., Mannan, A. U., Matysiak-Scholze, U., Adham, I., Schulz-Schaeffer, W., Floss, T., Wurst, W., Kohlhase, J., and Barriónuevo, F. (2008). Sall1, sall2, and sall4 are required for neural tube closure in mice. *American Journal of Pathology*, 173(5):1455–1463.
- [Campàs et al., 2024] Campàs, O., Noordstra, I., and Yap, A. S. (2024). Adherens junctions as molecular regulators of emergent tissue mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(4):252–269.
- [Cañellas-Socias et al., 2024] Cañellas-Socias, A., Sancho, E., and Batlle, E. (2024). Mechanisms of metastatic colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, pages 1–17.
- [Chandrashekar et al., 2017] Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. S. K., and Varambally, S. (2017). Ualcan: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia (United States)*, 19(8):649–658.
- [Che and Yu, 2023] Che, J. and Yu, S. (2023). Ecological niches for colorectal cancer stem cell survival and thrival. *Frontiers in Oncology*, 13:1135364.
- [Chen et al., 2015] Chen, B., Co, C., and Ho, C.-C. (2015). Cell shape dependent regulation of nuclear morphology. *Biomaterials*, 67:129–136.
- [Chibaya et al., 2021] Chibaya, L., Karim, B., Zhang, H., and Jones, S. N. (2021). Mdm2 phosphorylation by akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(4):e2003193118.
- [Ciuffi, 2008] Ciuffi, A. (2008). Mechanisms governing lentivirus integration site selection. *Current gene therapy*, 8(6):419–429.
- [Colón-Bolea et al., 2020] Colón-Bolea, P., García-Gómez, R., Shackleton, S., Crespo, P., Bustelo, X. R., and Casar, B. (2020). Rac1 induces nuclear alterations through the linc complex to enhance melanoma invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*, 31(25):2768–2778.
- [Congreso Nacional de Chile, 2020] Congreso Nacional de Chile (2020). Ley N° 21.258: Establece la Ley Nacional del Cáncer y rinde homenaje póstumo al doctor Claudio Mora. Último acceso: 8 de marzo de 2024.
- [De Celis and Barrio, 2009] De Celis, J. F. and Barrio, R. (2009). Regulation and function of spalt proteins during animal development. *International Journal of Developmental Biology*, 53(8–10):1385–1398.
- [De Las Rivas et al., 2021] De Las Rivas, J., Brozovic, A., Izraely, S., Casas-Pais, A., Witz, I. P., and Figueroa, A. (2021). Cancer drug resistance induced by emt: novel therapeutic strategies. *Archives of toxicology*, 95(7):2279–2297.

- [Debnath et al., 2022] Debnath, P., Huirem, R. S., Dutta, P., and Palchaudhuri, S. (2022). Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. *Bioscience Reports*, 42(1).
- [Deo et al., 2021] Deo, S. V. S., Kumar, S., Bhorawal, S., Shukla, N. K., Sharma, A., Thulkar, S., Das, P., Bhagat, P., Dhall, K., Pathy, S., and Mohanti, B. K. (2021). Colorectal cancers in low-and middle-income countries-demographic pattern and clinical profile of 970 patients treated at a tertiary care cancer center in india. *JCO Global Oncology*, 7.
- [DepMap, 2021] DepMap, B. (2021). Current depmap release data, including crispr screens, prism drug screens, copy number, mutation, expression, and fusions. *DepMap 21Q2 Public*.
- [Dongre and Weinberg, 2019] Dongre, A. and Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2):69–84.
- [Druzhkova et al., 2020] Druzhkova, I., Shirmanova, M., Ignatova, N., Dudenkova, V., Lukina, M., Zagaynova, E., Safina, D., Kostrov, S., Didych, D., Kuzmich, A., et al. (2020). Expression of emt-related genes in hybrid e/m colorectal cancer cells determines fibroblast activation and collagen remodeling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21):8119.
- [Duan et al., 2022] Duan, X., Luo, M., Li, J., Shen, Z., and Xie, K. (2022). Overcoming therapeutic resistance to platinum-based drugs by targeting epithelial–mesenchymal transition. *Frontiers in oncology*, 12:1008027.
- [Escalante et al., 2021] Escalante, P. I., Quinones, L. A., and Contreras, H. R. (2021). Epithelial-mesenchymal transition and micrnas in colorectal cancer chemoresistance to folfox. *Pharmaceutics*, 13(1):75.
- [Escobar et al., 2015] Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Campos, T., Sodir, N. M., Morales, M., Álvarez, C. I., Swigart, L., Evan, G. I., Gutiérrez, J. L., Nishinakamura, R., Castro, A. F., and Pincheira, R. (2015). Sall2 is required for proapoptotic noxa expression and genotoxic stress-induced apoptosis by doxorubicin. *Cell Death and Disease*, 6(7):e165.
- [Espinoza et al., 2022] Espinoza, M. A., Armijo, N., Abbott, T., Jiménez, J., and Balmaceda, C. (2022). El costo esperado de cáncer en chile. *Revista Médica de Chile*, 150.
- [Fares et al., 2020] Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., and Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
- [Farkas et al., 2021a] Farkas, C., Quiroz, A., Alvarez, C., Hermosilla, V., Aylwin, C. F., Lomniczi, A., Castro, A. F., Hepp, M. I., and Pincheira, R. (2021a). Characterization of sall2 gene isoforms and targets across cell types reveals highly conserved networks. *Frontiers in Genetics*, 12.

- [Farkas et al., 2021b] Farkas, C., Quiroz, A., Alvarez, C., Hermosilla, V., Aylwin, C. F., Lomniczi, A., Castro, A. F., Hepp, M. I., and Pincheira, R. (2021b). Characterization of *sall2* gene isoforms and targets across cell types reveals highly conserved networks. *Frontiers in Genetics*, 12:613808.
- [Fedorova et al., 2022] Fedorova, O., Parfenyev, S., Daks, A., Shuvalov, O., and Barlev, N. A. (2022). The role of *pten* in epithelial–mesenchymal transition. *Cancers*, 14(15):3786.
- [Fiscon et al., 2018] Fiscon, G., Conte, F., Licursi, V., Nasi, S., and Paci, P. (2018). Computational identification of specific genes for glioblastoma stem-like cells identity. *Scientific Reports*, 8(1):1–10.
- [Fleming et al., 2012] Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., and Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3):153–173.
- [Flum et al., 2022] Flum, M., Dicks, S., Teng, Y.-H., Schrempp, M., Nyström, A., Boerries, M., and Hecht, A. (2022). Canonical *tgf β* signaling induces collective invasion in colorectal carcinogenesis through a *snail1*-and *zeb1*-independent partial *emt*. *Oncogene*, 41(10):1492–1506.
- [Gallicchio et al., 2022] Gallicchio, L., Devasia, T. P., Tonorezos, E., Mollica, M. A., and Mariotto, A. (2022). Estimation of the number of individuals living with metastatic cancer in the united states. *Journal of the National Cancer Institute*, 114(11):1476–1483.
- [Gu et al., 2011] Gu, H., Li, D., Sung, C. K., Yim, H., Troke, P., and Benjamin, T. (2011). Dna-binding and regulatory properties of the transcription factor and putative tumor suppressor *p150sal2*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(4–6):276–283.
- [Harris and Tepass, 2010] Harris, T. J. and Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(7):502–514.
- [Hassin et al., 2022] Hassin, O., Nataraj, N. B., Shreberk-Shaked, M., Aylon, Y., Yaeger, R., Fontemaggi, G., Mukherjee, S., Maddalena, M., Avioz, A., Iancu, O., Mallel, G., Gershoni, A., Grosheva, I., Feldmesser, E., Ben-Dor, S., Golani, O., Hendel, A., Blandino, G., Kelsen, D., and Oren, M. (2022). Different hotspot *p53* mutants exert distinct phenotypes and predict outcome of colorectal cancer patients. *Nature Communications*, 13(1).
- [Hermida et al., 2017] Hermida, M., Dinesh Kumar, J., and Leslie, N. (2017). *Gsk3* and its interactions with the *pi3k/akt/mtor* signalling network. *adv biol regul* 65: 5–15.
- [Hermosilla et al., 2024] Hermosilla, V., Gyenis, L., Rabalski, A., Armijo, M., Sepúlveda, P., Duprat, F., Benítez-Riquelme, D., Fuentes-Villalobos, F., Quiroz, A., Hepp, M., et al. (2024). Casein kinase 2 phosphorylates and induces the *sall2* tumor suppressor degradation in colon cancer cells. *Cell death & disease*, 15(3):223.

