

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO



***Efecto de PGE2 en la activación de la GTPasa  
pequeña Rab5 y en la internalización de E-cadherina  
en células HT29 de adenocarcinoma colorrectal***

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biomédicas**

**Sebastián Venegas Uribe  
Director de Tesis: Vicente A. Torres Gómez**

2020

## **Dedicatoria**

Esta tesis va dedicada a todo mi entorno espiritual y material, a quienes amo, a mis familiares, amigos y seres vivos y no vivos que me hacen ser quien soy hoy en día y en especial a mis colegas científicos.

Este trabajo de Tesis fue realizado mientras ocurrían sucesos históricos a nivel nacional e internacional que probablemente dejaron marca en el arte que realizamos todas las personas, incluyendo este escrito. Lo que queda al final de crisis tan intensas, es una selección de conductas en los seres humanos, que trascenderá en el tiempo, tal y como sucede con la evolución de las especies. Pero en este caso, sucede en plazos tanto más cortos, que esa selección podemos visualizarla y tocarla en el período de tiempo en que se nos concedió vida como seres individuales. En mi caso, visualicé justamente eso: El tiempo que se nos concedió vida como seres individuales, es suficiente para producir cambios que afectarán a toda la cultura, a la especie y al ecosistema. Que somos parte de un equilibrio y cada acción genera un efecto mariposa que no sabemos donde ni cuando acabará. Aprendí que cuando se vive con aceptación y conciencia de que somos parte de algo mucho más grande, se consuela al espíritu egoísta y vanidoso que el sistema en el que vivimos nos enseñó a ser y que especialmente abunda en nosotros los científicos, debido a que la carrera científica se basa, por concepto, en el alcance de una meta en un plazo. Ese espíritu, cree que nace y muere sólo y que por lo tanto debe desvivirse logrando metas para dejar una marca que haga que el día que dejemos de vivir, no lo haga nuestra existencia y esta se mantenga por el mayor tiempo posible sin caer en el olvido. Debemos aprender que ese legado se deja a cada segundo, con cada acción y vivir conscientes de aquello nos hace vivir más felices y conformes. Vivamos más conscientes de nuestra existencia y de la de nuestro entorno y no de nuestras metas, aceptemos que somos parte de un todo, dejemos ir más y tratemos de controlar menos y seremos más felices.

## Agradecimientos

En este espacio quisiera agradecer a quienes, apoyaron o facilitaron este importante período de mi vida que se está cerrando de forma simbólica con el término de este trabajo de Tesis.

Primero que todo gracias a mi eterno compañero de vida, Diego Romero Vera, cuyo apoyo incondicional fue fundamental durante todo este proceso, así como también a mis compañeros no humanos Mila y Toto, a mi familia y amigos, que son parte también de mi familia.

Gracias a mi Director de Tesis, Vicente Torres, por permitirme ser parte de su familia de investigadores y de quienes estoy también eternamente agradecido por cada uno de los consejos y experiencias vividas juntos, pero principalmente por las grandes amistades formadas. Gracias a Luis Solano, Nadia Hernández, Pedro Torres, Patricio Silva, Carlos Mateluna, Tania Flores, Martial Millet, Cecilia Arriagada, por cada uno de sus consejos, sugerencias y experiencias y a todos quienes pasaron dejando su legado, o que están recién entrando a este laboratorio y probablemente serán testigos de mi legado también. Gracias a todos los colegas y profesores que no eran de mi grupo de laboratorio pero con quienes compartí desde un café con un buenos días hasta importantes aprendizajes, en particular gracias a Sebastián Pino y Jimena Gatica por ser un importante apoyo emocional directamente relacionado al desarrollo de este trabajo.

Quisiera agradecer a la Universidad de Chile, a la Facultad de Medicina, la Facultad de Odontología, la Escuela de Postgrado y a todos los académicos y funcionarios quienes fueron partícipes de este proceso, una casa de estudios es donde más se evidencia la influencia que tiene cada una de nuestras acciones sobre otros individuos, por eso gracias a todos. En particular quisiera también agradecer a mi Comisión Evaluadora, gracias a quienes puedo entregar un trabajo creado con todo el rigor del método científico y a Cecilia Carter por su entrega y apoyo incondicional. Además quisiera agradecer a quienes permitieron y confiaron en mis capacidades para ser parte del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, a quienes me entrevistaron y a quienes me recomendaron durante el proceso de selección, a las profesoras María Cecilia Johnson y la profesora Katherine Marcelain.

## **Financiamiento**

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, del instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD), Facultad de Odontología Universidad de Chile, gracias al siguiente financiamiento

Proyecto FONDECYT #1180495

Proyecto FONDAP#15130011

Beca Doctorado Nacional CONICYT #21160449

Beca Gastos Operacionales CONICYT #21160449

## **Presentaciones**

Este trabajo fue presentado en la Sociedad Chilena de Biología Celular, **“XXXIII Annual Meeting, November 25-29, 2019”**.

**El trabajo derivado de esta Tesis fue enviado a la Revista: “*Biochemical and Biophysical Research Communications*” Bajo el título:**

*“PGE2 induces Rab5 activation and E-cadherin internalization in HT29 cell line”*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	8
Síntesis y acciones de la Prostaglandina E2 (PGE2).....	9
E-cadherina y su importancia en la progresión tumoral.....	11
La GTPasa pequeña Rab5 en cáncer y su relación con E-cadherina.....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	17
Objetivo general: .....	17
Objetivos específicos: .....	17
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	18
Objetivo específico I: Estudiar el efecto de PGE2 en la activación de Rab5 en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal.....	18
Objetivo específico III: Comparar los niveles de activación de Rab5 y expresión de E-cadherina entre las células HT29(ATCC) y su variante más invasiva, HT29(US) y evaluar el posible rol de PGE2 en estas diferencias. ....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
<b>RESULTADOS</b> .....	25
Objetivo específico I: Estudiar el efecto de PGE2 en la activación de Rab5 en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal.....	25
i. PGE2 induce la activación de la GTPasa Rab5.....	25
ii. PGE2 genera un aumento de partículas Rab5 y EEA1(+). ....	26
iii. PGE2 induce la activación de Rab5, preferencialmente, a través de la activación del receptor de PGE2, EP2. ....	27
i. PGE2 produce la internalización de E-cadherina y el aumento de su co-localización con EEA1.....	28
ii. Los niveles totales de E-cadherina no disminuyen luego del tratamiento con PGE2 10µM .....	31
Objetivo específico III: Comparar los niveles de activación de Rab5 y expresión de E-cadherina entre las células HT29(ATCC) y su variante más invasiva, HT29(US) y evaluar el posible rol de PGE2 en estas diferencias. ....	32
i. La línea celular altamente invasiva HT29(US), presenta basalmente una mayor activación de Rab5 y una menor expresión de E-cadherina. ....	32
ii. El estímulo con PGE2 exógena no es capaz de incrementar la actividad de Rab5 en células HT29(US), sin embargo la antagonización del receptor EP2 causa la disminución en el nivel de activación de Rab5 en este modelo celular.....	35
v. El silenciamiento parcial de Rab5 mediante shRNA en células HT29(US), incrementa la expresión de E-cadherina. ....	37
<b>DISCUSIÓN</b> .....	39
Importancia de la sobre-activación de Rab5 inducida por PGE2.....	39
Importancia del efecto de PGE2 en la internalización de E-cadherina.....	41

La sobre-activación de Rab5 y la pérdida de E-cadherina inducidas por PGE2 en células HT29(ATCC), se encuentran basalmente alterados en la variante más invasiva HT29(US), correlacionándose con estados más malignos de las células tumorales.....	44
Sobre-activación de Rab5 por PGE2 y su posible efecto río arriba de la internalización de E-cadherina y la EMT. ....	48
<b>CONCLUSIONES FINALES Y MODELO CELULAR DE LOS HALLAZGOS.....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>50</b>
1. Declaración personal del autor .....	50
2. Cinética de activación de Rab5 .....	52
3. Efecto de concentraciones de PGE2 mayores a 10µM en la activación de Rab5 .....	53
4. Cuantificación de la internalización de E-Cadherina de superficie .....	54
5. Generación de líneas celulares HT29(ATCC) con expresión estable de shRNA contra Rab5.....	55
6. Ensayo de migración celular en <i>Transwell</i> .....	57
7. Efecto de PGE2 sobre Rab5 en células HT29(US).....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>Figura 1.</b> Principales vías de señalización relacionadas al cáncer y activadas por los distintos receptores de PGE2.....	10
<b>Figura 2.</b> Principales mecanismos de regulación de la expresión y localización de E-cadherina involucrados en cáncer.....	13
<b>Figura 3.</b> Rab5 funciona como un “switch” molecular.....	15
<b>Figura 4.</b> Activación de Rab5 en células HT29(ATCC) estimuladas con PGE2 10µM.....	25
<b>Figura 5.</b> Microfotografías representativas de IFI donde se observa la detección de EEA1 (A y B) y Rab5 (C y D) en células HT29(ATCC) tratadas o no tratadas con PGE2 10µM.....	26
<b>Figura 6.</b> Niveles de Rab5 en células HT29(ATCC) estimuladas con PGE2 10µM en presencia de antagonistas para los receptores de PGE2 10µM.....	27
<b>Figura 7.</b> Microfotografías representativas del cambio en la localización de E-cadherina en células HT29(ATCC) tratadas con PGE2, desde la periferia celular hacia el citoplasma, aumentando su co-localización con EEA1.....	29-30
<b>Figura 8:</b> Nivel total de E-cadherina en células HT29(ATCC) estimuladas con PGE2 10 µM por 24 y 48h.....	31
<b>Figura 9.</b> Niveles basales de Rab5-GTP, E-cadherina y Vimentina en células HT29(ATCC) y HT29(US).....	33
<b>Figura 10.</b> Presencia de E-cadherina en células HT29(ATCC) y HT29(US).....	34
<b>Figura 11.</b> Efecto de PGE2 en la activación de Rab5 en células HT29(US).....	36
<b>Figura 12.</b> Expresión estable de shRNA contra Rab5 y su efecto en la expresión total de E-cadherina y Vimentina en células HT29(US).....	38
<b>Figura 13.</b> Posibles mecanismos de activación de Rab5 inducidos por PGE2.....	41
<b>Figura 14.</b> Posibles mecanismos de depleción de E-cadherina en células HT29, inducidos por PGE2.....	43
<b>Figura 15.</b> La línea celular HT29(ATCC) tiene menor potencial invasivo y representa un estado más epitelial que su contraparte más invasiva, las células HT29(US), las cuales presentan características mesenquimales.....	47
<b>Figura 16.</b> Resumen gráfico de hallazgos realizados en la tesis.....	49

## RESUMEN

**Introducción:** Prostaglandina E2 (PGE2) es un lípido que ejerce una serie de funciones biológicas y ha sido implicada en distintos aspectos de la progresión tumoral. La pérdida de la molécula de adhesión epitelial E-cadherina es considerada un paso clave durante la progresión tumoral de varios tipos de carcinomas, sin embargo, no se sabe si PGE2 es capaz de inducir la endocitosis de ésta y con ello su pérdida temprana en la membrana plasmática. Por otra parte, la GTPasa pequeña Rab5, es el regulador maestro de la endocitosis temprana y su sobre-activación se ha visto implicada en la progresión tumoral. Sin embargo, el efecto de la PGE2 en la activación de Rab5 no ha sido descrito, así como tampoco la participación de Rab5 en la endocitosis de E-cadherina.

**Hipótesis:** Prostaglandina E2 induce la activación de Rab5 y con ello la internalización de E-cadherina en células de adenocarcinoma colorrectal HT29(ATCC) y su variante altamente invasiva HT29(US).

**Metodología:** Células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal, fueron estimuladas con PGE2 y se evaluó la activación de Rab5 mediante las técnicas de pulldown e inmunofluorescencia. También se determinó el receptor de PGE2 involucrado en estas respuestas, mediante el uso de antagonistas farmacológicos. La internalización de E-cadherina inducida por PGE2 fue evaluada por inmunofluorescencia y pruebas de co-localización con el marcador de endosomas tempranos EEA1. Finalmente se evaluó el nivel de activación de Rab5 y la expresión de E-cadherina en la sub-línea celular HT29(US), derivada de células HT29(ATCC), pero con características más invasivas, determinándose además el posible rol de PGE2 y Rab5 sobre este estado.

**Resultados:** PGE2 induce la activación de Rab5, principalmente mediante el receptor EP2, y además, induce la internalización de E-cadherina hacia compartimientos EEA1 positivos, los cuales son dependientes de la función de Rab5. Además, se observó que las células HT29(US) presentan basalmente un mayor nivel de activación de Rab5 que depende de la activación del receptor EP2, así como una menor expresión de E-cadherina, la cual aumenta al silenciar la expresión de Rab5 mediante shRNA.

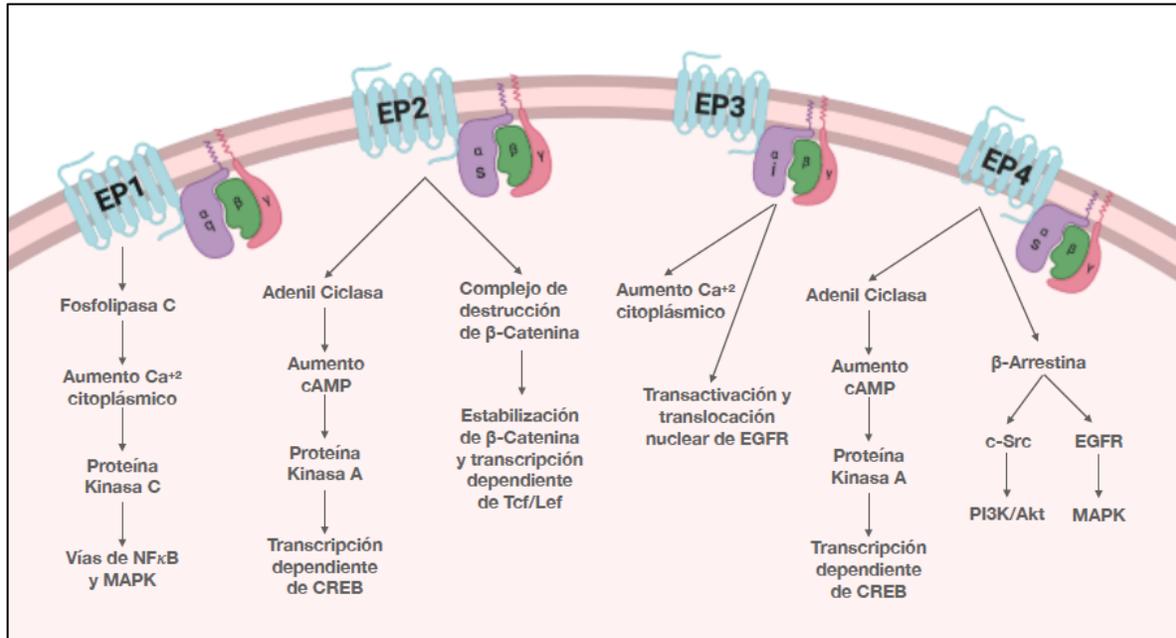
**Conclusiones:** En este estudio se propone un nuevo mecanismo por el cual PGE2 podría estar participando en la progresión tumoral. Esto es, la activación de la GTPasa pequeña Rab5, y la internalización de E-cadherina, ambos procesos necesarios para la adquisición de un fenotipo celular migratorio e invasivo durante la progresión tumoral de carcinomas, lo cual se refleja en la sub-línea celular HT29(US), la cual presenta más Rab5 en estado activo, menos E-cadherina, y son más invasivas que las células HT29(ATCC).