- [Hermosilla et al., 2018] Hermosilla, V., Salgado, G., Riffo, E., Escobar, D., Hepp, M. I., Farkas, C., Galindo, M., Morín, V., García-Robles, M. A., Castro, A. F., and Pincheira, R. (2018). Sall2 represses cyclins d1 and e1 expression and restrains g1/s cell cycle transition and cancer-related phenotypes. *Molecular Oncology*, 12(7):1026–1046.
- [Hermosilla et al., 2017] Hermosilla, V. E., Hepp, M. I., Escobar, D., Farkas, C., Riffo, E. N., Castro, A. F., and Pincheira, R. (2017). Developmental sall2 transcription factor: A new player in cancer. *Carcinogenesis*, 38(7):680–690.
- [Hewlett, 2019] Hewlett, E. (2019). *OECD Reviews of Public Health: Chile A HEALTHIER TOMORROW*. OECD.
- [Hutasoit et al., 2024] Hutasoit, G. A., Miskad, U. A., Akil, F., Cangara, M. H., Dahlan, H., Yamin, A., and Mardiati, M. (2024). Snail expression as a prognostic factor in colorectal adenocarcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 25(9):3143.
- [Imai et al., 2019] Imai, A., Mochizuki, D., Misawa, Y., Nakagawa, T., Endo, S., Mima, M., Yamada, S., Kawasaki, H., Kanazawa, T., and Misawa, K. (2019). Sall2 is a novel prognostic methylation marker in patients with oral squamous carcinomas: associations with sall1 and sall3 methylation status. *DNA and Cell Biology*, 38(7):678–687.
- [Izdebska et al., 2020] Izdebska, M., Zielińska, W., Hałas-Wiśniewska, M., and Grzanka, A. (2020). Involvement of actin and actin-binding proteins in carcinogenesis. *Cells*, 9(10):2245.
- [Kalluri and Weinberg, 2009] Kalluri, R. and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6):1420–1428.
- [Kelberman et al., 2014] Kelberman, D., Islam, L., Lakowski, J., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., Patel, A., Stupka, E., Buck, A., Wolf, S., Beales, P. L., Jacques, T. S., Bitner-Glindzicz, M., Liasis, A., Lehmann, O. J., Kohlhase, J., Nischal, K. K., and Sowden, J. C. (2014). Mutation of sall2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. *Human Molecular Genetics*, 23(10):2511–2526.
- [Kennedy et al., 1999] Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K., and Hay, N. (1999). Akt/protein kinase b inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and cellular biology*, 19(8):5800–5810.
- [Khan and Lengyel, 2023] Khan, S. Z. and Lengyel, C. G. (2023). Challenges in the management of colorectal cancer in low- and middle-income countries. *Cancer Treatment and Research Communications*, 35.
- [Kim et al., 2015] Kim, A.-Y., Kwak, J.-H., Je, N. K., hee Lee, Y., and Jung, Y.-S. (2015). Epithelial-mesenchymal transition is associated with acquired resistance to 5-fluorouracil in ht-29 colon cancer cells. *Toxicological Research*, 31(2):151–156.
- [Kiwaki and Kataoka, 2022] Kiwaki, T. and Kataoka, H. (2022). Patient-derived organoids of colorectal cancer: a useful tool for personalized medicine. *Journal of Personalized Medicine*, 12(5):695.

- [Kohlhase et al., 2000] Kohlhase, J., Altmann, M., Archangelo, L., Dixkens, C., and Engel, W. (2000). Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2. *Mammalian Genome*, 11(1):64–68.
- [Leggett et al., 2016] Leggett, S. E., Sim, J. Y., Rubins, J. E., Neronha, Z. J., Williams, E. K., and Wong, I. Y. (2016). Morphological single cell profiling of the epithelial–mesenchymal transition. *Integrative Biology*, 8(11):1133–1144.
- [Leiphrakpam and Are, 2024] Leiphrakpam, P. D. and Are, C. (2024). Pi3k/akt/mtor signaling pathway as a target for colorectal cancer treatment. *International journal of molecular sciences*, 25(6):3178.
- [Li et al., 2004] Li, D., Tian, Y., Ma, Y., and Benjamin, T. (2004). p150 (sal2) is a p53-independent regulator of p21 (waf/cip). *Molecular and Cellular Biology*, 24(9):3885–3893.
- [Li et al., 2024a] Li, Q., Geng, S., Luo, H., Wang, W., Mo, Y.-Q., Luo, Q., Wang, L., Song, G.-B., Sheng, J.-P., and Xu, B. (2024a). Signaling pathways involved in colorectal cancer: pathogenesis and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1):266.
- [Li et al., 2024b] Li, Q., Li, C., Zhang, Y., Zheng, Z., Wang, Y., Yang, Y., Zhu, Q., Wang, R., Xu, W., Zhu, C., et al. (2024b). The tumor suppressor sall2 opposes chemotherapeutic resistance in breast cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, pages 1–13.
- [Liang et al., 2024] Liang, B., Xing, X., Storts, H., Ye, Z., Claybon, H., Austin, R., Ding, R., Liu, B., Wen, H., Miles, W. O., et al. (2024). Antagonistic roles of cgas/sting signaling in colorectal cancer chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, 14:1441935.
- [Liu et al., 2023] Liu, F., Wu, Q., Dong, Z., and Liu, K. (2023). Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. *Pharmacology & therapeutics*, 247:108458.
- [Liu et al., 2007] Liu, H., Adler, A. S., Segal, E., and Chang, H. Y. (2007). A transcriptional program mediating entry into cellular quiescence. *PLoS Genetics*, 3(6):0996–1008.
- [Liu et al., 2014] Liu, L. Y. D., Chang, L. Y., Kuo, W. H., Hwa, H. L., Chang, K. J., and Hsieh, F. J. (2014). A supervised network analysis on gene expression profiles of breast tumors predicts a 41-gene prognostic signature of the transcription factor myb across molecular subtypes. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2014.
- [Long et al., 2022] Long, S., Wang, J., Weng, F., Pei, Z., Zhou, S., Sun, G., and Xiang, D. (2022). Ecm1 regulates the resistance of colorectal cancer to 5-fu treatment by modulating apoptotic cell death and epithelial-mesenchymal transition induction. *Frontiers in Pharmacology*, 13:1005915.
- [Longley et al., 2003] Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*, 3(5):330–338.
- [Luo et al., 2017] Luo, J., Wang, W., Tang, Y., Zhou, D., Gao, Y., Zhang, Q., Zhou, X., and Zhu, H. (2017). mrna and methylation profiling of radioresistant esophageal cancer