## INTRODUCCIÓN

### Síntesis y acciones de la Prostaglandina E2 (PGE2)

PGE2 es una molécula lipídica de la familia de los prostanoïdes, que ejerce una serie de funciones biológicas en el organismo y su función ha sido ampliamente relacionada con la aparición y desarrollo de distintos tipos de cáncer<sup>1,2</sup>. Su síntesis comienza con la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, acción mediada por la enzima fosfolipasa A2 (PLA2), generando ácido araquidónico (AA)<sup>1</sup>, el cual es sustrato de las enzimas Ciclooxygenasa-1 (COX1, isoforma constitutiva) y Ciclooxygenasa 2, (COX2, isoforma inducible), que producen prostaglandina H2 (PGH2). La PGH2 es el sustrato de enzimas terminales específicas que generan diferentes tipos de prostaglandinas, siendo las enzimas, PGE2 sintasa microsomal 1 (mPGES-1, inducible, a menudo por las mismas señales que activan a COX2), mPGES-2 (constitutiva) y su forma citosólica (cPGES), las responsables de generar PGE2<sup>3</sup>.

La PGE2 ejerce su acción mediante la activación de receptores acoplados a proteína G distribuidos heterogénea y diferencialmente en los diferentes tipos celulares, de los cuales se han caracterizado cuatro tipos, denominados EP1, EP2, EP3, EP4<sup>4</sup> (figura 1). Estos receptores activan vías de señalización específicas, generalmente relacionadas a vías clásicas de proliferación y supervivencia, como cAMP y PKC, además de la transactivación de otros receptores, por ejemplo, del tipo tirosina quinasa, activando vías como MAPK, Akt y PI3K<sup>5</sup> (figura 1). Por lo tanto, se ha descrito a PGE2 como una molécula de señalización clave para la homeostasis de los tejidos.



**Figura 1. Principales vías de señalización relacionadas al cáncer y activadas por los distintos receptores de PGE2.** El Receptor EP1 está acoplado a proteína  $G\alpha_q$  y activa a la enzima fosfolipasa C y con ello induce el aumento del  $Ca^{+2}$  citosólico y activación de las vías  $NF\kappa B$  y MAPK. El receptor EP2, acoplado a proteína  $G\alpha_s$  induce el aumento del cAMP y con ello la activación de la transcripción dependiente de CREB, además de inducir la estabilización de  $\beta$ -Catenina y con ello su translocación nuclear para activar la transcripción de genes relacionados a la progresión tumoral. El receptor EP3 está acoplado a proteína  $G\alpha_i$  e induce un aumento del  $Ca^{+2}$  citosólico y también se ha relacionado con la transactivación y translocación nuclear de EGFR. Finalmente el receptor EP4, acoplado a proteína  $G\alpha_s$ , induce el aumento del cAMP citosólico y también se ha relacionado con la activación de las vías de PI3K/Akt como la vía de MAPK, a través de  $\beta$ -Arrestina .

## **Prostaglandina E2 induce la progresión tumoral**

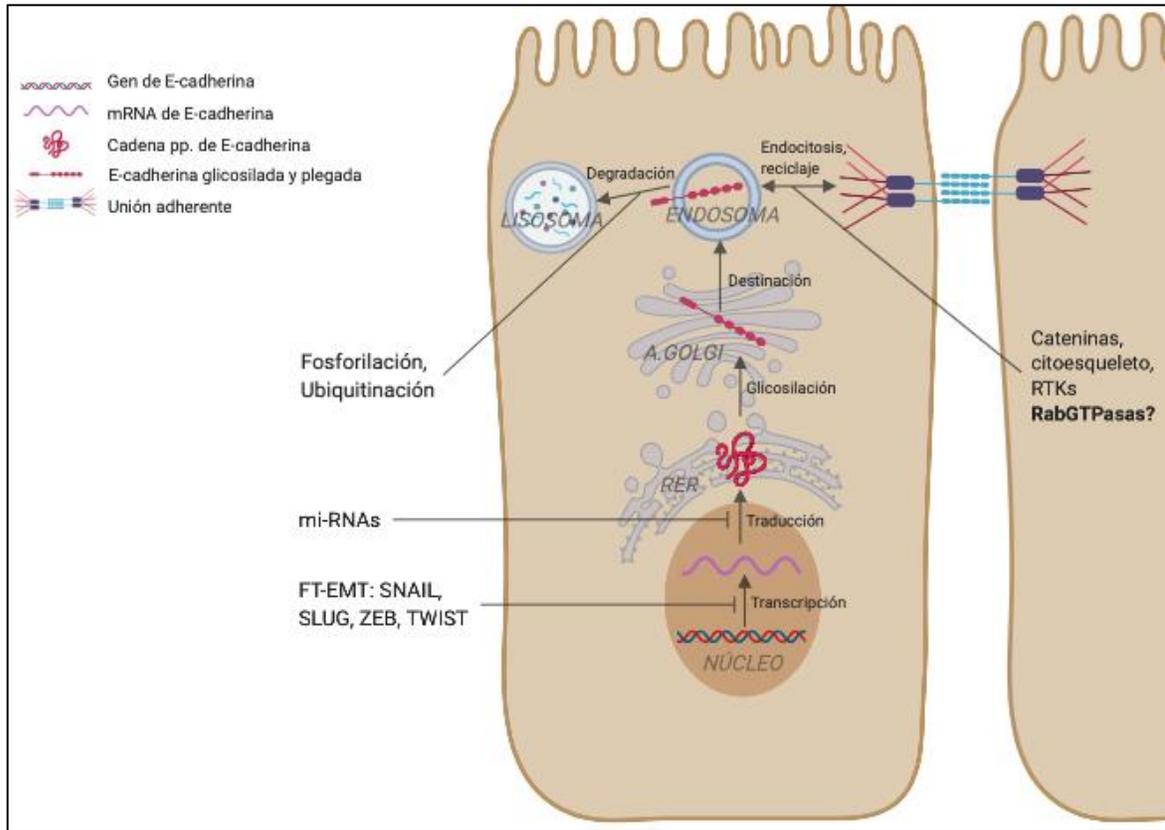
En las últimas décadas se ha demostrado que la PGE2 participa activamente induciendo la progresión tumoral<sup>1,2</sup>. Estas investigaciones, se iniciaron con estudios clínicos y epidemiológicos en los que se observó una disminución en el riesgo de cáncer de colon en pacientes con uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos (AINES)<sup>6,7</sup>, cuya función es la inhibición de las enzimas COX y con ello la producción de PGE2. Estos resultados se han reproducido experimentalmente en modelos murinos de cáncer<sup>8</sup>. Incluso, se ha demostrado que el uso de AINES se correlaciona con la regresión de adenomas, en pacientes con síndrome de poliposis familiar adenomatosa<sup>9,10</sup>. También se sabe que tejidos sometidos a inflamación crónica, donde la PGE2 es producida en altas cantidades, son especialmente susceptibles a la aparición de neoplasias, como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal y que además, el tejido neoplásico genera un microambiente inflamatorio que induce la proliferación, angiogénesis y evasión inmunitaria<sup>11</sup>. De hecho, la promoción del microambiente inflamatorio, fue incluida como uno de los aspectos característicos del cáncer por Hanahan y Weinberg en “Hallmarks of Cancer, The Next Generation” 2011<sup>12</sup>. Por todo lo anterior, se ha propuesto que los efectos de PGE2 que en condiciones normales participan en la homeostasis de los tejidos, en un contexto tumoral promueven la adquisición de características de malignidad y la progresión tumoral activando diversas vías de señalización dependientes de los receptores de PGE2 y el tipo celular involucrado.

## **E-cadherina y su importancia en la progresión tumoral**

E-cadherina es una glicoproteína de 120 kDa perteneciente a la familia de Cadherinas, uno de los cuatro grupos de moléculas de adhesión mayormente descritos<sup>13</sup>. Es una proteína transmembrana que participa en la formación de uniones adherentes, estructuras clave para mantener la cohesión y polaridad celular en los epitelios, siendo indispensable para la morfogénesis, remodelamiento y mantención de barreras tisulares<sup>14</sup>. Estructuralmente se reconoce una región extracelular de 80kDa, compuesta por cinco dominios extracelulares (EC1 a EC5) dependientes de calcio, cuya función es interactuar con otras moléculas de adhesión, siendo principalmente la unión a otras moléculas de E-cadherina la mayormente descrita (unión homotípica). Además, posee un dominio transmembrana y un dominio intracelular, el que interactúa con complejos de proteínas adaptadoras, el citoesqueleto de actina y moléculas de señalización<sup>13,15</sup>.

Un gran porcentaje de los cánceres humanos se originan a partir de tejido epitelial, y en la gran mayoría de ellos, las adhesiones mediadas por E-cadherina se pierden a medida que el tumor progresa<sup>16,17</sup>, existiendo una relación inversa entre los niveles de E-cadherina, el grado tumoral y las tasas de mortalidad del cáncer<sup>18,19,20</sup>. Los estudios indican que es necesario que las células cancerosas pierdan sus uniones intercelulares para adquirir capacidad migratoria e invasiva y realizar metástasis<sup>13</sup>. De hecho, en células tumorales en las que se restablece la función de E-cadherina, se observa una reversión hacia un fenotipo más benigno, por lo que E-cadherina es considerada una molécula supresora de tumores<sup>21</sup>. Existen diferentes niveles de regulación de la expresión de E-cadherina en la membrana plasmática, destacando la inducción de factores de transcripción de la Transición Epitelio Mesenquimal (FT-EMT), represores de la expresión de E-cadherina, como Snail y ZEB, los cuales producen modificaciones epigenéticas, como la hipermetilación en el promotor del gen de E-cadherina<sup>22</sup>. A nivel post-traducciona, se incluyen mecanismos de fosforilación de la cola citoplasmática de E-cadherina, ubiquitinación mediada por Hakai y consiguiente endocitosis y degradación lisosomal, respectivamente, como mecanismo a corto plazo que también implica la pérdida de la adhesión celular y con ello una modificación en la vía de señalización involucrada y la interacción con el citoesqueleto de actina<sup>13-21</sup>(figura 2).

La presencia de E-cadherina en la membrana plasmática es altamente dinámica y regulada por un equilibrio entre endocitosis, reciclaje y degradación, esto debido a que la célula necesita reorganizar su estructura a lo largo de su ciclo, y esta dinámica permite la plasticidad estructural necesaria para la homeostasis de los tejidos<sup>23</sup> (figura 2). En su porción citoplasmática posee dominios de unión a proteínas adaptadoras como AP-2, que se une a clatrina y permite la endocitosis dependiente de clatrina, para lo cual es necesaria la participación y reclutamiento de las GTPasas Dinamina y Rab5<sup>23</sup>. **Si bien, en procesos metastásicos, la pérdida de uniones mediadas por E-cadherina se ha atribuido mayormente a la represión de su expresión, ésta también se ha asociado a un aumento en la internalización local de E-cadherina**<sup>23,24,25</sup>. Los mecanismos que conducen a la endocitosis de E-cadherina en cáncer, su dependencia en función de reguladores de la endocitosis y el rol que cumple el microambiente tumoral en ello, aún son poco claros.



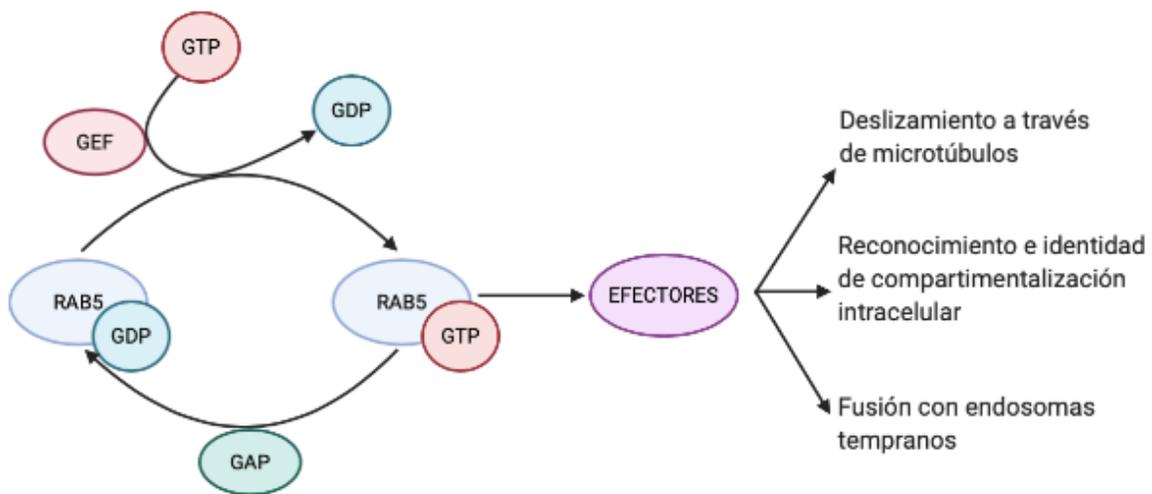
**Figura 2. Principales mecanismos de regulación de la expresión y localización de E-cadherina involucrados en cáncer.** Se puede observar que a nivel transcripcional operan los denominados Factores de Transcripción de la EMT (FT-EMT) SNAIL, SLUG, ZEB y TWIST, entre otros, los cuales reprimen la expresión génica de E-cadherina. A nivel traduccional, hay una serie de familias de miRNAs que regulan tanto la traducción de E-cadherina como de los FT-EMT, que se han visto implicados en cáncer. A nivel de destinación subcelular de E-cadherina, hay un equilibrio entre endocitosis, reciclaje y degradación lisosomal, donde se ha visto que la asociación con proteínas de la familia de las cateninas, con el citoesqueleto y con algunos receptores tirosina kinasa (RTK), estabiliza o desestabiliza la presencia de E-cadherina en la unión adherente. De la misma manera, modificaciones post-traduccionales como fosforilación y ubiquitinación llevan a la destinación de E-cadherina hacia la degradación lisosomal. El rol de las RabGTPasas que orquestan el tráfico vesicular ha sido poco explorado en relación a la endocitosis de E-cadherina. (cadena pp: polipeptídica)

## La GTPasa pequeña Rab5 en cáncer y su relación con E-cadherina.

El tráfico intracelular es un proceso celular altamente complejo y regulado, que implica la formación de una vesícula endosomal desde una membrana pre-existente, el desplazamiento de esta vesícula a través de los microtúbulos y posterior reconocimiento y fusión con otros compartimientos endomembranosos<sup>26</sup>. Todos estos procesos están orquestados por proteínas llamadas Rab, un grupo de GTPasas pequeñas, que son capaces de alternar entre un estado funcionalmente activo cuando se encuentran unidas a GTP, o un estado funcionalmente inactivo si están unidas a GDP<sup>27</sup>. Estas proteínas se localizan en la superficie de la vesícula y cuando son activadas, unen a proteínas efectoras, regulando los procesos ya mencionados<sup>28</sup>. La transición entre los estados unidos a GTP o GDP va a depender de la acción de otras proteínas denominadas, respectivamente, GEF (guanine nucleotide exchange factor), que inducen la forma activa, y GAP (GTPase activating protein), que estimulan la actividad GTPasa, induciendo transición hacia la forma inactiva<sup>26,29</sup>.

Rab5 es una de las proteínas Rab más caracterizadas y es una de las principales reguladoras del tráfico endosomal temprano<sup>26,27</sup>. En la figura 3 se muestra el ciclo de activación y desactivación de Rab5 y los principales procesos que esta proteína regula en su forma activa, a través de proteínas efectoras. En los últimos años se han asociado alteraciones en estos procesos regulados por Rab5, con la adquisición y mantención de características de malignidad en las células tumorales<sup>30</sup>. Por ejemplo, cuando el equilibrio existente entre la endocitosis y el reciclaje de moléculas de adhesión se ve alterado, esto puede contribuir a una mayor tasa de recambio de complejos de adhesión y a la desestabilización de las uniones intercelulares, facilitando la progresión tumoral y la adquisición de capacidad metastásica<sup>30,31</sup>. Se ha demostrado que Rab5, en su forma activa, cumple una importante función durante la migración celular, promoviendo el desensamble de uniones célula-matriz extracelular, específicamente adhesiones focales, contribuyendo a su re-utilización (vía reciclaje) en el extremo líder de la célula, promoviendo de esta manera la migración direccional e invasividad en células cancerosas<sup>32,33</sup>. También se ha demostrado que Rab5 es importante para la mantención de las características de malignidad de células tumorales en cultivo y que el *knockdown* de Rab5 viene acompañado de una disminución en la proliferación celular, viabilidad y crecimiento independiente de anclaje<sup>34</sup> así como en la migración, invasión y expresión de metaloproteasas necesarias para la invasión<sup>34,35</sup>. Interesantemente, algunos estudios han relacionado la activación de

Rab5 con la expresión de E-cadherina en diferentes modelos celulares. En células no tumorales se demostró que la endocitosis de E-cadherina inducida por factores de crecimiento es dependiente de la activación Rab5, esto debido al reclutamiento de una GEF de Rab5 llamada RIN2<sup>36</sup>. Recientemente, en un estudio *ex vivo*, se observó una relación inversa entre la expresión de Rab5, los niveles de E-cadherina y el pronóstico de los pacientes con cáncer pancreático, y que además, al suprimir la expresión de Rab5 en células tumorales, los niveles de E-cadherina aumentan y la capacidad invasiva disminuye<sup>18</sup>, relacionándose con esta importante molécula de adhesión ya mencionada anteriormente. En resumen, la sobre-activación de la GTPasa Rab5 sería responsable de la alteración de varios procesos celulares que permiten la progresión tumoral, entre ellos, una disminución en el contenido de E-cadherina, **sin embargo, su asociación con la internalización de E-cadherina, considerada necesaria para la migración e invasión, aún no está del todo clara**. Interessantemente, se ha demostrado la participación directa de Rab5 en la endocitosis de VE-Cadherina, otro tipo de cadherina presente en los endotelios vasculares<sup>37</sup>.



**Figura 3. Rab5 funciona como un “switch” molecular.** Rab5, como la mayoría de las GTPasas, cicla entre un estado inactivo cuando está unida a GDP y un estado activo cuando está unida a GTP. Proteínas GEF inducen la disociación del nucleótido GDP con la consecuente unión espontánea de GTP, mientras que proteínas GAP aceleran la actividad GTPasa intrínseca de Rab5, favoreciendo su transición hacia la forma inactiva. En su forma activa, Rab5 es capaz de reclutar a distintas proteínas efectoras que van a permitir entre otros procesos, el deslizamiento de las vesículas a través de los microtúbulos, la generación de fosfolípidos específicos que dan identidad a la membrana vesicular y permiten su reconocimiento con otros compartimientos, y la fusión de la vesícula con estos compartimientos, como sucede con los endosomas tempranos.

Como ya se ha mencionado, PGE2 es un inductor de la progresión tumoral en varios tipos de cáncer, promoviendo la proliferación, sobrevivencia, migración e invasión de las células tumorales<sup>1</sup>. Dentro del abanico de efectos que PGE2 pudiera tener sobre las células cancerosas, no se sabe si esta es capaz de inducir la activación de Rab5, cuya sobreactivación tiene efectos compartidos con los de PGE2. Sin embargo se ha demostrado en otros tipos celulares, no malignos, que PGE2 es capaz de inducir el agrandamiento de endosomas tempranos, evento celular dependiente de la activación de Rab5<sup>59</sup>. Por otro lado, con respecto a E-cadherina, se ha reportado que PGE2 pudiera estar relacionada con su pérdida. Específicamente, PGE2 disminuye la expresión de E-Cadherina en células de cáncer gástrico mediante la inducción de la expresión del factor de transcripción represor de E-cadherina, Snail<sup>39</sup>. Además, se ha establecido que PGE2, mediante su receptor EP2, estimula la progresión tumoral en células de cáncer de colon mediante la activación de la vía de  $\beta$ -Catenina, facilitando la translocación de  $\beta$ -Catenina desde las uniones adherentes hacia el núcleo, donde funciona como factor de transcripción para activar diversas vías que favorecen la supervivencia y capacidad invasiva de las células tumorales<sup>40</sup>. Interesantemente, estudios recientes de nuestro laboratorio indican que la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina en un modelo de lesiones orales premalignas, es dependiente de Rab5<sup>41</sup>.

La finalidad de este trabajo, fue establecer si PGE2 es capaz de inducir la activación de Rab5 y la internalización de E-cadherina y si esta última además es dependiente de la activación de Rab5, ya que esta GTPasa es la reguladora maestra de la endocitosis temprana y se ha visto implicada en la endocitosis acelerada de otros tipos de moléculas de adhesión como integrinas y VE-Cadherina. Ambos eventos son clave durante la adquisición de características de malignidad en las células tumorales debido a su estrecha relación con la capacidad migratoria e invasiva. Para esto, utilizamos como modelo la línea celular HT29(ATCC) derivada de adenocarcinoma colorrectal, donde los efectos de PGE2 han sido clásicamente descritos en la progresión tumoral, del que además poseemos una variante celular derivada de focos metastásicos, con características más invasivas, HT29(US), las que han sido descritas como un modelo celular en un estado más avanzado de malignización<sup>35,42</sup>, donde confirmamos a nivel celular que tanto la sobreactivación de Rab5 como la depleción de E-cadherina son pasos importantes durante la malignización del adenocarcinoma colorrectal.

## **HIPÓTESIS**

***Prostaglandina E2 induce la activación de Rab5 y con ello, la internalización de E-cadherina en células de adenocarcinoma colorrectal HT29(ATCC) y su variante altamente invasiva HT29(US).***

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Evaluar el efecto de PGE2 en la activación de Rab5 y en la internalización de E-cadherina en células HT29(ATCC) y su variante celular altamente invasiva HT29(US).

### **Objetivos específicos:**

- I. Estudiar el efecto de PGE2 en la activación de Rab5 en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal.
- II. Evaluar el efecto de PGE2 en la localización sub-celular de E-cadherina en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal y la posible relación con la activación de Rab5.
- III. Comparar los niveles de activación de Rab5 y expresión de E-cadherina entre las células HT29(ATCC) y su variante más invasiva, HT29(US) y evaluar el posible rol de PGE2 en estas diferencias.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

### **Objetivo específico I: Estudiar el efecto de PGE2 en la activación de Rab5 en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal.**

1. Para evaluar si PGE2 es capaz de activar a Rab5, células HT29(ATCC) fueron estimuladas con PGE2 en concentración 10 $\mu$ M durante diferentes tiempos, y se utilizó la técnica de pulldown (precipitación por afinidad), descrita previamente para identificar y semi-cuantificar los niveles de Rab5-GTP, conformación funcionalmente activa de la GTPasa<sup>48</sup>. Para evaluar si la concentración de PGE2 utilizada fue la óptima para lograr la activación de Rab5, se realizaron estímulos con PGE2 a concentraciones de 0, 10, 20 y 40 $\mu$ M durante 6h y se evaluó por pulldown la activación de Rab5.
2. Dado que los receptores de PGE2, EP2, EP3 y EP4 han sido ampliamente involucrados en vías relacionadas al cáncer<sup>43</sup>, se evaluó cuál de estos receptores está mayormente implicado en la activación de Rab5. Para ello, se evaluó el efecto de los antagonistas de EP2, EP3 y EP4, AH6809, L-798,106 y L-161,982, respectivamente, en la activación de Rab5 inducida por PGE2.
3. Finalmente, para obtener una apreciación visual de la activación de Rab5, se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), de manera de evaluar la cantidad de partículas citoplásmicas positivas para Rab5 y su proteína efectora y marcador de endosomas tempranos EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*).

### **Objetivo específico II: Evaluar el efecto de PGE2 en la localización sub-celular de E-cadherina en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal y la posible relación con la activación de Rab5.**

1. Para evaluar si PGE2 es capaz de producir un cambio en la localización subcelular de E-cadherina, se cultivaron células HT29(ATCC) en cubreobjetos de 18mm, las que fueron estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M por 6h y se utilizó la técnica de IFI para evaluar visualmente la localización de E-cadherina. Además, se realizó un marcaje contra EEA1, para evaluar la co-localización con E-cadherina, de manera de determinar si esta última está siendo endocitada a endosomas tempranos, compartimientos dependientes del funcionamiento de Rab5.

2. Para determinar el efecto de PGE2 sobre los niveles totales de E-cadherina en células HT29(ATCC), se utilizó la técnica de Western blot.

**Objetivo específico III: Comparar los niveles de activación de Rab5 y expresión de E-cadherina entre las células HT29(ATCC) y su variante más invasiva, HT29(US) y evaluar el posible rol de PGE2 en estas diferencias.**

La sub-línea celular HT29(US) fue previamente establecida por otro grupo de investigación a partir de focos metastásicos en pulmón de ratones inyectados dorsalmente con células HT29(ATCC), las que fueron aisladas y denominadas como HT29(US)<sup>44,45</sup>. Estas células tienen la característica de presentar un fenotipo más invasivo que las HT29(ATCC)<sup>46</sup>, por cual para esta tesis han sido consideradas como un modelo celular con mayor potencial invasivo que su variante original HT29(ATCC).

1. Primero se compararon los estados basales de activación de Rab5 y de expresión de E-cadherina en ambas líneas celulares, mediante pulldown y Western Blot, respectivamente. Además, se observó mediante IFI la expresión de E-cadherina en ambas líneas celulares. Durante la progresión tumoral, la pérdida de E-cadherina es considerada como parte de un proceso biológico mayor denominado transición epitelio mesenquimal (EMT), en el que las células pierden características epiteliales y ganan la expresión de genes mesenquimales, adquiriendo funciones como capacidad migratoria, lo que se cree, permite la metástasis en algunos tipos de cáncer<sup>19</sup>, incluyendo el cáncer colorrectal. Para evaluar si además de la pérdida de E-cadherina y la alta capacidad invasiva, estas células presentan algún otro marcador de EMT, decidimos agregar la medición por Western Blot del marcador mesenquimal Vimentina, de manera de establecer si la línea celular HT29(US) presenta un perfil de diferenciación menos epitelial y más mesenquimal que su contraparte HT29(ATCC), lo cual es considerado más maligno en un contexto tumoral, de donde proviene esta línea celular.
2. Para evaluar si el estado de activación de Rab5 es sensible al estímulo con PGE2 exógena en este modelo de progresión, células HT29(US) fueron estimuladas con PGE2 10µM. Luego, para prevenir el posible efecto de PGE2 producida endógenamente por estas células, se evaluó el nivel basal de activación de Rab5 en células HT29(US) en presencia del antagonista selectivo de EP2, AH6809 10µM.

3. Para evaluar si Rab5 tiene implicancias en la expresión de E-cadherina en las células HT29(US), se generaron células HT29(US) con expresión estable de un shRNA específico contra Rab5 y en estas se midió la expresión de E-cadherina y además se agregó el marcador mesenquimal Vimentina, para determinar si el efecto de Rab5 sobre E-cadherina, se enmarca sobre un posible proceso de EMT.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivos celulares:** La línea celular HT29 (ATCC# HTB-38), derivada de adenocarcinoma colorrectal y la sub-línea altamente invasiva HT29(US)<sup>46</sup>, fueron cultivadas en medio de cultivo *DMEM 1X High Glucose* (Corning #10090CM) suplementado con Suero Fetal Bovino (Gibco #10437-028) al 10% e incubadas a 37°C y 5% pCO<sub>2</sub>, en placas Petri cuyo tamaño se determinó según la estrategia experimental (Nunc<sup>TM</sup>, Dinamarca). Para los pasajes se utilizó tripsina (Corning #25053CI) y para los lavados, PBS 1X (Corning #21040CVR).

**Estímulos:** Se agregó Prostaglandina E2 (Sigma-Aldrich #P0409) directamente a las células en cultivo, en las concentraciones especificadas para cada experimento. Las células fueron previamente privadas de suero por un tiempo mínimo de 1h y se incubaron con PGE2 (en medio libre de suero) durante diferentes tiempos. Para los estudios de antagonistas se utilizaron los compuestos AH6809 10µM, L-798,106 10µM y L-161,982 10µM (Chayman Chemicals), antagonistas de EP2, EP3 y EP4, respectivamente, disueltos en DMSO. Como control, se utilizó la condición vehículo sólo (DMSO).

**Pulldown:** Se utilizó la proteína de fusión GST-R5BD, unida a esferas de GSH-Sefarosa, sistema que permite la captura de Rab5 activo, es decir Rab5-GTP, de manera específica<sup>46,45</sup>. Para la cosecha se lavó con PBS y se agregó buffer de homogenizado que incluye: HEPES 25mM pH7.4, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NP-40 1%, Glicerol 10%, DTT 1mM, OVA 1mM, PMSF 1X, BAL 1X y agua destilada. El homogenizado fue centrifugado a 13000 rpm por 45 seg a 4°C. Luego se incubó el sobrenadante con las esferas GSH-GST-R5BD-Sefarosa durante 15 min a 4°C en rotación. Posteriormente se realizó 3 lavados con buffer de lisis y 2 lavados con buffer sin NP-40, centrifugando a 3000 rpm por 30 segundos cada vez. Luego, se re-suspendieron las esferas en buffer de carga, se hirvieron a 100°C y se separaron mediante SDS-PAGE para Western Blot.

**SDS-PAGE, Western Blot:** Los extractos de proteína obtenidos por pulldown o por homogenizados totales fueron separados mediante SDS-PAGE, corriéndose en un gel concentrador de poliacrilamida al 7% a 70V, para luego pasar al gel separador de poliacrilamida al 12% para ensayos de pulldown y al 10% para homogenizados totales, a 100-120V. Luego, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a una potencia de 30V, toda la noche en hielo. La transferencia fue confirmada por tinción con

Rojo Ponceau. Posteriormente se bloqueó la membrana con gelatina al 5% y se determinaron las proteínas de interés utilizando los siguientes anticuerpos: anti-Rab5 monoclonal 1:500 (Santa Cruz Biotechnology #sc-46692), anti-E-Cadherina monoclonal 1:3000 (BD Biosciences #BD610182), anti-Vimentina monoclonal (Cell Marque #V9) y anti- $\beta$ -Actina (Santa Cruz Biotechnology #sc-47778)

**Inmunofluorescencia indirecta (IFI):** Las células se cultivaron en cubreobjetos hasta lograr una confluencia >80% y se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS, durante 10 minutos, para luego ser permeabilizadas o no, con Tritón 0,1%, según requerimiento. Posteriormente se realizó bloqueo con albúmina de suero bovino 5% 30 minutos y se incubaron los anticuerpos primarios para identificar E-Cadherina, Rab5 y EEA1. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y luego se montaron en portaobjetos. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Leica Microsystems, equipado con cámara DC300F) para el análisis y conteo de partículas y en casos puntuales, microscopía confocal (Nikon confocal microscope C2/C2si)).

Para los análisis de cantidad e intensidad de partículas, como co-localización de marcas fluorescentes, se realizó una selección (ROI) de 4 células por imagen obtenida y se analizaron 4 imágenes por experimento. Para el análisis de E-cadherina de superficie, se realizó un conteo visual de células que poseían al menos un borde continuo de E-cadherina en su periferia, lo que arbitrariamente consideramos que daba cuenta de unión de tipo epitelial. Luego estos datos fueron promediados y analizados mediante *GraphPadPrism 6*.

**Citometría de flujo para identificación de E-cadherina de superficie:** Se cosecharon células adheridas mediante raspado suave en PBS a 4°C. Manteniendo el sistema en hielo, la suspensión se llevó a tubos eppendorf y para separar las células unidas, se usó una jeringa de 1mL, se tomó y se soltó la suspensión suavemente, 3 veces, y posteriormente se centrifugó 5min a 3000 rpm, 4°C. Luego, se eliminó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en paraformaldehído al 0,5% 20min a 4°C. Para el objetivo del experimento las células no fueron permeabilizadas, por lo que luego de 2 lavados, se realizó el bloqueo en BSA 2% en PBS por 30min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-E-Cadherina monoclonal (Santa Cruz Biothecnology, sc-8426), en solución de bloqueo por 30min a temperatura ambiente. Este anticuerpo está dirigido contra un epítoto extracelular de la molécula. Luego se realizaron 3 lavados y centrifugación a 1500 rpm en PBS a temperatura ambiente, para posteriormente incubar el

anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo, en solución de bloqueo, 30min a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron tres lavados en PBS, como se indicó anteriormente y las muestras fueron resuspendidas en buffer de citometría de flujo, para su posterior análisis. Las muestras fueron adquiridas en un Citómetro de Flujo FACSCantoA (Beckton Dickinson) y analizadas con el software WinMDI2.8.