- cells: the involvement of *sall2* in acquired aggressive phenotypes. *Journal of Cancer*, 8(4):646–656.
- [Lüönd et al., 2021] Lüönd, F., Sugiyama, N., Bill, R., Bornes, L., Hager, C., Tang, F., Santacroce, N., Beisel, C., Ivanek, R., Bürglin, T., Tiede, S., van Rheenen, J., and Christofori, G. (2021). Distinct contributions of partial and full emt to breast cancer malignancy. *Developmental Cell*, 56(23):3203–3221.e11.
- [Ma et al., 2006] Ma, Y., Cui, W., Yang, J., Qu, J., Di, C., Amin, H. M., Lai, R., Ritz, J., Krause, D. S., and Chai, L. (2006). *Sall4*, a novel oncogene, is constitutively expressed in human acute myeloid leukemia (aml) and induces aml in transgenic mice. *Blood*, 108(8):2726–2735.
- [Ma et al., 2001] Ma, Y., Li, D., Chai, L., Luciani, A. M., Ford, D., Morgan, J., and 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. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51):48223–48230.
- [Mhaidat et al., 2014] Mhaidat, N. M., Bouklihacene, M., and Thorne, R. F. (2014). 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase $c\text{-}\delta$. *Oncology letters*, 8(2):699–704.
- [Miao et al., 2017] Miao, F., Zhang, X., Cao, Y., Wang, Y., and Zhang, X. (2017). Effect of sirna-silencing of *sall2* gene on growth, migration and invasion of human ovarian carcinoma a2780 cells. *BMC Cancer*, 17(1).
- [Michl et al., 2024] Michl, J., White, B., Monterisi, S., Bodmer, W. F., and Swietach, P. (2024). Phenotypic screen of sixty-eight colorectal cancer cell lines identifies *ceacam6* and *ceacam5* as markers of acid resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(13):e2319055121.
- [Migault et al., 2022] Migault, M., Sapkota, S., and Bracken, C. P. (2022). Transcriptional and post-transcriptional control of epithelial-mesenchymal plasticity: why so many regulators? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(3):182.
- [Ministerio de Salud de Chile, 2018] Ministerio de Salud de Chile (2018). Plan Nacional de Cáncer 2018-2028. Accedido el: [Fecha de acceso].
- [Niida et al., 2021] Niida, A., Mimori, K., Shibata, T., and Miyano, S. (2021). Modeling colorectal cancer evolution. *Journal of Human Genetics*, 66(9):869–878.
- [Nurmagambetova et al., 2023] Nurmagambetova, A., Mustyatsa, V., Saidova, A., and Vorobjev, I. (2023). Morphological and cytoskeleton changes in cells after emt. *Scientific Reports*, 13(1).
- [Palmieri et al., 2015] Palmieri, V., Lucchetti, D., Maiorana, A., Papi, M., Maulucci, G., Calapà, F., Ciasca, G., Giordano, R., Sgambato, A., and De Spirito, M. (2015). Mechanical and structural comparison between primary tumor and lymph node metastasis cells in colorectal cancer. *Soft matter*, 11(28):5719–5726.
- [Pan et al., 2018] Pan, B., Guo, J., Liao, Q., and Zhao, Y. (2018). $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins in breast, prostate and pancreatic cancer: A novel implication. *Oncology letters*, 15(4):5412–5416.

- [Parvani et al., 2013] Parvani, J. G., Galliher-Beckley, A. J., Schiemann, B. J., and Schiemann, W. P. (2013). Targeted inactivation of $\beta 1$ integrin induces $\beta 3$ integrin switching, which drives breast cancer metastasis by $\text{tgf-}\beta$. *Molecular biology of the cell*, 24(21):3449–3459.
- [Pastorino et al., 2024] Pastorino, G. A., Sheraj, I., Huebner, K., Ferrero, G., Kunze, P., Hartmann, A., Hampel, C., Husnugil, H. H., Maiuthed, A., Gebhart, F., Schlattmann, F., Gulec Taskiran, A. E., Oral, G., Palmisano, R., Pardini, B., Naccarati, A., Erlenbach-Wuenssch, K., Banerjee, S., and Schneider-Stock, R. (2024). A partial epithelial-mesenchymal transition signature for highly aggressive colorectal cancer cells that survive under nutrient restriction. *Journal of Pathology*, 262(3):347–361.
- [Perez-Oquendo and Gibbons, 2022] Perez-Oquendo, M. and Gibbons, D. L. (2022). Regulation of *zeb1* function and molecular associations in tumor progression and metastasis. *Cancers*, 14(8):1864.
- [Pincheira et al., 2009] Pincheira, R., Baerwald, M., Dunbar, J. D., and Donner, D. B. (2009). *Sall2* is a novel p75^{ntr}-interacting protein that links *ngf* signalling to cell cycle progression and neurite outgrowth. *EMBO Journal*, 28(3):261–273.
- [Pretzsch et al., 2019] Pretzsch, E., Bösch, F., Neumann, J., Ganschow, P., Bazhin, A., Guba, M., Werner, J., and Angele, M. (2019). Mechanisms of metastasis in colorectal cancer and metastatic organotropism: hematogenous versus peritoneal spread. *Journal of oncology*, 2019(1):7407190.
- [Priestley et al., 2019] Priestley, P., Baber, J., Lolkema, M. P., Steeghs, N., de Bruijn, E., Shale, C., Duyvesteyn, K., Haidari, S., van Hoeck, A., Onstenk, W., et al. (2019). Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours. *Nature*, 575(7781):210–216.
- [Quiroz, 2023] Quiroz, A. (2023). Asociación de *sall2* y vía *wnt*/ β -catenina en cáncer de colon.
- [Radu et al., 2024] Radu, P., Zurzu, M., Tigora, A., Paic, V., Bratucu, M., Garofil, D., Surlin, V., Munteanu, A. C., Coman, I. S., Popa, F., et al. (2024). The impact of cancer stem cells in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8):4140.
- [Raivola et al., 2022] Raivola, J., Dini, A., Karvonen, H., Piki, E., Salokas, K., Niininen, W., Kaleva, L., Zhang, K., Arjama, M., Gudoityte, G., et al. (2022). Multiomics characterization implicates *ptk7* in ovarian cancer *emt* and cell plasticity and offers strategies for therapeutic intervention. *Cell Death & Disease*, 13(8):714.
- [Rangaswami et al., 2012] Rangaswami, H., Schwappacher, R., Tran, T., Chan, G. C., Zhuang, S., Boss, G. R., and Pilz, R. B. (2012). Protein kinase g and focal adhesion kinase converge on *src/akt*/ β -catenin signaling module in osteoblast mechanotransduction. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25):21509–21519.
- [Riffo et al., 2022] Riffo, E., Palma, M., Hepp, M. I., Benítez-Riquelme, D., Torres, V. A., Castro, A. F., and Pincheira, R. (2022). The *sall2* transcription factor promotes cell migration regulating focal adhesion turnover and integrin $\beta 1$ expression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.

- [Roh et al., 2012] Roh, S. A., Choi, E. Y., Cho, D. H., Yoon, Y. S., Kim, T. W., Kim, Y. S., and Kim, J. C. (2012). Characterization of biological responses of colorectal cancer cells to anticancer regimens. *Journal of the Korean Surgical Society*, 83(1):21–29.
- [Roper et al., 2018] Roper, J., Tammela, T., Akkad, A., Almeqdadi, M., Santos, S. B., Jacks, T., and Yilmaz, Ö. H. (2018). Colonoscopy-based colorectal cancer modeling in mice with crispr–cas9 genome editing and organoid transplantation. *Nature protocols*, 13(2):217–234.
- [Rütter et al., 2024] Rütter, M., Milošević, N., Ventura, Y., Feinshtein, V., and David, A. (2024). E-selectin-targeted polymer–doxorubicin conjugate induces regression of established colorectal liver metastases and improves mice survival. *Nano Today*, 55:102182.
- [Saletti et al., 2015] Saletti, P., Molinari, F., De Dosso, S., and Frattini, M. (2015). Egrf signaling in colorectal cancer: a clinical perspective. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*, pages 21–38.
- [Saoudi González et al., 2023] Saoudi González, N., Salvà, F., Ros, J., Baraibar, I., Rodríguez-Castells, M., García, A., Alcaráz, A., Vega, S., Bueno, S., Tabernero, J., et al. (2023). Unravelling the complexity of colorectal cancer: heterogeneity, clonal evolution, and clinical implications. *Cancers*, 15(16):4020.
- [Schlaepfer et al., 2024] Schlaepfer, D. D., Ojalill, M., and Stupack, D. G. (2024). Focal adhesion kinase signaling–tumor vulnerabilities and clinical opportunities. *Journal of Cell Science*, 137(14):jcs261723.
- [Schliemann et al., 2020] Schliemann, D., Matovu, N., Ramanathan, K., Muñoz-Aguirre, P., O’Neill, C., Kee, F., Su, T. T., and Donnelly, M. (2020). Implementation of colorectal cancer screening interventions in low-income and middle-income countries: A scoping review protocol. *BMJ Open*, 10(6).
- [Schliemann et al., 2021] Schliemann, D., Ramanathan, K., Matovu, N., O’Neill, C., Kee, F., Su, T. T., and Donnelly, M. (2021). The implementation of colorectal cancer screening interventions in low-and middle-income countries: a scoping review. *BMC Cancer*, 21(1).
- [Schmitt and Greten, 2021] Schmitt, M. and Greten, F. R. (2021). The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 21(10):653–667.
- [Sharma et al., 2022] Sharma, R., Abbasi-Kangevari, M., Abd-Rabu, R., Abidi, H., Abu-Gharbieh, E., Acuna, J. M., et al. (2022). Global, regional, and national burden of colorectal cancer and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 7(7):627–647.
- [Shin et al., 2005] Shin, Y. M., Han, H. S., Lim, S. W., Kim, B. C., Cheoi, K. S., Eum, Y. O., Kim, S. T., and Lee, K. H. (2005). Combination chemotherapy of oxaliplatin, 5-fluorouracil and low dose leucovorin in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 37(5):284–289.