**Generación de partículas lentivirales codificantes para shRNA contra Rab5:** Se utilizaron células HEK293T sembradas 24h antes de la transfección en una placa de 10cm, de manera de tener una confluencia de un 60% al día de la transfección. Para preparar el DNA con el que se transfectaron las células, se utilizó Lipofectamina 2000, según las indicaciones del fabricante (Lipofectamine 2000, Invitrogen Life Technologies, 11668-027). Se utilizaron los vectores de empaquetamiento pMDL, pRSV y pVSV-G (Open Biosystems), que contienen genes que codifican para todas las proteínas requeridas para formar una partícula lentiviral y además un plasmidio lentiviral que contiene la secuencia de shRNA contra Rab5. Se dispone de 3 secuencias distintas (Open Biosystems): B5, F8 y F10, más la secuencia Scramble (Scr) (integridad de las cuales se muestra en el anexo 1), cada una de las cuales fue transfectada con los 3 vectores de empaquetamiento en una placa de cultivo de HEK293T. La mezcla de secuencias contenidas en Lipofectamina fue directamente agregada al medio de cultivo y las células fueron incubadas a 37°C por 48h. Luego de este período, se cosecharon las partículas lentivirales, tomando el sobrenadante que contiene el virus, usando una jeringa de 10mL, para después filtrar el contenido con un filtro de 0,45µm, en un tubo falcon de 15mL para posteriormente ser congelado.

**Infección de células con lentivirus:** Células HT29(ATCC) y HT29(US) recientemente sembradas y adheridas en una placa de 10cm, fueron cultivadas en presencia de un 30% de medio condicionado con lentivirus generados en células HEK293T durante 48-72h, para lograr la infección. Posteriormente, las células fueron incubadas en presencia de Puromicina 2µg/mL, concentración mínima letal para ambas líneas celulares, determinada en nuestro laboratorio. Debido a que el plasmidio lentiviral posee una secuencia de resistencia a Puromicina, solamente las células debidamente infectadas resistieron esta concentración de Puromicina, generándose una selección de estas células. El medio de cultivo fue cambiado periódicamente, hasta que las células seleccionadas se estabilizaron y comenzaron a proliferar de manera lineal en el tiempo, para luego multiplicar esta selección y criopreservar este material hasta su uso.

**Estadística:** Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa *GraphPadPrism* 6. Como los datos no tienen distribución normal, debido al número de experimentos independientes, se determinó si existen diferencias estadísticas entre los distintos grupos con el *test ANOVA*, y para la comparación de dos variables se utilizó el *test t student*. Se utilizó la prueba de *Kruskal-Wallis* para identificar significancia entre los distintos grupos y el *test Mann-Whitney* para las comparaciones entre dos variables. Se consideró como significativo un  $p\text{-value} < 0,05$  en un intervalo de confianza del 95%, lo que se indicó con un asterisco sobre el respectivo gráfico (\*). Los resultados están expresados en media  $\pm$  desviación estándar.

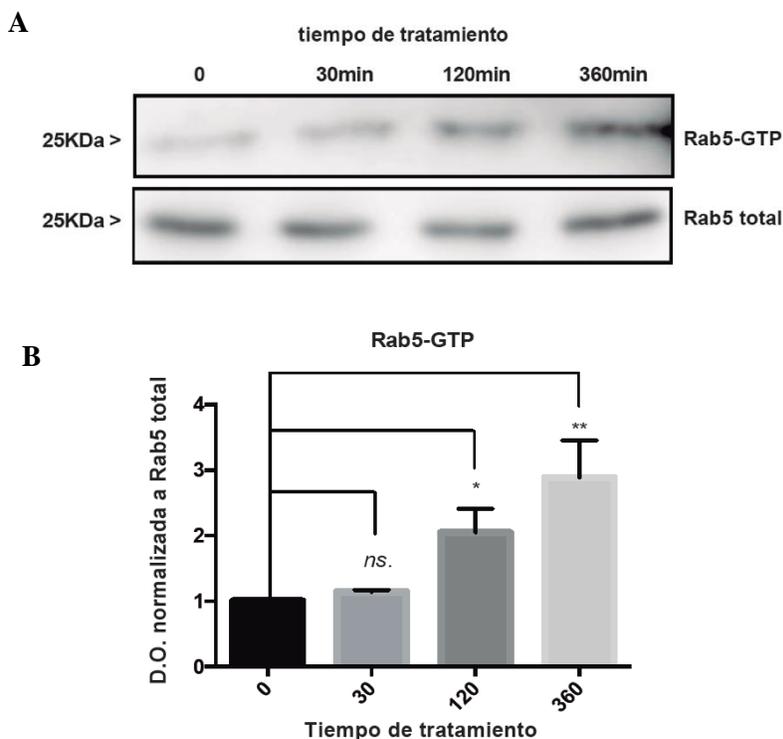
**Diseño de Esquemas:** Los esquemas mostrados en esta tesis fueron diseñados en la plataforma online <https://biorender.com>

## RESULTADOS

**Objetivo específico I: Estudiar el efecto de PGE2 en la activación de Rab5 en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal.**

### **i. PGE2 induce la activación de la GTPasa Rab5**

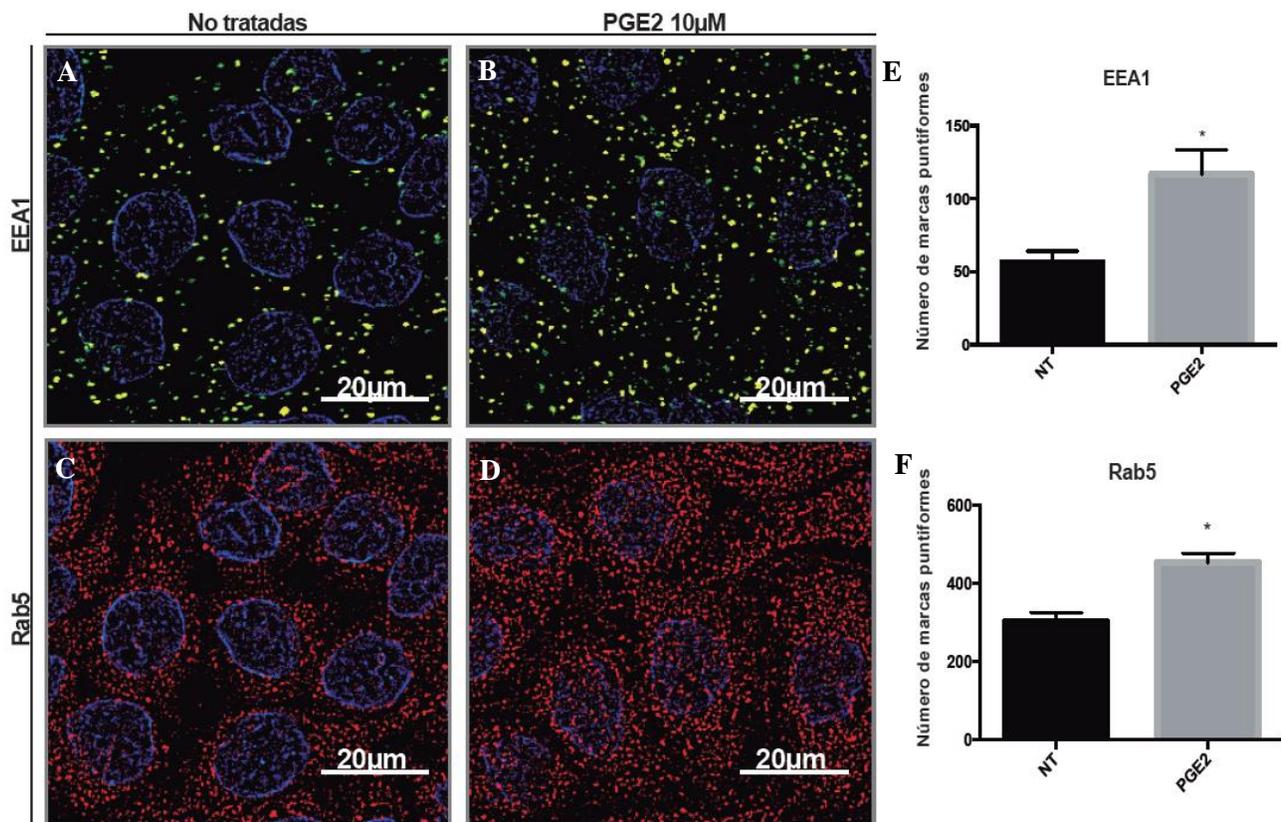
Para determinar si PGE2 tiene efectos en el estado de activación de Rab5, células HT29(ATCC) fueron estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M durante distintos períodos de tiempo, analizando el contenido de Rab5-GTP mediante pulldown. De esta forma, se observó que PGE2 induce un aumento progresivo en los niveles de Rab5-GTP, alcanzándose un máximo de activación a las 6h de estímulo (Figura 4). Además, se estudiaron los niveles de Rab5-GTP en tiempos de estímulo mayores, de hasta 44h y con concentraciones superiores a 10 $\mu$ M (20 y 40 $\mu$ M) pero no se observaron diferencias significativas (Anexo 2 y 3 respectivamente).



**Figura 4. Activación de Rab5 en células HT29(ATCC) estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M.** A: Imagen representativa de Western Blot que muestra los niveles de Rab5-GTP y Rab5-total obtenidos por la técnica de pulldown, en células estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M por 0, 30, 120 y 360 minutos. B: Gráfico que representa las medias de las densidades ópticas (D.O.) de Rab5-GTP relativo a su respectivo Rab5-total de 4 experimentos independientes (ANOVA, Kruskal Wallis test, \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,001).

## ii. PGE2 genera un aumento de partículas Rab5 y EEA1(+).

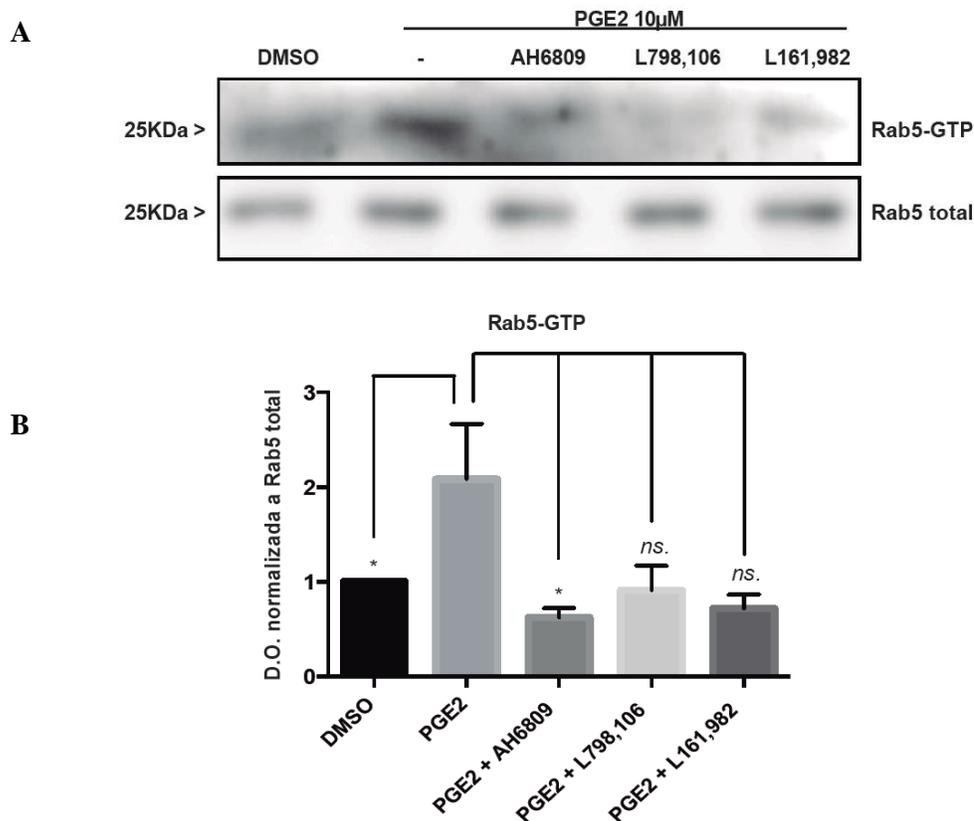
Para obtener una apreciación visual de la activación de Rab5 inducida por PGE2, se estimularon células HT29(ATCC) con PGE 10 $\mu$ M por 6h y posteriormente fueron procesadas para la detección de Rab5 y EEA1 mediante IFI. Se observó que en células estimuladas con PGE2, hubo un aumento significativo en la cantidad de marcas puntiformes citoplasmáticas tanto de Rab5, como de su proteína efectora EEA1 (figura 5).



**Figura 5. Inmunofluorescencia de EEA1 y Rab5.** A-D: Microfotografías representativas de IFI, en donde se observa la detección de EEA1 (A y B) y Rab5 (C y D) en células HT29(ATCC) tratadas o no tratadas con PGE2 10 $\mu$ M. Aumento: 60X. A la derecha: Gráfico que muestra el promedio del número de partículas EEA1(+) (E) y Rab5(+)(F), de 3 experimentos independientes, cuantificadas mediante procesamiento de imagen en ImageJ en células tratadas o no con PGE2 10 $\mu$ M (*t*-test \**p*<0,05).

**iii. PGE2 induce la activación de Rab5, preferencialmente, a través de la activación del receptor de PGE2, EP2.**

PGE2 puede actuar sobre 4 posibles receptores acoplados a proteína G como se discutió previamente. Para determinar cuál de estos es responsable de la activación de Rab5 ante el estímulo con PGE2, células HT29(ATCC) fueron incubadas con PGE2 10 $\mu$ M en presencia de antagonistas farmacológicos específicos para los receptores EP2(AH6809), EP3(L-798,106), EP4(L-161,982). Si bien con todos los antagonistas se observó una disminución en la activación de Rab5 ante el estímulo con PGE2 10 $\mu$ M por 6h, sólo con el uso del antagonista para el receptor EP2, AH6809, se observó una disminución estadísticamente significativa (figura 6).