- [Shinji et al., 2025] Shinji, S., Ogawa, Y., Yamada, T., Matsuda, A., Uehara, K., Yokoyama, Y., Takahashi, G., Iwai, T., Miyasaka, T., Kanaka, S., et al. (2025). Morphological and functional analysis of colorectal cancer cell lines in 2d and 3d culture models. *Scientific Reports*, 15(1):3047.
- [Sousa-Squiavinato et al., 2022] Sousa-Squiavinato, A. C. M., Ramos, D. A. A., Wagner, M. S., Tessmann, J. W., de Freitas-Junior, J. C. M., and Morgado-Díaz, J. A. (2022). Long-term resistance to 5-fluorouracil promotes epithelial–mesenchymal transition, apoptosis evasion, autophagy, and reduced proliferation rate in colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 933:175253.
- [Stadler et al., 2018] Stadler, M., Scherzer, M., Walter, S., Holzner, S., Pudelko, K., Riedl, A., Unger, C., Kramer, N., Weil, B., Neesen, J., et al. (2018). Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *Scientific reports*, 8(1):1151.
- [Stemmler et al., 2019] Stemmler, M. P., Eccles, R. L., Brabletz, S., and Brabletz, T. (2019). Non-redundant functions of emt transcription factors. *Nature Cell Biology*, 21(1):102–112.
- [Sung et al., 2011] Sung, C. K., Dahl, J., Yim, H., Rodig, S., and Benjamin, T. L. (2011). Transcriptional and post-translational regulation of the quiescence factor and putative tumor suppressor p150 sal2. *The FASEB Journal*, 25(4):1275–1283.
- [Sung et al., 2013] Sung, C. K., Li, D., Andrews, E., Drapkin, R., and Benjamin, T. (2013). Promoter methylation of the sall2 tumor suppressor gene in ovarian cancers. *Molecular Oncology*, 7(3):419–427.
- [Sung et al., 2012] Sung, C. K., Yim, H., Gu, H., Li, D., Andrews, E., Duraisamy, S., et al. (2012). The polyoma virus large t binding protein p150 is a transcriptional repressor of c-myc. *PLoS ONE*, 7(9):1–7.
- [Suvà et al., 2014] Suvà, M. L., Rheinbay, E., Gillespie, S. M., Patel, A. P., Wakimoto, H., Rabkin, S. D., et al. (2014). Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell*, 157(3):580–594.
- [Sweetman and Münsterberg, 2006] Sweetman, D. and Münsterberg, A. (2006). The vertebrate spalt genes in development and disease. *Developmental Biology*, 293(2):285–293.
- [Talbot et al., 2020] Talbot, S. R., Biernot, S., Bleich, A., van Dijk, R. M., Ernst, L., Häger, C., Helgers, S. O. A., Koegel, B., Koska, I., Kuhla, A., et al. (2020). Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Laboratory animals*, 54(1):99–110.
- [Tang et al., 2020] Tang, Q., Chen, J., Di, Z., Yuan, W., Zhou, Z., Liu, Z., Han, S., Liu, Y., Ying, G., Shu, X., et al. (2020). Tm4sf1 promotes emt and cancer stemness via the wnt/ β -catenin/sox2 pathway in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39:1–17.
- [Taramasco et al., 2024] Taramasco, C., Rimassa, C., and Acevedo, J. (2024). Challenges in surveillance of all cancer cases: The chilean national cancer registry. *Medwave*, 24(1).

- [Thievensen et al., 2015] Thievensen, I., Fakhri, N., Steinwachs, J., Kraus, V., McIsaac, R. S., Gao, L., Chen, B.-C., Baird, M. A., Davidson, M. W., Betzig, E., et al. (2015). Vinculin is required for cell polarization, migration, and extracellular matrix remodeling in 3d collagen. *The FASEB Journal*, 29(11):4555.
- [Tria et al., 2023] Tria, S. M., Burge, M. E., and Whitehall, V. L. J. (2023). The therapeutic landscape for kras-mutated colorectal cancers. *Cancers*, 15(8):2375.
- [Uhlén et al., 2015] Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220):1260419.
- [Valle et al., 2019] Valle, L., Vilar, E., Tavtigian, S. V., and Stoffel, E. M. (2019). Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *Journal of Pathology*, 247(5):574–588.
- [Vaquero-Siguero et al., 2022] Vaquero-Siguero, N., Schleussner, N., Volk, J., Mastel, M., Meier, J., and Jackstadt, R. (2022). Modeling colorectal cancer progression reveals niche-dependent clonal selection. *Cancers*, 14(17):4260.
- [Verhagen et al., 2024] Verhagen, M. P., Xu, T., Stabile, R., Joosten, R., Tucci, F. A., van Royen, M., Trerotola, M., Alberti, S., Sacchetti, A., and Fodde, R. (2024). The sw480 cell line as a model of resident and migrating colon cancer stem cells. *Iscience*, 27(9).
- [Vodenkova et al., 2020] Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P., and Vymetalkova, V. (2020). 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacology & therapeutics*, 206:107447.
- [Vogelstein et al., 1988] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. M., and Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal tumor development. *The New England Journal of Medicine*, 319(9):525–532.
- [Wang et al., 2023] Wang, H., Guo, M., Wei, H., and Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1).
- [Wang et al., 2025] Wang, H., Liu, R., Yu, Y., Xue, H., Shen, R., Zhang, Y., and Ding, J. (2025). Effects of cell shape and nucleus shape on epithelial-mesenchymal transition revealed using chimeric micropatterns. *Biomaterials*, 317:123013.
- [Wang et al., 2024] Wang, H., Tang, R., Jiang, L., and Jia, Y. (2024). The role of pik3ca gene mutations in colorectal cancer and the selection of treatment strategies. *Frontiers in Pharmacology*, 15:1494802.
- [Wang et al., 2018] Wang, Q., Shi, Y. L., Zhou, K., Wang, L. L., Yan, Z. X., Liu, Y. L., Xu, L. L., Zhao, S. W., Chu, H. L., Shi, T. T., Ma, Q. H., and Bi, J. (2018). Pik3ca mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death and Disease*, 9(7).