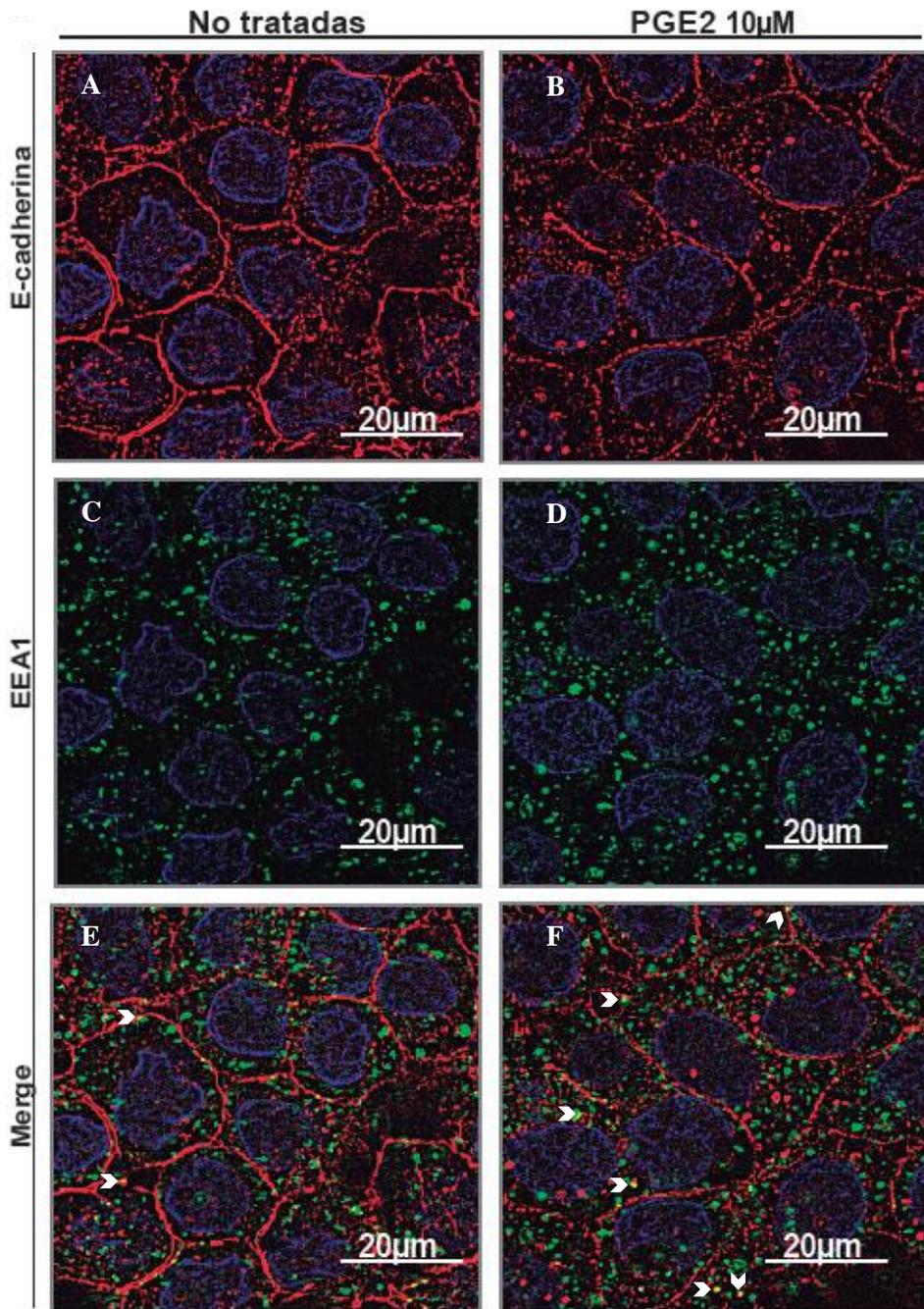
**Figura 6. Niveles de Rab5 en células HT29(ATCC) estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M en presencia de antagonistas para los receptores de PGE2 10 $\mu$ M.** A: Imagen representativa de Western Blot para Rab5-GTP y Rab5-total obtenidos por la técnica de Pulldown, en células estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M en presencia o ausencia de los antagonistas AH6809(EP2), L,798,106(EP3) y L161,982(EP4). B: gráfico que muestra las medias de las densidades de 3 experimentos independientes de Rab5-GTP normalizadas a sus respectivos Rab5-total (ANOVA y Kruskal Wallis test \* $p$ <0,05).

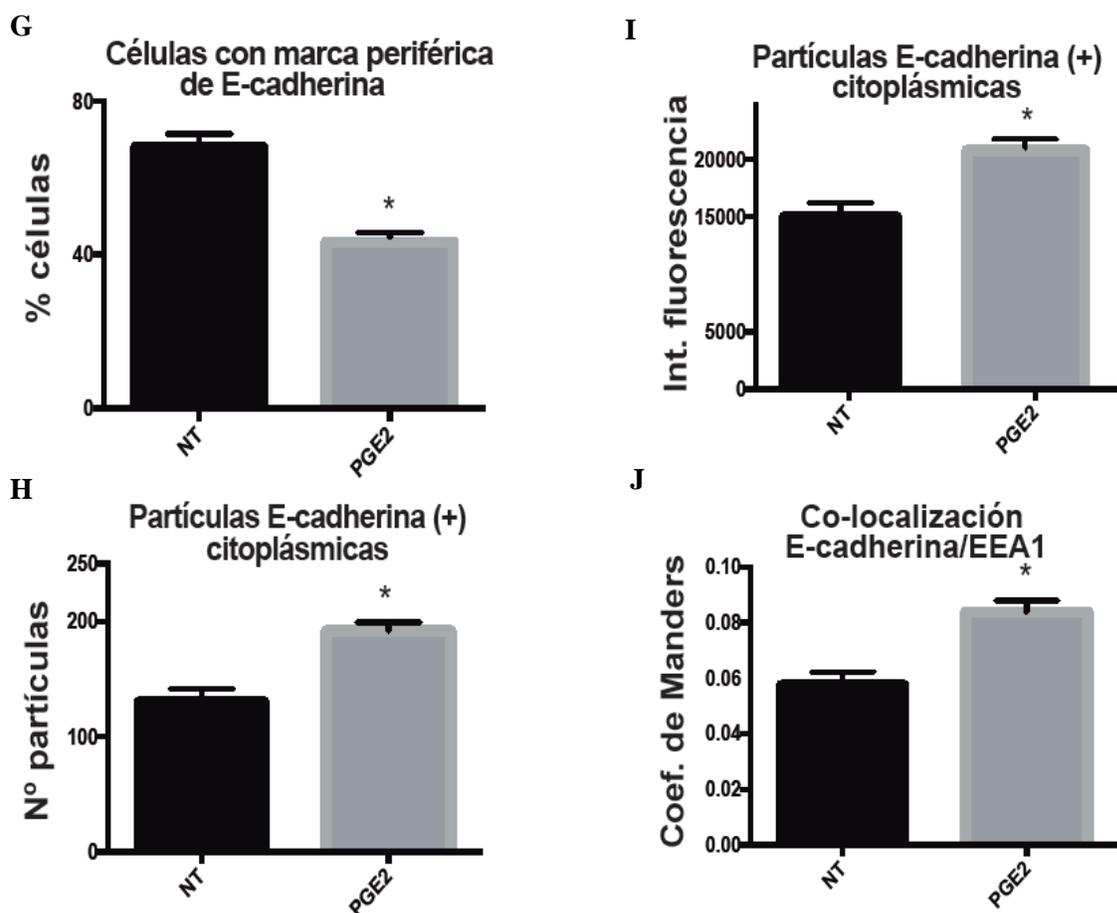
**Objetivo específico II: Evaluar el efecto de PGE2 en la localización sub-celular de E-cadherina en células HT29(ATCC) de adenocarcinoma colorrectal y la posible relación con la activación de Rab5.**

**i. PGE2 produce la internalización de E-cadherina y el aumento de su co-localización con EEA1.**

Para determinar el efecto de PGE2 en la localización subcelular de E-cadherina, se estimularon células HT29(ATCC) con PGE2 10 $\mu$ M durante 6 y 24h y posteriormente fueron procesadas para la detección de E-cadherina mediante la técnica de IFI. Los resultados muestran un cambio en la distribución de E-cadherina en ambos tiempos de incubación con PGE2, disminuyendo la señal de ésta en la periferia celular y aumentando concomitantemente en el citoplasma en forma de marcas puntiformes (Figura 7A-B). Para semi-cuantificar este resultado, se realizaron 3 análisis distintos que se muestran en los gráficos de la figura 5. Primero se estimó el porcentaje de células con al menos un borde continuo de marca de E-cadherina en imágenes tomadas a un aumento de 60X (Figura 7G), luego se midió la cantidad de partículas (Figura 7H) y la intensidad de éstas (Figura 7I), usando ImageJ. En los tres análisis se encontraron diferencias significativas al comparar células tratadas con PGE2 versus células no tratadas.

Para ver si la re-localización citoplásmica de E-cadherina viene acompañada de una acumulación en endosomas tempranos (evento que sería dependiente de Rab5), se realizó una co-inmunofluorescencia indirecta (co-IFI) para la detección de EEA1 (Figura 7C-D), simultánea a la detección de E-cadherina. Posteriormente, las imágenes obtenidas fueron procesadas para análisis de co-localización de ambas marcas utilizando ImageJ. Se observó que el tratamiento con PGE2 10 $\mu$ M provoca un aumento en la co-localización de las partículas positivas para E-cadherina y EEA1, según el análisis del coeficiente de Manders (Figura 7E-F-J).

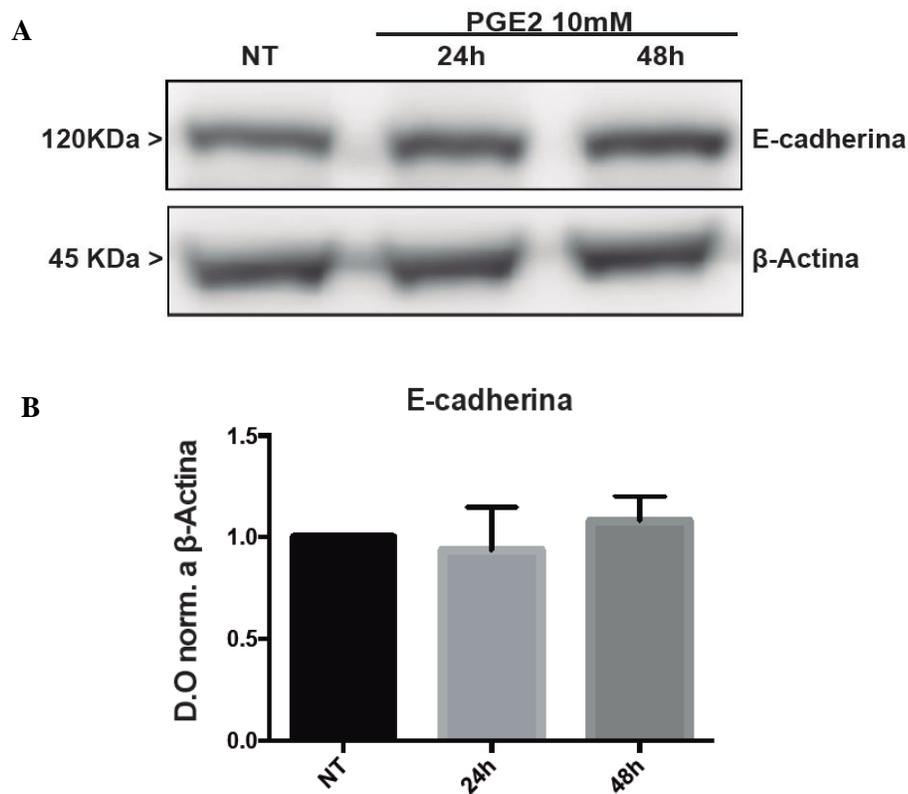




**Figura 7. Microfotografías representativas del cambio en la localización de E-cadherina en células HT29(ATCC) tratadas con PGE2, desde la periferia celular hacia el citoplasma, aumentando su co-localización con EEA1.** A y B, detección de E-cadherina; C y D, detección de EEA1; E y F, co-localización de E-cadherina y EEA1, los lugares de evidente co-localización se indican con una flecha blanca. En A, C y E se observan células no tratadas y en B, D y F, células estimuladas con PGE2. G, Se realizó el conteo visual de células con al menos un borde definido y continuo de marca E-cadherina (+) y se estimó el porcentaje relativo al total de células por imagen 60X. H, Análisis de la cantidad de E-cadherina en marcas puntiformes en el citoplasma de células HT29(ATCC) control y tratadas con PGE2 10  $\mu$ M. I, Análisis de intensidad de fluorescencia de marca E-cadherina (+) en citoplasmas de células HT29(ATCC). Para H e I, se realizó un ROI de 4 células representativas por imagen en 3 fotografías distintas de un mismo N muestral, excluyendo los bordes y se analizó la cantidad de partículas utilizando ImageJ, para luego promediar con los otros 2N (Mann Whitney test  $*p < 0,05$ ). Aumento, 60X. J: Gráfica que muestra el promedio de Co-localización de E-cadherina y EEA1 en imágenes de IFI en células no tratadas o tratadas con PGE2 10 $\mu$ M de 3 experimentos independientes en los que se midió el coeficiente de Manders de co-localización (t-test  $*p < 0,05$ )

## ii. Los niveles totales de E-cadherina no disminuyen luego del tratamiento con PGE2 10 $\mu$ M

Para evaluar el efecto de PGE2 sobre el contenido total de E-cadherina, células HT29(ATCC) fueron tratadas con PGE2 10 $\mu$ M por diferentes períodos de tiempo (24 y 48h) y a partir de los homogenizados totales, se determinó la presencia de E-cadherina. De esta forma, se observó que a ninguno de los tiempos examinados hubo cambios significativos en los niveles proteicos de este marcador en los homogenizados totales (figura 8).

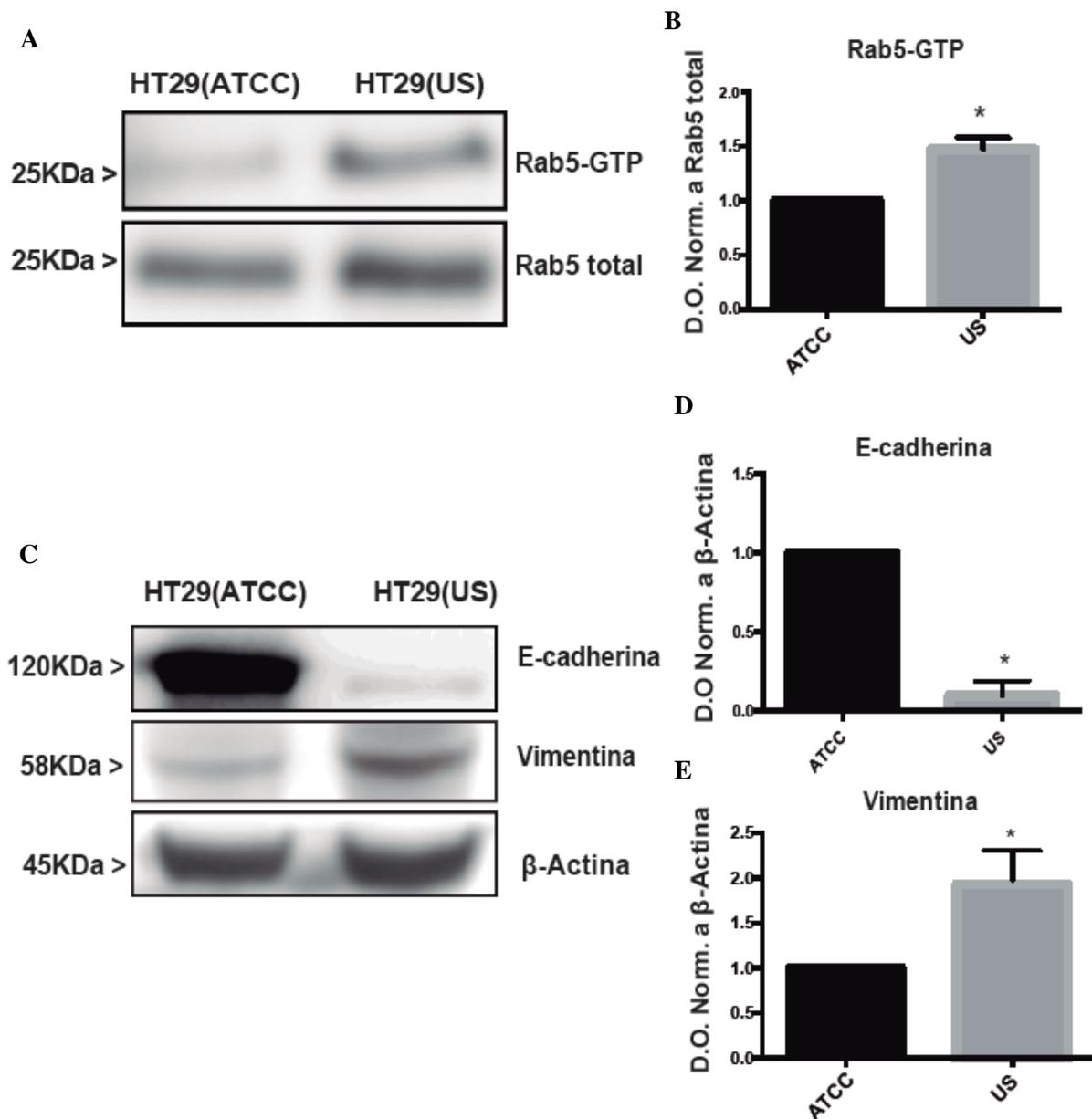


**Figura 8: Nivel total de E-cadherina en células HT29(ATCC) estimuladas con PGE2 10  $\mu$ M por 24 y 48h.** A: Imagen de Western blot representativa donde se muestran las bandas correspondientes a E-cadherina y  $\beta$ -Actina como control de carga. B: Gráfico que representa el promedio de las densidades ópticas (D.O.) de las bandas normalizadas a actina y relativas al control no tratado (NT), para E-cadherina, de 3 experimentos independientes.