- [Wang et al., 2021] Wang, Q., Zhu, G., Lin, C., Lin, P., Chen, H., He, R., Huang, Y., Yang, S., and Ye, J. (2021). Vimentin affects colorectal cancer proliferation, invasion, and migration via regulated by activator protein 1. *Journal of Cellular Physiology*, 236(11):7591–7604.
- [Wang et al., 2019] Wang, X., O’Connell, K., Jeon, J., Song, M., Hunter, D., Hoffmeister, M., Lin, Y., Berndt, S., Brenner, H., Chan, A. T., Chang-Claude, J., Gong, J., Gunter, M. J., Harrison, T. A., Hayes, R. B., Joshi, A., Newcomb, P., Schoen, R., Slattery, M. L., and Du, M. (2019). Combined effect of modifiable and non-modifiable risk factors for colorectal cancer risk in a pooled analysis of 11 population-based studies. *BMJ Open Gastroenterology*, 6(1).
- [Woodford-Richens et al., 2001] Woodford-Richens, K., Rowan, A., Gorman, P., Halford, S., Bicknell, D., Wasan, H., Roylance, R., Bodmer, W., and Tomlinson, I. (2001). Smad4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17):9719–9723.
- [Wu et al., 2015] Wu, Z., Cheng, K., Shi, L., Li, Z., Negi, H., Gao, G., Kamle, S., and Li, D. (2015). Sal-like protein 2 upregulates p16 expression through a proximal promoter element. *Cancer Science*, 106(3):253–261.
- [Xiong et al., 2024] Xiong, H., Lin, B., Liu, J., Lu, R., Lin, Z., Hang, C., Liu, W., Zhang, L., Ding, J., Guo, H., et al. (2024). Sall2 regulates neural differentiation of mouse embryonic stem cells through tuba1a. *Cell Death & Disease*, 15(9):710.
- [Xu et al., 2023] Xu, C., Zhang, W., and Liu, C. (2023). Fak downregulation suppresses stem-like properties and migration of human colorectal cancer cells. *PLoS ONE*, 18(4).
- [Xu et al., 2015] Xu, R., Zhang, Y., Gu, L., Zheng, J., Cui, J., Dong, J., and Du, J. (2015). Arf6 regulates egf-induced internalization of e-cadherin in breast cancer cells. *Cancer cell international*, 15:1–9.
- [Yaeger et al., 2018] Yaeger, R., Chatila, W. K., Lipsyc, M. D., Hechtman, J. F., Cercek, A., Sanchez-Vega, F., Jayakumaran, G., Middha, S., Zehir, A., Donoghue, M. T., et al. (2018). Clinical sequencing defines the genomic landscape of metastatic colorectal cancer. *Cancer cell*, 33(1):125–136.
- [Yan et al., 2016] Yan, P., Klingbiel, D., Saridaki, Z., Ceppa, P., Curto, M., McKee, T. A., Roth, A., Tejpar, S., Delorenzi, M., Bosman, F. T., and Fiocca, R. (2016). Reduced expression of smad4 is associated with poor survival in colon cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(12):3037–3047.
- [Yang et al., 2020] Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. J. Y., Kalchauer, C., and Sheng, G. (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(6):341–352.

- [Ye et al., 2019] Ye, L., Lin, C., Wang, X., Li, Q., Li, Y., Wang, M., Zhao, Z., Wu, X., Shi, D., Xiao, Y., et al. (2019). Epigenetic silencing of *sall 2* confers tamoxifen resistance in breast cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 11(12):e10638.
- [Yu et al., 2017] Yu, D., Khan, O. F., Suvà, M. L., Dong, B., Panek, W. K., Xiao, T., Wu, M., Han, Y., Ahmed, A. U., Balyasnikova, I. V., Zhang, H. F., Sun, C., Langer, R., Anderson, D. G., and Lesniak, M. S. (2017). Multiplexed rnaï therapy against brain tumor-initiating cells via lipopolymeric nanoparticle infusion delays glioblastoma progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(30):E6147–E6156.
- [Zehir et al., 2017] Zehir, A., Benayed, R., Shah, R. H., Syed, A., Middha, S., Kim, H. R., Srinivasan, P., Gao, J., Chakravarty, D., Devlin, S. M., et al. (2017). Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nature medicine*, 23(6):703–713.
- [Zhang and Shay, 2017] Zhang, L. and Shay, J. W. (2017). Multiple roles of *apc* and its therapeutic implications in colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8).
- [Zhang et al., 2022] Zhang, Z., Li, J., Jiao, S., Han, G., Zhu, J., and Liu, T. (2022). Functional and clinical characteristics of focal adhesion kinases in cancer progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.
- [Zhao et al., 2022] Zhao, H., Ming, T., Tang, S., Ren, S., Yang, H., Liu, M., Tao, Q., and Xu, H. (2022). Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular Cancer*, 21(1).
- [Zhou et al., 2022] Zhou, H., Liu, Z., Wang, Y., Wen, X., Amador, E. H., Yuan, L., Ran, X., Xiong, L., Ran, Y., Chen, W., et al. (2022). Colorectal liver metastasis: molecular mechanism and interventional therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1):70.
- [Álvarez et al., 2021] Álvarez, C., Quiroz, A., Benítez-Riquelme, D., Pincheira, R., Riffo, E., and Castro, A. F. (2021). *Sall* proteins; common and antagonistic roles in cancer. *Cancers*, 13(24).

Capítulo 7

Anexo

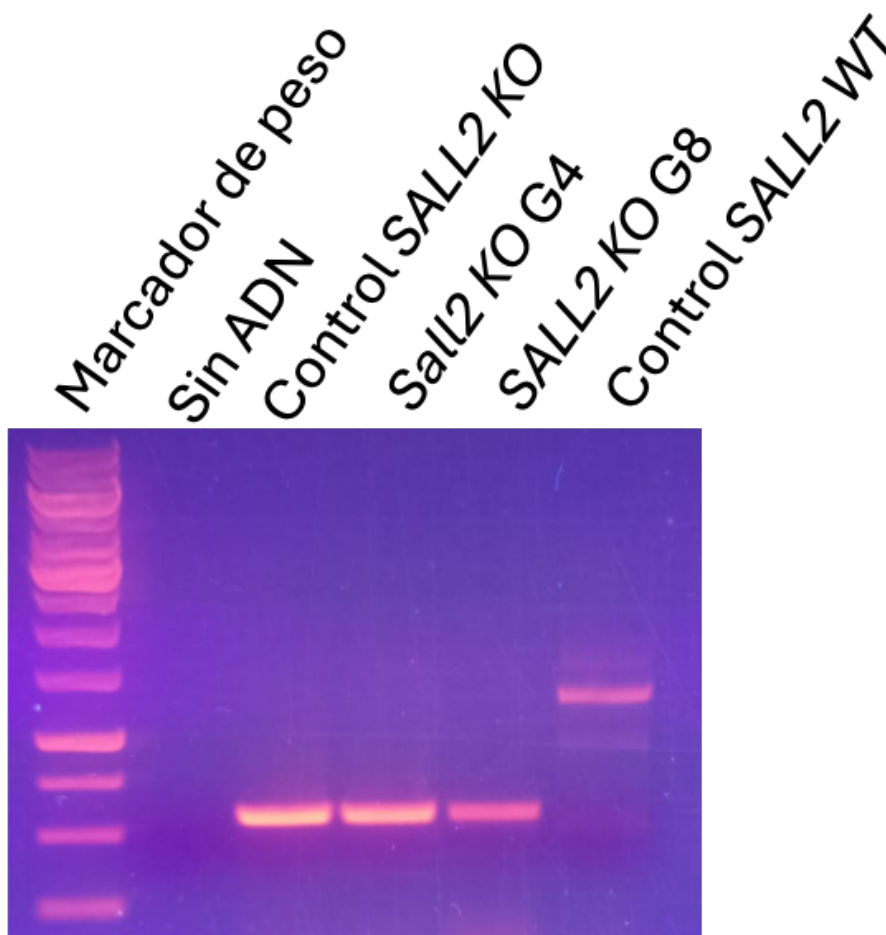


Figura 7.1: Genotipificación de los modelos SW480 con pérdida de función de SALL2

Se generó un modelo de pérdida de función de SALL2 a partir de la línea celular SW480 utilizando el sistema CRISPR/Cas9. Una vez obtenidos los clones, se seleccionaron G8 y G4, ya que en ambos se confirmó la ausencia de la proteína mediante análisis de western blot. En la figura se observa el resultado de la amplificación de la región específica del ADN genómico de las células editadas. El cambio en el tamaño de la banda es consistente con el control SALL2 knockout, lo que confirma la edición genética exitosa.

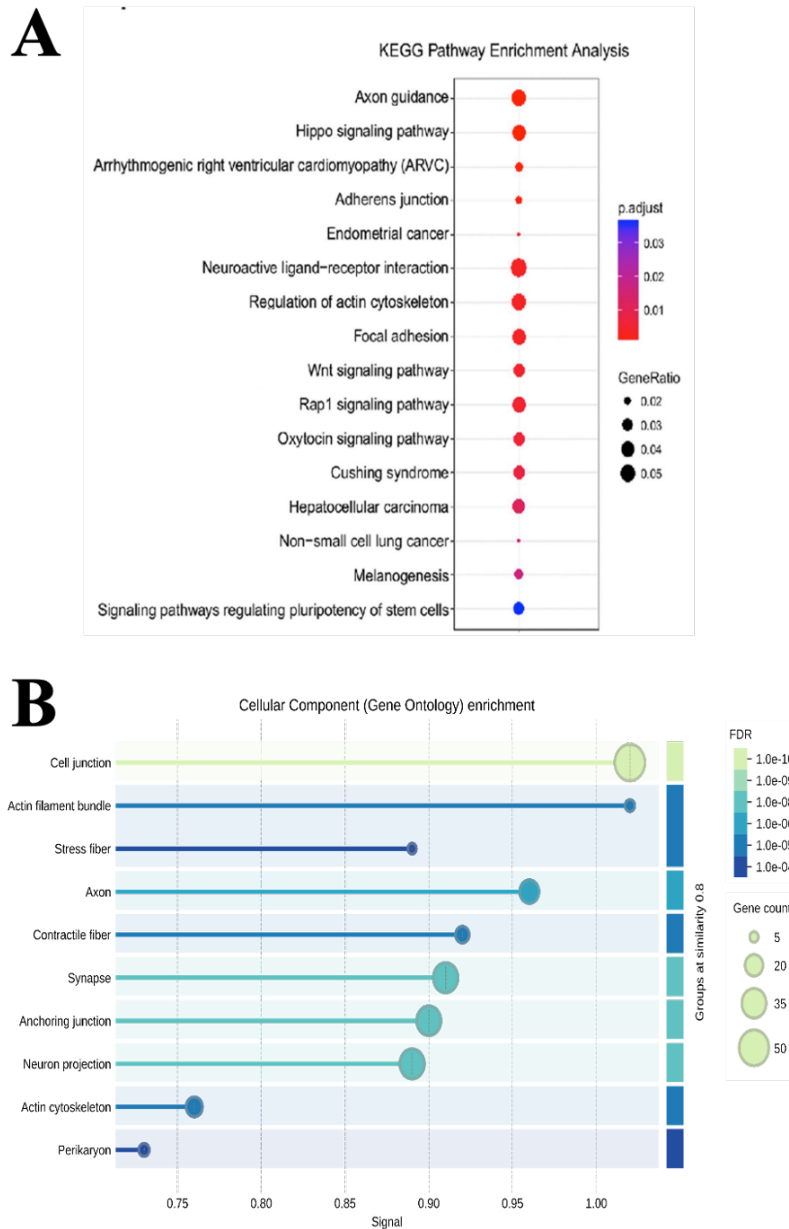


Figura 7.2: Análisis de enriquecimiento de vías asociadas a SALL2 en cáncer de colon

(S2) Análisis ontológico mediante KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Pathway Analysis a partir de datos de ChIP-Seq [Farkas et al., 2021b]. Los círculos representan los grupos de genes identificados, donde el tamaño indica la cantidad de genes involucrados y la intensidad del color rojo refleja la significancia estadística del análisis.

(S3) Análisis ontológico basado en datos de expresión diferencial en pacientes con cáncer de colon, obtenidos de la base de datos UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu>) y presentados mediante la plataforma STRING (<https://string-db.org>). De ambos se observa que SALL2 está altamente relacionado con las uniones adherentes, las adhesiones focales y las uniones celulares, evidenciada por un alto número de genes asociados y una elevada significancia estadística.

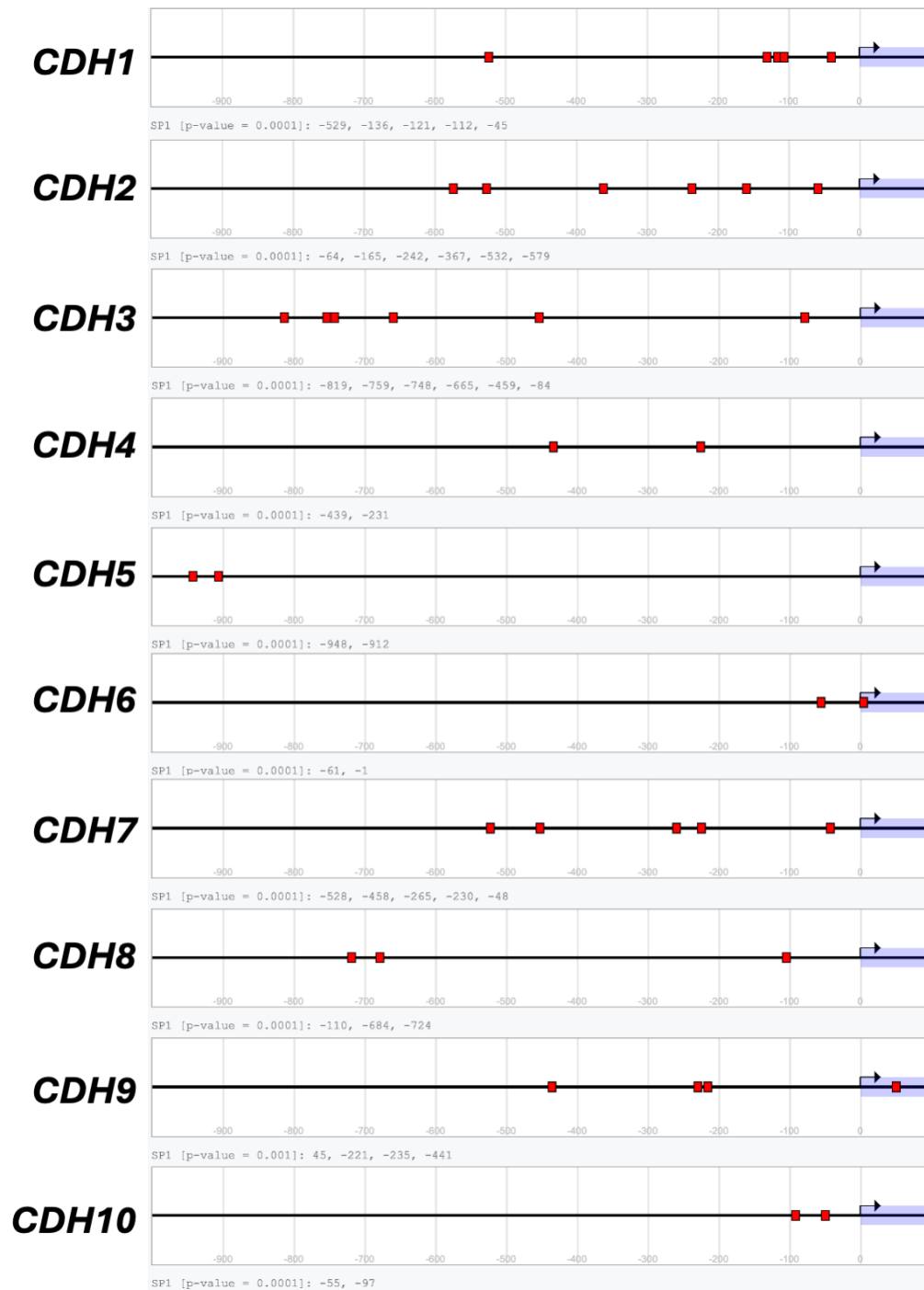


Figura 7.3: Presencia de sitios de unión para SALL2 en promotor de diferentes cadherinas

Se identificaron, mediante análisis *in silico*, sitios de unión para el factor de transcripción SALL2 en el promotor de diversos genes de cadherinas (CDH1 - CDH10), utilizando la base de datos Eukaryotic Promoter Database (<https://epd.expasy.org/epd/>). El análisis se realizó empleando la librería de motivos de factores de transcripción JASPAR CORE 2018 (vertebrados), evaluando la región genómica comprendida entre -1000 y +100 pb, considerando el sitio de inicio de la transcripción como posición 0. Se estableció un umbral de detección con un valor de $p < 0,0001$ para garantizar la significancia estadística de los sitios identificados.