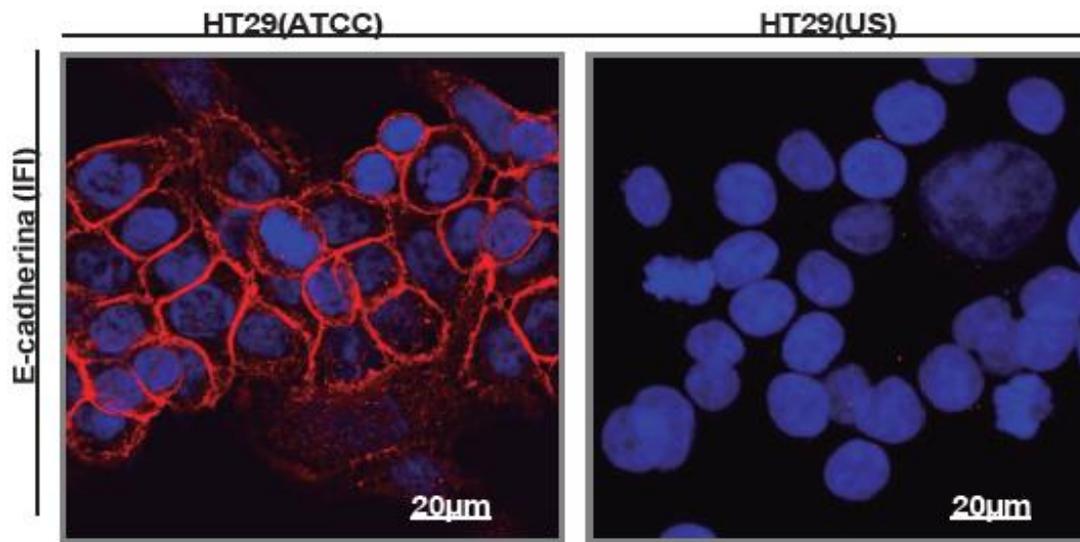
**Objetivo específico III: Comparar los niveles de activación de Rab5 y expresión de E-cadherina entre las células HT29(ATCC) y su variante más invasiva, HT29(US) y evaluar el posible rol de PGE2 en estas diferencias.**

**i. La línea celular altamente invasiva HT29(US), presenta basalmente una mayor activación de Rab5 y una menor expresión de E-cadherina.**

Mediante la técnica de pulldown, se midió el nivel de activación de Rab5 en estado basal en la línea celular altamente invasiva HT29(US), y se comparó con su contraparte de menor potencial invasivo, HT29(ATCC). Los resultados normalizados a sus respectivos Rab5-total (homogenizados totales), muestran que las células HT29(US) presentan una proporción de Rab5-GTP entre un 25 a 30% más alto que en células HT29(ATCC) en estado basal (Figura 9A-B). Además, se midió la expresión de E-cadherina en ambas líneas celulares y se observó que las células HT29(US) expresan aproximadamente un 90% menos de E-cadherina total (Figura 9C-D). Adicionalmente, se midió el filamento intermedio mesenquimal Vimentina, observándose que las células HT29(US) expresan una cantidad significativamente mayor de esta proteína (Figura 9C-E). Además, se realizó una IFI para la detección de E-cadherina en ambas líneas celulares, y se observó que las células HT29(US) no expresan E-cadherina en los bordes celulares, como su contraparte HT29(ATCC), concordando de esta manera con los resultados obtenidos por Western Blot (Figura 10).



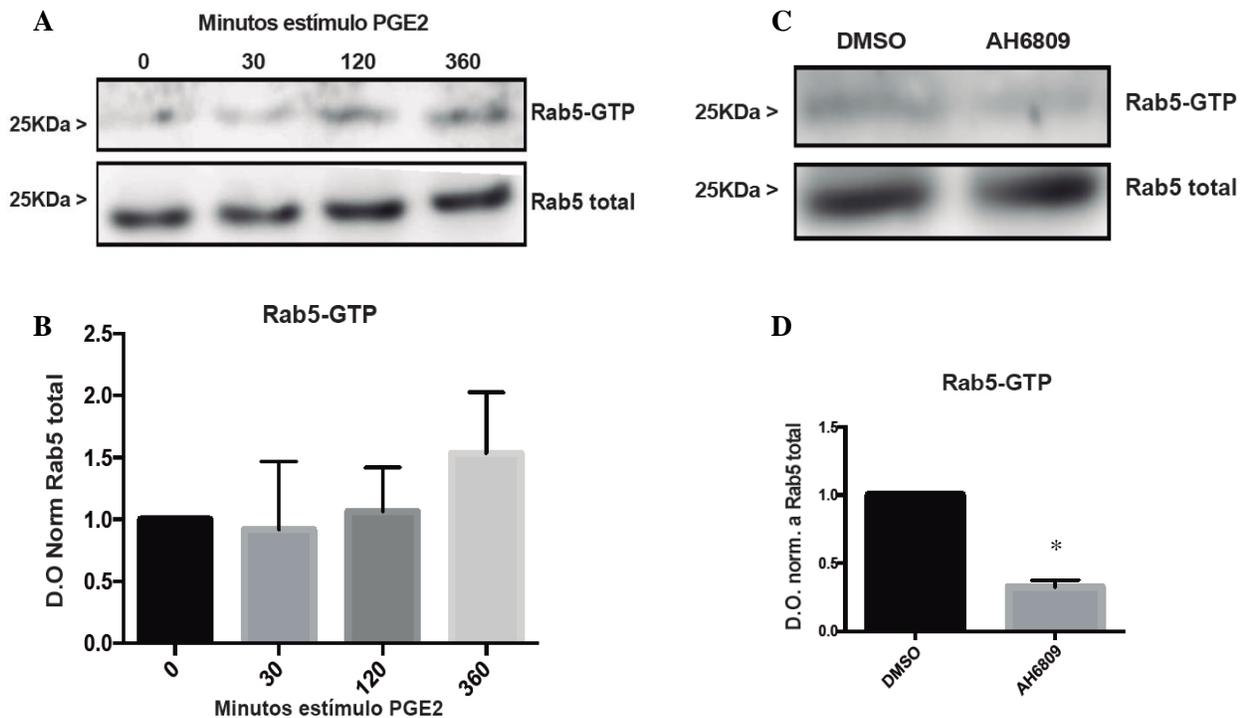
**Figura 9. Niveles basales de Rab5-GTP, E-cadherina y Vimentina en células HT29(ATCC) y HT29(US).** A: Imagen representativa de Western Blot para Rab5-GTP y Rab5-total. B: Gráfico que representa la media de los resultados de 4 experimentos independientes, de la cantidad de Rab5-GTP de la línea celular HT29(US) relativa a la línea HT29(ATCC) ( $t$ -test  $*p < 0,05$ ); C: Imagen representativa de Western Blot para E-cadherina, Vimentina y  $\beta$ -Actina en estado basal; D y E, gráfico que muestra el promedio de la expresión de E-cadherina en D y Vimentina en E, de las células HT29(US), en relación a la expresión de estas proteínas en las células HT29(ATCC).



**Figura 10.** Presencia de E-cadherina en células HT29(ATCC) y HT29(US). *Imágenes representativas de IFI para la detección de E-cadherina en células HT29(ATCC) y HT29(US). Núcleos teñidos con DAPI. 60X*

**ii. El estímulo con PGE2 exógena no es capaz de incrementar la actividad de Rab5 en células HT29(US), sin embargo la antagonización del receptor EP2 causa la disminución en el nivel de activación de Rab5 en este modelo celular.**

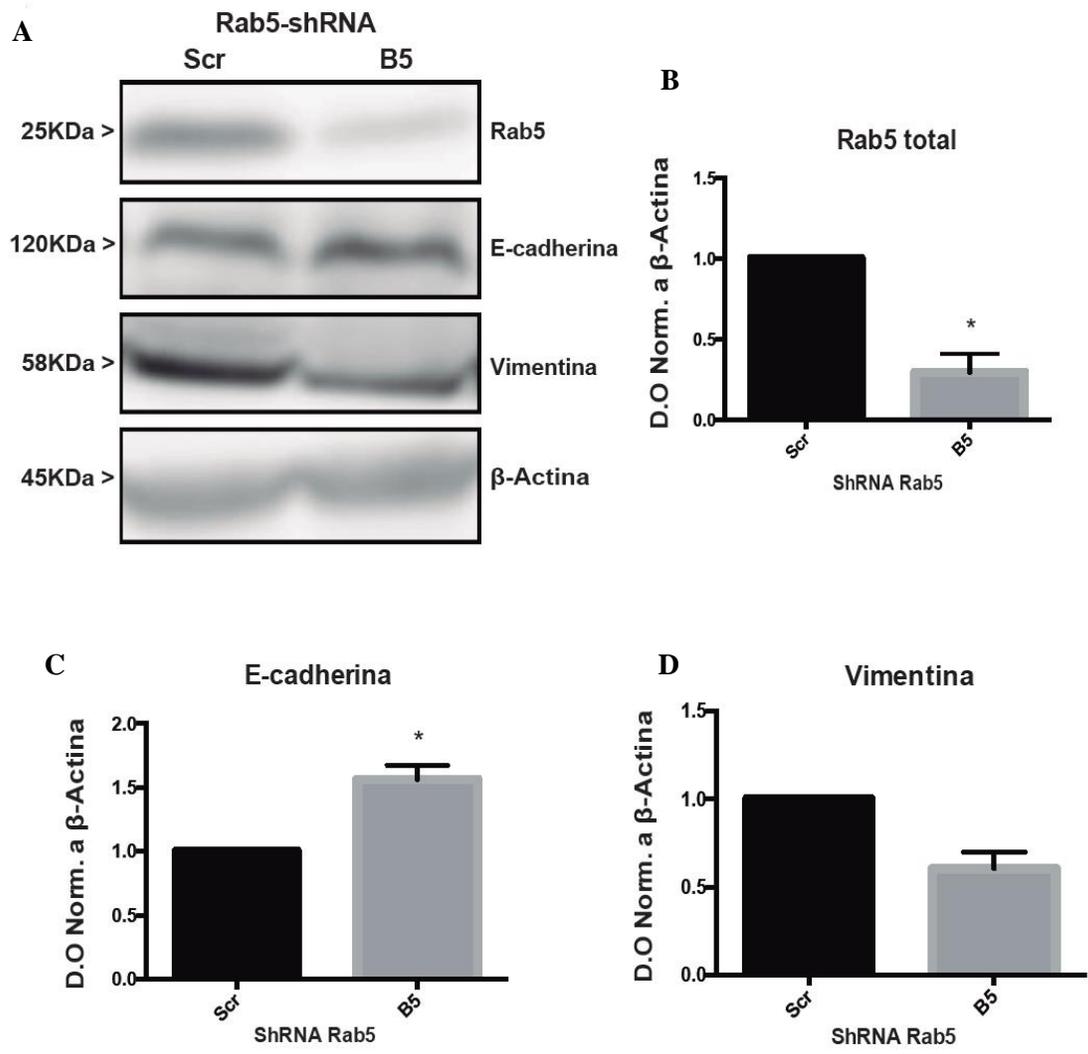
Debido a que PGE2 fue capaz de inducir la sobre-activación de Rab5 y la internalización de E-cadherina en células HT29(ATCC) y que las células HT29(US), que representan un estado más invasivo de las HT29(ATCC), presentan basalmente una sobre-activación de Rab5 y un silenciamiento en la expresión de E-cadherina, quisimos evaluar el efecto de PGE2 en el estado basal de activación de esta GTPasa. Para esto, primero evaluamos si el estímulo con PGE2 exógena es capaz de incrementar la activación de Rab5 en células HT29(US), por lo que éstas fueron estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M por distintos tiempos. Sin embargo, aun cuando se puede apreciar una leve tendencia a la activación de Rab5, la cuantificación de 4 experimentos independientes no arroja significancia, contrariamente a lo observado en su contraparte menos invasiva HT29(ATCC) (Figura 11A-B, comparar con Figura 4). Como EP2 es el principal receptor de PGE2 involucrado en la activación de Rab5 en las células HT29(ATCC), pensamos que este receptor podría estar involucrado en el nivel basal de activación de Rab5 en las células HT29(US), por lo que estas células fueron incubadas por 24h en presencia del antagonista farmacológico del receptor EP2, AH6809. De esta forma, se observó que el nivel basal de activación de Rab5 disminuyó significativamente en presencia de este antagonista (Figura 11C-D), dando cuenta de que el alto nivel de activación de Rab5 en esta línea celular altamente invasiva, se debe en parte a la función del receptor EP2 de PGE2. Alternativamente, se usó el inhibidor selectivo de COX2, Celecoxib, como control negativo de la producción de PGE2, sin embargo, cuando las células fueron incubadas con este inhibidor, no se observaron diferencias significativas en la activación de Rab5 (Anexo 6).



**Figura 11. Efecto de PGE2 en la activación de Rab5 en células HT29(US).** A: Western Blot representativo para Rab5-GTP y Rab5-total obtenidos por pulldown, en células estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M por 0, 30, 120 y 360 minutos. B: El gráfico muestra los promedios de las densidades de las bandas normalizadas a sus respectivos Rab5-total de 4 experimentos independientes (test ANOVA y Kruskal Wallis, no significativo). C: Western Blot representativo para Rab5-GTP y Rab5-total obtenidos por pulldown, desde células incubadas con el antagonista del receptor EP2 AH6809, o con DMSO, como condición control. D: El gráfico muestra los promedios de las densidades de las bandas normalizadas a sus respectivos Rab5-total de 3 experimentos independientes (test ANOVA, Kruskal Wallis, \* $p < 0,05$ ).

**v. El silenciamiento parcial de Rab5 mediante shRNA en células HT29(US), incrementa la expresión de E-cadherina.**

Ya que anteriormente observamos que en células HT29(ATCC), E-cadherina es endocitada a endosomas tempranos (figura 6), compartimientos dependientes de Rab5, quisimos averiguar si en células HT29(US), la expresión de esta GTPasa pudiera tener alguna relación con los bajos niveles basales de E-cadherina (figura 9). Para esto se generaron líneas celulares HT29(US) con expresión estable de shRNA contra Rab5 (denominado B5), tal como se indicó en materiales y métodos. Luego se midió la expresión de Rab5 en homogenizados totales mediante Western Blot y se observó que la expresión de la secuencia de shRNA contra Rab5, B5, disminuyó la expresión de la GTPasa en un 70%, en relación al shRNA control Scramble (figura 12A-B). Posteriormente se midió la expresión de E-cadherina y se observó que en las células que expresan la secuencia B5 de shRNA contra Rab5, la expresión de E-cadherina aumentó significativamente, alrededor de un 40% (figura 12A-C). Adicionalmente, ya que las células HT29(US) además presentan una mayor expresión del marcador mesenquimal Vimentina (figura 9), quisimos observar si la expresión de Rab5 pudiera tener relación con la expresión de este marcador mesenquimal, paralelamente al efecto que pudiera tener sobre E-cadherina como marcador epitelial, sin embargo, la expresión de Vimentina no cambió significativamente, a pesar de que se observó una tendencia hacia una disminución (figura 12A-D).



**Figura 12. Expresión estable de shRNA contra Rab5 y su efecto en la expresión total de E-cadherina y Vimentina en células HT29(US).** A: Imagen representativa de Western Blot para Rab5, E-cadherina, Vimentina y  $\beta$ -Actina en células con expresión estable de la secuencia de shRNA contra Rab5, B5, así como su control Scramble (Scr); B, C y D: Gráfico en donde se comparan las densidades de las bandas normalizadas a  $\beta$ -Actina para Rab5 en B, E-cadherina en C, Vimentina en D, resultado de 3 experimentos independientes (test ANOVA y Kruskal Wallis \* $p < 0,05$ )

## DISCUSIÓN

### Importancia de la sobre-activación de Rab5 inducida por PGE2

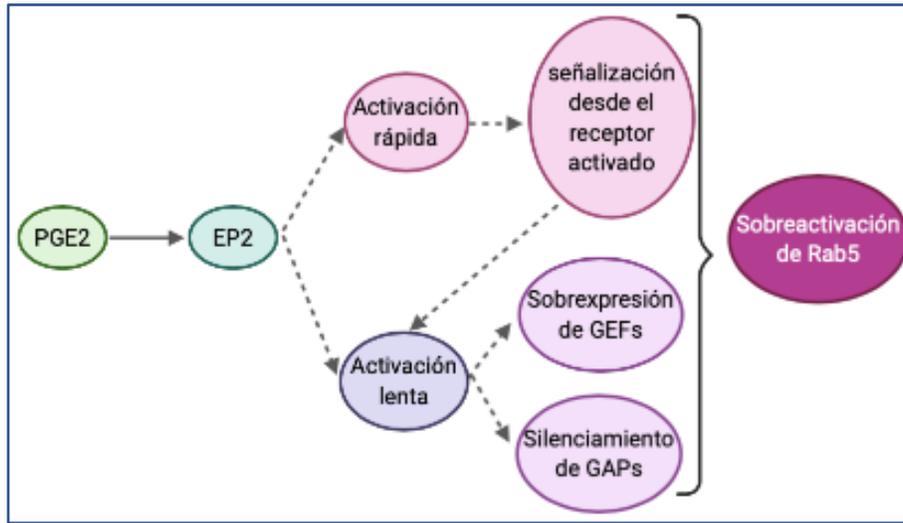
Durante las últimas décadas los efectos de la PGE2 en la progresión tumoral de diversos tipos de carcinomas han sido ampliamente descritos<sup>1,2</sup>. Sin embargo, actualmente continúa la búsqueda por comprender los mecanismos moleculares implicados en los efectos de PGE2 en cáncer, con el objetivo de dirigir terapias hacia blancos moleculares cada vez más específicos y discretos, evitando así los efectos adversos que tienen los tratamientos convencionales, como por ejemplo, la inhibición de las enzimas productoras de PGE2<sup>47</sup>.

En esta tesis, observamos que PGE2 es capaz de inducir la activación de Rab5, alterando así a la maquinaria endocítica, un efecto hasta ahora desconocido y que podría explicar algunos de los grandes cambios que ocurren durante los programas de adaptación aberrantes que experimentan las células tumorales sometidas a altas concentraciones de PGE2 en el microambiente tumoral. Lo anterior es muy interesante, considerando la importancia que han adquirido en el último tiempo los defectos en las rutas de tráfico intracelular durante la progresión tumoral<sup>30,48</sup>. La GTPasa pequeña Rab5, funciona como un *switch* molecular que, en su estado activo, enciende la dinámica endosomal temprana, movilizandocomponentes de la membrana plasmática, como proteínas de transmembrana, hacia compartimientos citoplásmicos para su destinación hacia una vía degradativa o de reciclaje<sup>28</sup>. La disposición de estos componentes membranosos en vesículas intracelulares permite la fluidez espacio-temporal de vías de señalización que activan por ejemplo, reordenamientos del citoesqueleto y que, en células tumorales facilitan la migración e invasión, como ya se ha demostrado en investigaciones realizadas por varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro<sup>31,32,34</sup>. Específicamente, en este trabajo demostramos que en células HT29(ATCC), PGE2 a una concentración de 10µM induce un incremento en la activación de Rab5, el cual se sostiene en el tiempo, alcanzando un máximo a las 6h (Figura 4). Este evento se correlaciona con un aumento en la marca fluorescente citoplásmica de Rab5 y EEA1 en células tratadas con PGE2 y observadas por IFI. Al respecto, varios estudios han relacionado la sobre-expresión/activación de Rab5, con la progresión tumoral, en donde por medio de estudios de silenciamiento de Rab5 se ha demostrado que la GTPasa es necesaria para la mantención de características de malignidad en células tumorales<sup>34</sup> y que la sobre-activación de Rab5 induce aceleración en la internalización de integrinas en adhesiones focales, lo cual incrementa la tasa migratoria

de células tumorales<sup>32</sup>. Más aún, en modelos clínicos se ha demostrado que la sobreexpresión de Rab5 está relacionada con peor pronóstico y mortalidad en cáncer, incluyendo el cáncer colorrectal, modelo desde el cual provienen las líneas celulares estudiadas en esta tesis<sup>49,50,18</sup>. El tiempo máximo de activación de Rab5 por el estímulo de PGE2 fue de 6h. Los mecanismos que explican esta temporalidad no fueron estudiados en este trabajo, sin embargo, debido a que la activación ya era evidente en períodos cortos de tiempos (menores a 6h), se pueden inferir dos posibles mecanismos. El primero, se puede atribuir a una acumulación progresiva de la cantidad de Rab5 en su estado activo debido a la permanencia del estímulo y que se produce de una forma más o menos directa desde los receptores de PGE2, los cuales activarían vías de señalización que eventualmente llevan a la activación de la GTPasa. Siguiendo en esta línea, se analizó la activación de Rab5 por PGE2 en presencia de antagonistas farmacológicos de los receptores de PGE2, EP2, EP3 y EP4, y el efecto de prevención de la activación de Rab5 sólo fue estadísticamente significativo con el antagonista de EP2, AH6809. Sin embargo, no podemos descartar que con un número mayor de reproducciones experimentales, los otros receptores pudieran verse implicados, ya que estadísticamente las medias de activación se observaron bastantes similares a las obtenidas con AH6809 (figura 6). EP2 es un receptor acoplado a proteína G $\alpha$ s, clásicamente relacionado con la activación de la vía del cAMP<sup>47</sup>, pero que además se ha descrito como el receptor responsable de activar otras vías de señalización, como la vía de  $\beta$ -catenina, la cual aumenta la proliferación y supervivencia de células tumorales, favoreciendo la progresión tumoral<sup>40</sup>. Curiosamente, en un estudio reciente de nuestro laboratorio, aunque en otro modelo celular (células epiteliales orales), se documentó que la activación de la vía de  $\beta$ -catenina se relaciona con la activación de Rab5<sup>41</sup>, por lo que no sería descartable que esta sea, al menos, una de las vías responsables de la activación de Rab5 por PGE2, por lo que sería una interesante proyección realizar más estudios moleculares que especifiquen y confirmen esta teoría. El hecho de que el receptor EP2 sea el principal involucrado en la activación de Rab5 no es menor, ya que la expresión de este receptor ha sido involucrada con la progresión tumoral y mortalidad en cáncer<sup>51,52</sup>.

Alternativamente, pueden existir otras formas que expliquen la mantención y aumento de la activación sostenida de Rab5 por períodos prolongados de tiempo, como se observó en este trabajo. En este contexto, se puede mencionar la inducción a nivel transcripcional de proteínas GEF, que estabilizan y favorecen el estado activo de esta GTPasa (Rab5-GTP), así como también, el silenciamiento de proteínas GAP implicadas en la inactivación de Rab5 (Rab5-GDP), aspectos que serían muy interesantes de disectar en

el futuro. En la figura 13 se resumen los posibles mecanismos que podrían llevar a la activación de Rab5 inducida por PGE2.



**Figura 13. Posibles mecanismos de activación de Rab5 inducidos por PGE2.** La activación del receptor de PGE2 EP2 podría inducir la activación de Rab5 por dos posibles mecanismos, uno rápido, asociado a vías de señalización que se han relacionado a la activación de Rab5 y otro lento que dependería de la inducción de GEFs y/o represión de GAPs, que podrían explicar el incremento en la activación basal de Rab5 observada en el modelo con mayor potencial maligno HT29(US).

### Importancia del efecto de PGE2 en la internalización de E-cadherina

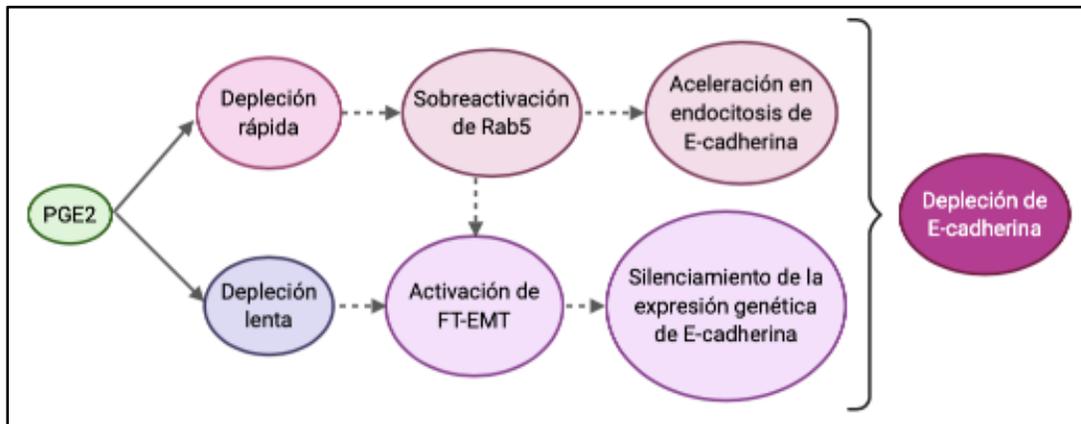
Es sabido que el silenciamiento de la función de E-cadherina promueve la progresión tumoral en varios tipos de cáncer<sup>53,54,55</sup>. La pérdida de E-cadherina en células tumorales de origen epitelial está asociada a un programa celular adaptativo denominado Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT), en el que las células cambian parcialmente desde un fenotipo de diferenciación epitelial, hacia uno mesenquimal, lo que favorece la capacidad migratoria y por lo tanto se ha propuesto como un proceso adaptativo que favorece, entre otros aspectos, la generación de *cancer stem cells*, resistencia terapéutica y metástasis<sup>19,22</sup>. Esta transición fenotípica puede ser más o menos completa, pero la sola pérdida de la expresión de E-cadherina en la membrana plasmática de células epiteliales, ya es suficiente para producir una serie de cambios celulares y moleculares que pueden favorecer la adquisición de características de malignidad<sup>56,57</sup>. En algunos modelos, se ha descrito que PGE2 es capaz de inducir factores de transcripción maestros que conducen el proceso de

EMT (FT-EMT) como Snail, Slug o ZEB<sup>39</sup>. La inducción de estos FT-EMT es un mecanismo a largo plazo con consecuencias fenotípicas variadas, **sin embargo, no se ha estudiado en detalle si PGE2 pudiera tener un efecto celular temprano en la expresión/localización de E-cadherina. En esta tesis se estudió, cómo PGE2 afecta la expresión/localización de E-cadherina en períodos relativamente cortos de tiempo.** Los estudios de IFI y Western Blot de homogenizados totales, nos permitieron detectar que PGE2 es capaz de inducir la internalización de E-cadherina desde la membrana plasmática, hacia el citoplasma, sin embargo, no es capaz de inducir un cambio en la expresión total de E-cadherina en los períodos de tiempo evaluados (figura 7 y 8).

E-cadherina tiene un rol central en la formación de uniones adherentes y su internalización y posterior degradación no sólo desestabiliza la unión adherente, sino que además altera la vía de señalización asociada, llevando en algunos casos a la activación de vías cuyos iniciadores están a menudo secuestrados o participando en el complejo de unión adherente, como por ejemplo, receptores de factores de crecimiento como EGFR o  $\beta$ -catenina, respectivamente<sup>53,23</sup>. Lomoriello et al.<sup>58</sup>, demostraron en un modelo celular de cáncer de mama que la internalización de E-cadherina, incluso en condiciones en que su expresión total no varía, se asocia a programas de EMT parciales, en donde además de la internalización de E-cadherina se documentó un aumento de la localización nuclear de  $\beta$ -catenina con la consecuente inducción de sus genes blanco<sup>52</sup>. La presencia de E-cadherina es altamente dinámica, siendo constantemente endocitada, para posteriormente ser destinada hacia la degradación o el reciclaje, dependiendo del contexto celular. Esta dinámica permanece en un equilibrio, que mantiene la arquitectura y señalización asociada del conjunto epitelial, por lo que cambios como la sobre-activación o apagamiento de alguna de estas rutas, afectará al equilibrio completo. Las rutas de tráfico intracelular están reguladas por las GTPasas pequeñas como Rab5, la que por medio de ciclos de activación y desactivación regula el tráfico desde la membrana plasmática hacia los endosomas tempranos, por lo que sería posible teorizar que una sobre-activación de esta GTPasa, como la que induce PGE2 y se observó en esta tesis, podría generar una aceleración en la endocitosis de E-cadherina (ver modelo propuesto, figura 16). Lo anterior, tendría lugar de manera análoga a como se ha observado en otras moléculas de adhesión que participan en complejos macromoleculares, como las integrinas<sup>42,32</sup>, ya que se sabe que E-cadherina posee dominios de unión a proteínas adaptadoras como AP-2 que permiten su endocitosis<sup>23</sup>. En esta tesis se propuso además un enfoque cuantitativo para analizar la pérdida de E-cadherina en la membrana plasmática mediante citometría de flujo, pero por

varios motivos no se logró conseguir una estandarización adecuada para obtener resultados significativos, sin embargo, como se muestra en el Anexo 4, el resultado obtenido apunta hacia un aumento en la internalización de E-cadherina en células tratadas con PGE2, apoyando lo observado por IFI.

Ante la posibilidad de que la sobre-activación de Rab5 inducida por PGE2 pudiera ser la responsable, al menos en parte, del aumento en la internalización de E-cadherina, realizamos una co-IFI para la detección de E-cadherina y el marcador de endosomas tempranos EEA1, molécula efectora de Rab5, río abajo de ésta y por lo tanto dependiente de la función de la GTPasa. Los resultados nos mostraron que cuando tratamos las células HT29(ATCC) con PGE2, se produce un aumento en la co-localización de ambas proteínas, lo que sugiere que E-cadherina está siendo internalizada hacia endosomas tempranos, compartimientos dependientes de la activación de Rab5. De todo lo anterior se pueden inferir dos conclusiones. Primero, PGE2 no induce un cambio en la expresión total de E-cadherina en los tiempos estudiados, pero sí un cambio en la localización subcelular de esta, disminuyendo en la superficie y aumentando en compartimientos intracelulares. Segundo, ya que PGE2 aumenta la co-localización de E-cadherina con EEA1, podemos inferir que E-cadherina está aumentando su localización en compartimientos EEA1 (+), por lo cual es posible pensar que la activación de Rab5 aumenta la endocitosis de E-cadherina, desplazando el equilibrio hacia la pérdida de E-cadherina en la membrana plasmática. La figura 14 resume los posibles mecanismos de depleción de E-cadherina inducidos por PGE2 en células HT29.



**Figura 14. Posibles mecanismos de depleción de E-cadherina en células HT29, inducidos por PGE2.** Con los hallazgos de los objetivos específicos I y II es posible inferir una posible vía que explique la endocitosis de E-cadherina ligada directamente a la activación de Rab5. Además, con los hallazgos obtenidos del objetivo específico III, es posible señalar que PGE2, incluso mediante la activación de Rab5 de forma permanente en el tiempo, también podría tener un efecto más permanente sobre la expresión de E-cadherina.

El hecho de que la expresión total de E-cadherina no disminuya en los tiempos estudiados, aún cuando se sabe que PGE2 es capaz de inducir la activación de FT-EMT que reprimen la expresión de E-cadherina, puede ser explicado si consideramos las grandes cantidades de E-cadherina que estas células presentan, por lo que la sola represión genética de E-cadherina no sería suficiente para ser detectada en los homogenizados totales, ya que la gran cantidad de E-cadherina que las células HT29(ATCC) presentan, se encuentra traficando entre la membrana plasmática y vesículas intracelulares, como endosomas tempranos, en los tiempos de estímulo estudiados. En este contexto, es posible pensar que a tiempos de estímulo más prolongados, como por ejemplo semanas, podría observarse una disminución en los niveles totales de E-cadherina, tal como ha sido reportado en otros modelos celulares tumorales que también expresan una gran cantidad de E-cadherina<sup>52</sup>. Para confirmar esta posibilidad, se necesitarán más estudios a futuro, evaluando períodos prolongados de estimulación con PGE2.