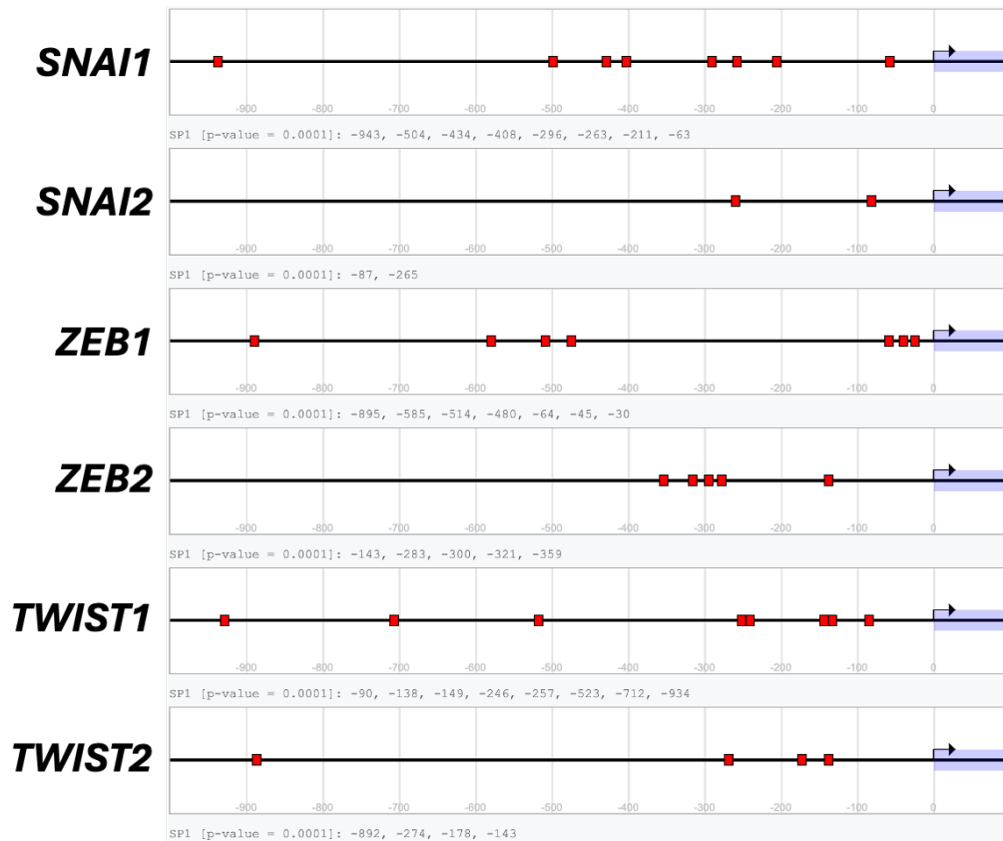


Figura 7.4: Presencia de sitios de unión para SALL2 en promotor de factores de transcripción clásicos asociados a la transición epitelio-mesénquima

Se identificaron, mediante análisis *in silico*, sitios de unión para el factor de transcripción SALL2 en el promotor de los factores de transcripción clásicos asociados a la EMT, utilizando la base de datos Eukaryotic Promoter Database (<https://epd.expasy.org/epd/>). Se evaluó en SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2, TWIST1 y TWIST2. El análisis se realizó empleando la librería de motivos de factores de transcripción JASPAR CORE 2018 (vertebrados), evaluando la región genómica comprendida entre -1000 y +100 pb, considerando el sitio de inicio de la transcripción como posición 0. Se estableció un umbral de detección con un valor de $p < 0,0001$ para garantizar la significancia estadística de los sitios identificados.

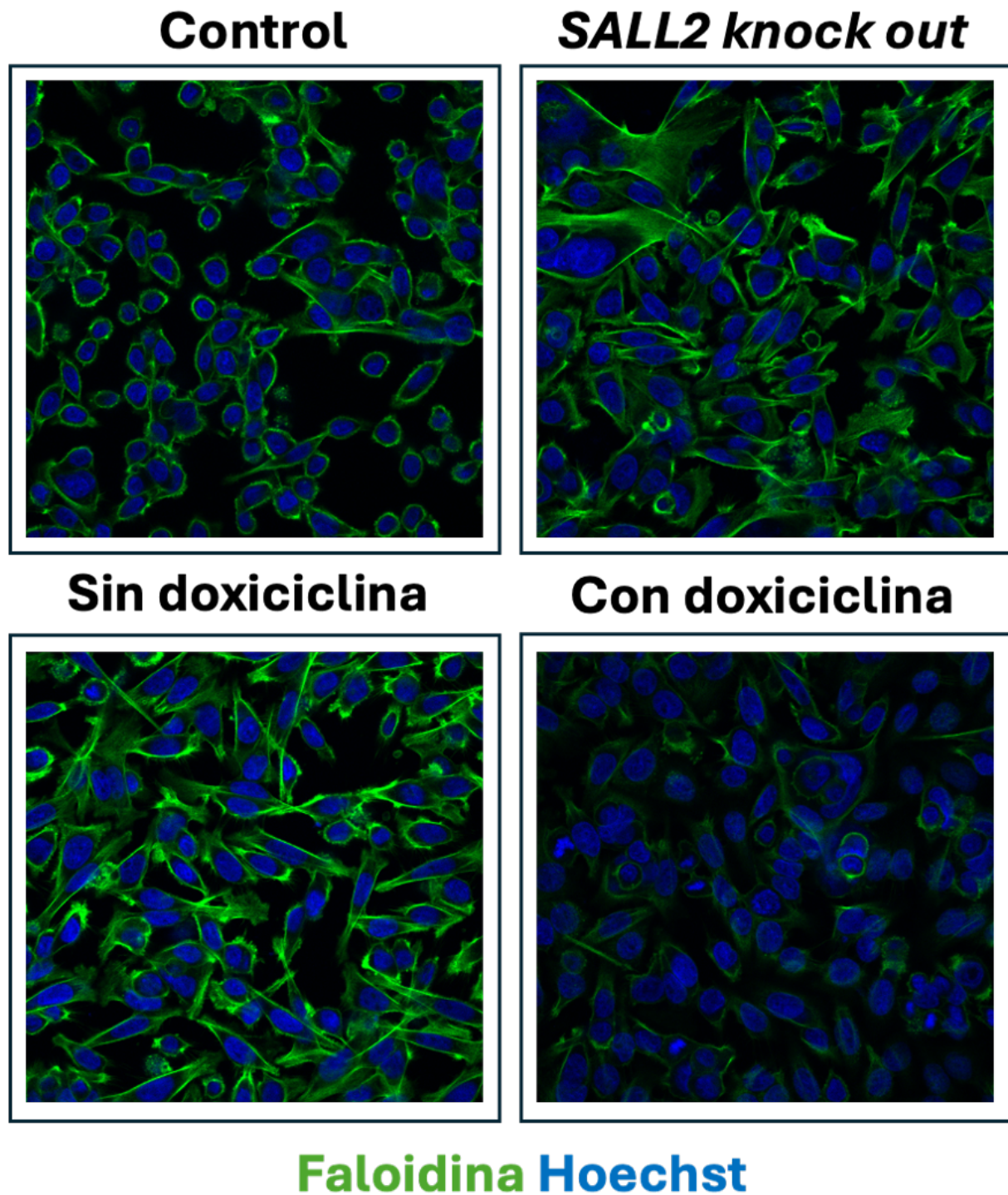


Figura 7.5: La expresión de *SALL2* se asocia con una menor intensidad de filamentos de actina en células SW480

Evaluación de los filamentos de actina mediante faloidina. (A) Imágenes representativas de la distribución de los filamentos de actina (verde) en los modelos con pérdida y ganancia de función de SALL2. Se utilizó hoechst para identificar los núcleos celulares. Para inducir la reexpresión de SALL2 en el modelo inducible se utilizó doxyciclina a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 horas. Las imágenes fueron tomadas con aumento de 40x en un microscopio confocal espectral LSM780 NLO Zeiss. n = 2.

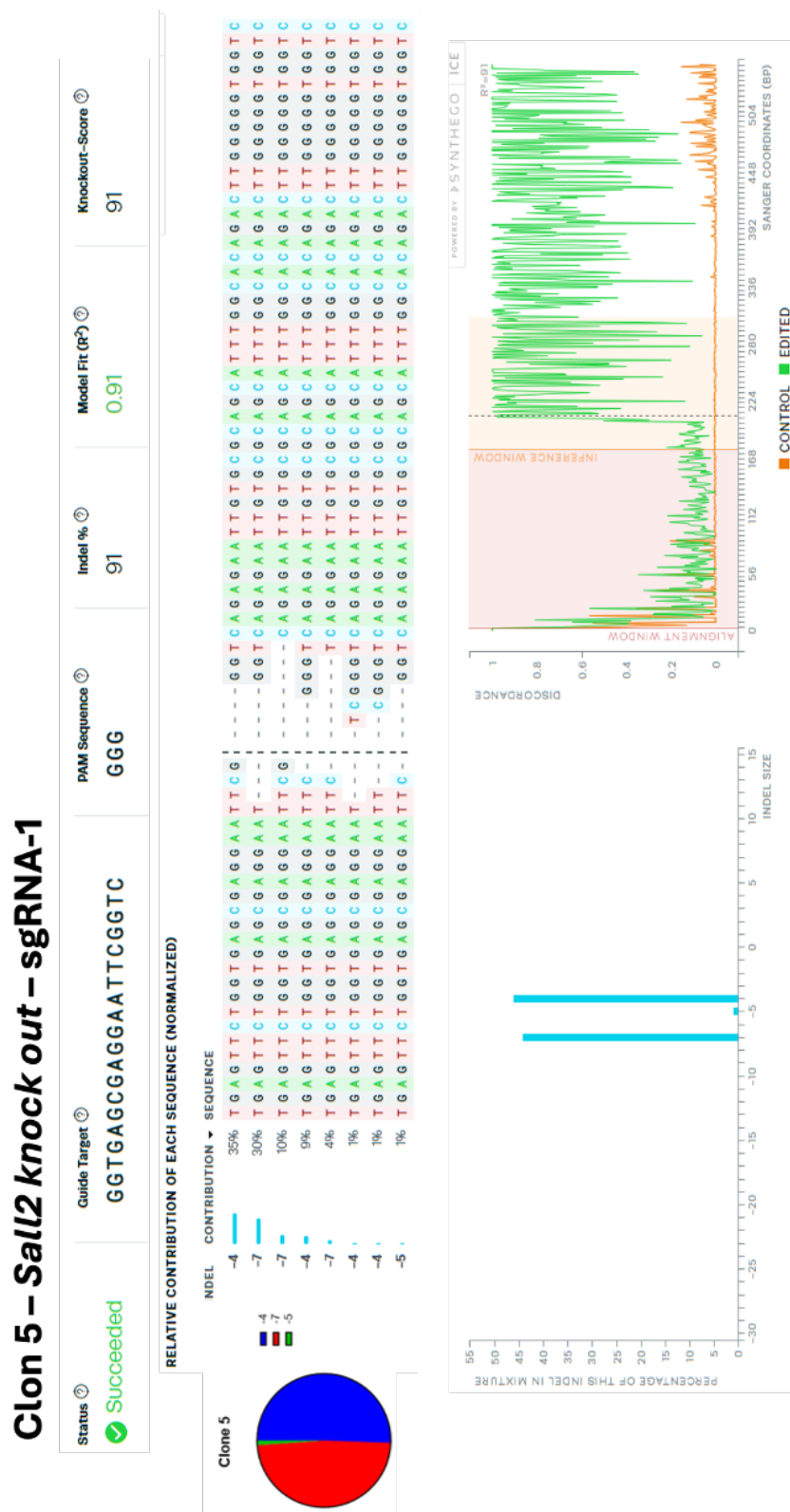


Figura 7.6: Secuenciación de organoide AKP *Sall2* knockout clon 5

La validación del modelo de organoide AKP *SALL2* knockout se realizó mediante secuenciación Sanger. Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con la herramienta Inference of CRISPR Edits (ICE) de la plataforma en línea Synthego, comparando el ADN genómico parental con el ADN editado. La figura muestra la edición genómica identificada, las distintas contribuciones de alelos y el estado de edición del modelo. Los datos corresponden a la edición del clon 5 generado a partir del sgRNA-1.

Clon 7 – *Sall2* knock out – sgRNA-2

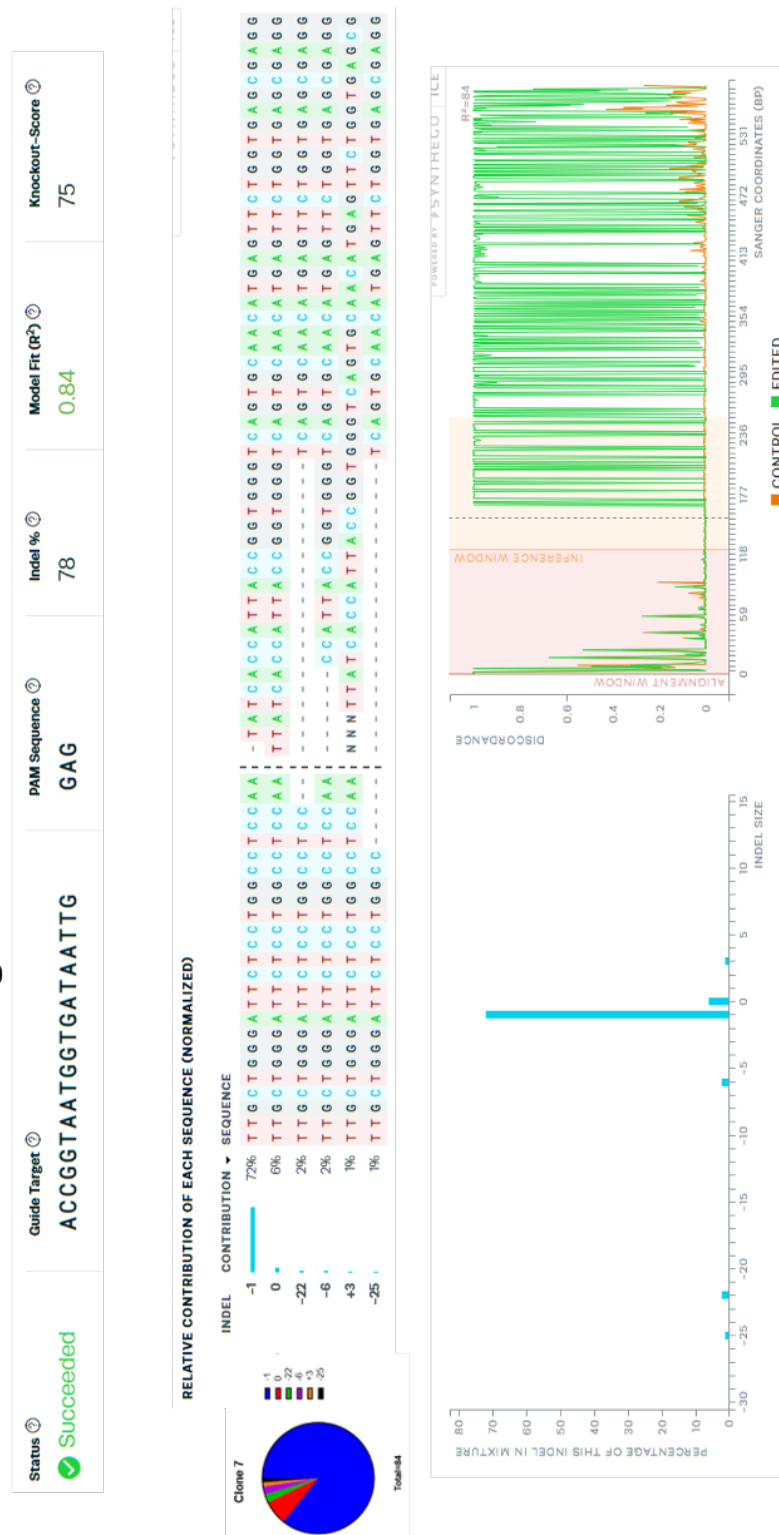


Figura 7.7: Secuenciación de organoide AKP *Sall2* knock out clon 7

La validación del modelo de organoide AKP *SALL2* knockout se realizó mediante secuenciación Sanger. Los electroferogramas obtenidos fueron analizados con la herramienta Inference of CRISPR Edits (ICE) de la plataforma en línea Synthego, comparando el ADN genómico parental con el ADN editado. La figura muestra la edición genómica identificada, las distintas contribuciones de alelos y el estado de edición del modelo. Los datos corresponden a la edición del clon 5 generado a partir del sgRNA-2.