**La sobre-activación de Rab5 y la pérdida de E-cadherina inducidas por PGE2 en células HT29(ATCC), se encuentran basalmente alteradas en la variante más invasiva HT29(US), correlacionándose con estados más malignos de las células tumorales.**

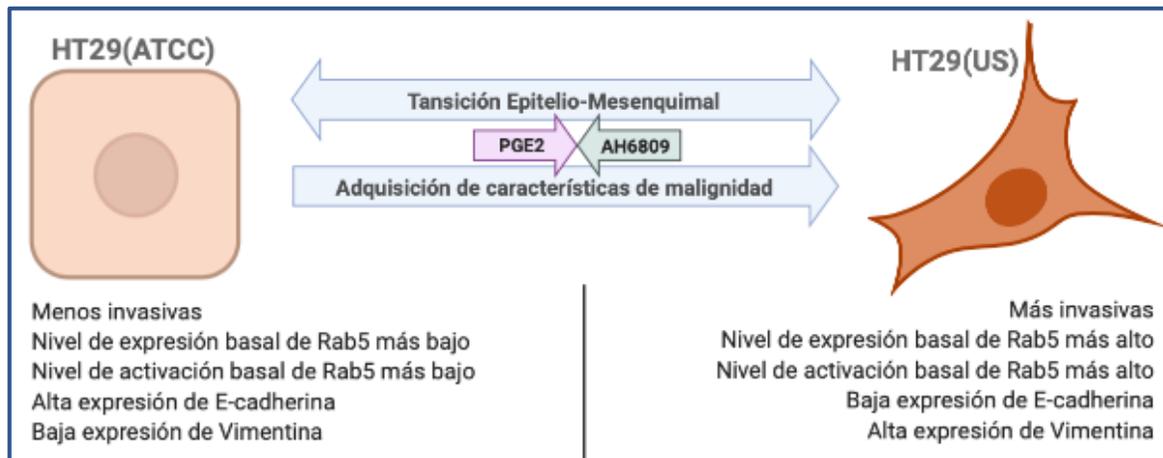
Ya que los cambios inducidos por PGE2 evidenciados en este trabajo (sobre-activación de Rab5 e internalización de E-cadherina), son aspectos que, como ya se ha discutido, facilitan la capacidad migratoria en células tumorales, hipotetizamos que la línea celular HT29(US), al presentar características más invasivas, podrían tener estos aspectos de la progresión tumoral en un estado más avanzado, y para este efecto decidimos considerar esta línea celular como un estado potencialmente más maligno, al que eventualmente llegarían las células HT29(ATCC), si los estímulos que inducen a la progresión tumoral, como la PGE2, persisten. Para este fin, se comparó la activación de Rab5 y la localización/expresión de E-cadherina, en estado basal en ambas líneas celulares. Como se anticipó, las células HT29(US) presentaron una proporción de Rab5-GTP un 30-40% mayor que las células HT29(ATCC) en estado basal (figura 9A), lo que sumado al hecho de las células HT29(US) presentan una mayor expresión total de Rab5, como ya se había demostrado anteriormente en nuestro grupo<sup>42</sup>, nos indica que estas células presentan una función de Rab5 sustancialmente aumentada. Cuando analizamos la expresión de E-cadherina, observamos que las células HT29(US) presentan una muy baja expresión de E-cadherina en comparación con las HT29(ATCC), siendo un 90% menor (Figuras 9B, 10). Como mencionamos anteriormente, la pérdida de E-cadherina en células

tumorales de carcinoma, es considerada parte de la EMT y se asocia clínicamente a estados tumorales más avanzados y peores pronósticos. Esta EMT puede ser más o menos parcial. Para analizar si esta pérdida de E-cadherina, viene acompañada de otro marcador de EMT, analizamos la expresión total del filamento intermedio y marcador mesenquimal Vimentina y logramos detectar que este marcador se encuentra significativamente incrementado en células HT29(US) en relación a las HT29(ATCC), lo que sumado a la baja expresión de E-cadherina y mayor potencial invasivo, nos estarían dando cuenta de que las células HT29(US) se encuentran en un estado de diferenciación más mesenquimal que las HT29(ATCC) (figura 15). El efecto supresor tumoral de E-cadherina en células HT29 ya había sido documentado con anterioridad por Torres et al.<sup>44</sup>, donde se documentó que para que Caveolina-1 pueda ejercer su efecto supresor de tumores, es necesaria la presencia de E-cadherina, ya que este efecto fue observado solamente en células HT29(ATCC), que expresan altas cantidades de E-cadherina, pero en células HT29(US) que expresan muy poca E-cadherina, el efecto de Caveolina-1 sólo se logra cuando se sobre-expresa artificialmente E-cadherina, reflejando que el estado más mesenquimal de las células HT29(US), se correlaciona con un probablemente mayor potencial maligno, lo que sería interesante de confirmar con estudios de malignidad tumoral *in vivo* en el futuro.

Luego, nos preguntamos si PGE2 pudiera ejercer un efecto adicional en la activación de Rab5 y en la limitada expresión de E-cadherina en células HT29(US). Entonces se estimularon células HT29(US) con PGE2 y se midieron los niveles de Rab5-GTP mediante la técnica de pulldown, sin observar diferencias significativas en ninguno de los tiempos estudiados. Si consideramos que PGE2 puede inducir estos cambios en las células HT29(ATCC), y que las células HT29(US) ya tienen esta alteración en Rab5 y E-cadherina de manera basal, pensamos que las células HT29(US) ya no pueden activar más aún a Rab5, al menos por la vía de PGE2, por lo que hipotetizamos que PGE2 endógenamente secretada podría tener un efecto autocrino ya saturado, en las células HT29(US), razón por la que estas células no responden a estímulos con PGE2 exógena. En concordancia con lo anterior, y dado que el compuesto AH6809 tuvo el mayor efecto en prevenir la activación de Rab5 inducida por PGE2 en células HT29(ATCC) (Figura 7), se incubaron células HT29(US) en presencia de AH6809, lográndose observar que la activación de Rab5 disminuye significativamente en presencia de este inhibidor. Esto sugiere que la activación del receptor EP2 es responsable en parte, de los niveles basales elevados de Rab5-GTP en células HT29(US). Para confirmar que estas características son debido a la mayor producción endógena de PGE2 por las células HT29(US), es necesario medir la producción

de PGE2 en ambas líneas celulares, estrategia que por diversos motivos no pudo ser llevada a cabo en esta tesis, pero que sería bastante interesante de comprobar en el futuro. Sin embargo, debido a que la PGE2 actúa específicamente en los receptores descritos, podemos inferir a partir de los resultados obtenidos, que el estado basal de activación de Rab5 en las células HT29(US), es debido a la PGE2 secretada por estas mismas células, ya que al inhibir al receptor de PGE2 responsable de la activación de la GTPasa en las células originales HT29(ATCC), el nivel de activación de Rab5 disminuye. En este punto, es importante mencionar que se utilizó Celecoxib como control positivo del bloqueo de los efectos de PGE2, puesto que este fármaco inhibe su producción a nivel de la enzima COX2, pero a diferencia del uso del antagonista contra el receptor EP2, el uso de Celecoxib no disminuyó los niveles de Rab5-GTP en estas células (Anexo 7). Proponemos que esto se debe a que al inhibir una vía de producción de moléculas secretadas a un nivel tan temprano en el metabolismo, como COX2, se está interfiriendo con un amplio espectro de vías de señalización, además de considerar los efectos paralelos a la inhibición de COX2 que posee este fármaco, por lo que hay muchas posibilidades que pueden explicar este comportamiento. Sin embargo, al usar un antagonista que bloquea específicamente los efectos de PGE2 a través de uno de los receptores mayormente implicados en la progresión tumoral en estas células, se logró disminuir la activación de Rab5 en células con un alto potencial invasivo, reflejando a nivel celular la importancia de la utilización de terapias más específicas y dirigidas contra blancos moleculares discretos y no de amplio espectro, puesto que las respuestas celulares pueden ser inesperadas. Adicionalmente, para confirmar que el estado más mesenquimal de las células HT29(US) se relaciona con un efecto funcional, se realizó el ensayo de migración celular por Transwell, estrategia experimental que no continuó su desarrollo para obtener una estadística que respalde los resultados. Sin embargo, en el único experimento que se pudo realizar, se observó que las células HT29(US), tienen una mayor capacidad migratoria frente a la variante menos maligna HT29(ATCC), y que estas últimas al ser tratadas con PGE2, aumentan su capacidad migratoria hasta un punto que las hace similares a las HT29(US), apoyando la hipótesis de que estas últimas están en un estado más avanzado en lo que a EMT se refiere (Anexo 6). En la figura 15 se resumen las características de ambas líneas celulares que nos permiten ubicarlas teóricamente dentro de una línea de diferenciación epitelio-mesenquimal, siendo las más mesenquimales, es decir las células HT29(US), las que poseerían un mayor potencial maligno y además se muestra como PGE2 podría estar empujando el sistema de

diferenciación hacia uno más mesenquimal y como el antagonismo de su receptor EP2, previene este efecto.



**Figura 15.** La línea celular HT29(ATCC) tiene menor potencial invasivo y representa un estado más epitelial que su contraparte más invasiva, las células HT29(US), las cuales presentan características mesenquimales. Las células HT29(US) poseen características que coinciden con el modelo de Transición Epitelio-Mesenquimal para carcinomas, ya que presentan características más mesenquimales que las células HT29(ATCC), como la anteriormente descrita alta capacidad invasiva, lo que las hace potencialmente más malignas. En esta tesis, pudimos observar como PGE2 es capaz de empujar a las células HT29(ATCC) hacia la pérdida de características epiteliales como lo es la pérdida de E-cadherina en la membrana plasmática, lo cual parece ser influenciado por la activación de Rab5 también inducida por PGE2 y presente de forma basal en las células HT29(US). Además pudimos observar como la incubación con el antagonista para el receptor EP2, AH6809 fue capaz de prevenir el efecto de PGE2 en la activación de Rab5 e incluso disminuir el estado basal de activación de Rab5 en las células HT29(US), lo que nos permite inferir que el efecto sostenido de PGE2 en estas células, vía receptor EP2, probablemente ha contribuido a la diferenciación mesenquimal de estas. Complementar esta caracterización con estudios de migración, otros marcadores de EMT y estudios de malignidad in vivo constituyen una importante proyección para futuros estudios

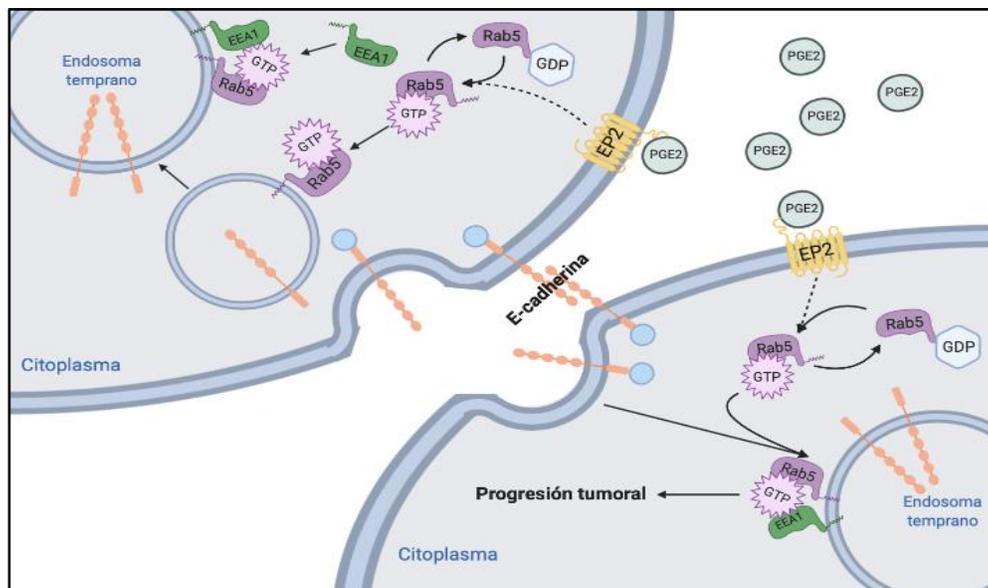
(Expresión total de Rab5 en células HT29(ATCC) y HT29(US) referenciados en 42)

### **Sobre-activación de Rab5 por PGE2 y su posible efecto río arriba de la internalización de E-cadherina y la EMT.**

A lo largo de este trabajo, hemos propuesto que la función de Rab5 está río arriba de la localización/expresión de E-cadherina. Para evaluar parcialmente esta posibilidad, se generaron líneas celulares con expresión estable de shRNA contra Rab5 y como se muestra en la figura 10, se logró generar una línea celular HT29(US)-shRNA-B5 con una expresión de Rab5 un 70% menor, en comparación con las células HT29(US)-shRNA-Scramble (control). Ya que la principal diferencia entre las células HT29(ATCC) y HT29(US) respecto a E-cadherina, es la expresión total de ésta, se comparó la expresión de E-cadherina en homogenizados totales. Sorprendentemente, logramos observar que las células que expresan la secuencia de shRNA contra Rab5, B5, expresaron una cantidad significativamente mayor de E-cadherina en su estado basal. De este resultado podemos inferir que Rab5 no sólo induce la internalización de E-cadherina desde la membrana plasmática hacia compartimientos citoplásmicos, sino que de alguna manera esta GTPasa incide a largo plazo en los niveles totales de E-cadherina, es decir, el silenciamiento de la GTPasa Rab5 reestablece la expresión de la proteína supresora de tumores E-cadherina, confirmándose el efecto oncogénico de Rab5. Además, quisimos evaluar la expresión de Vimentina, pero no hubo diferencias significativas, a pesar de una clara tendencia a la disminución. En el futuro sería interesante seguir disectando los efectos de Rab5 en la EMT, como también sería interesante, además, incubar estas células con el antagonista de EP2, AH6809, ante lo que esperamos que se acentúe aún más, la reversión en la malignidad de estas células. El hecho de que una GTPasa relacionada con el tráfico temprano, tenga relación con la expresión genética de otras proteínas, genera una serie de cuestionamientos sobre las vías moleculares que explican esta relación, ya que se sabe que Rab5 en su estado activo además de reclutar proteínas relacionadas a la dinámica vesicular y del citoesqueleto, es capaz de reclutar y encender vías de señalización como la vía PI3K, por ejemplo, por lo que sería probable que además de tener un efecto en la localización de E-cadherina temporal y espacialmente, tenga un efecto a nivel de expresión génica de esta proteína, participando ampliamente en la malignización de células tumorales durante la progresión tumoral. Sería interesante resolver esta serie de interrogantes en el futuro, ampliando el alcance de esta disección molecular hacia otros modelos de estudio como otras líneas celulares de cáncer de colon u otros modelos tumorales con características biológicas similares.

## CONCLUSIONES FINALES Y MODELO CELULAR DE LOS HALLAZGOS

El modelo molecular con los hallazgos realizados en este trabajo se muestra a continuación (figura 11), donde podemos observar que PGE2, mediante la activación de su receptor EP2 en la membrana de las células HT29, induce la activación de Rab5, por mecanismos aún desconocidos. El estímulo de PGE2, probablemente mediante la activación de esta GTPasa, lleva a la internalización de E-cadherina en tiempos tempranos, lo cual si bien no produce un cambio en la expresión genética de E-cadherina, ya es suficiente para favorecer la progresión tumoral por los cambios arquitectónicos y en la señalización derivada desde la molécula de adhesión. Esto eventualmente llevará a la progresiva transformación maligna de estas células, contribuyendo a su diferenciación mesenquimal, haciéndose cada vez más parecidas a las células HT29(US) que basalmente presentan más Rab5 en su estado activo y menos E-cadherina y presentan un estado de EMT más avanzado.



**Figura 16. Resumen gráfico de hallazgos realizados en esta tesis**

Finalmente, en este trabajo se realizaron hallazgos generales en cuanto a la activación de la GTPasa Rab5 y la internalización de E-cadherina en el contexto de células tumorales que no habían sido descritos anteriormente por lo que es un aporte en el conocimiento de una de las patologías más importantes en el mundo actual. Quedan planteadas muchas interrogantes por resolver en futuras investigaciones, principalmente relacionadas a la disección de las vías que explican los fenómenos observados en esta tesis.

## ANEXOS

### 1. Declaración personal del autor

A continuación, quisiera utilizar este espacio para comentar y justificar, desde mi perspectiva personal, algunas generalidades y aclaraciones sobre el desarrollo de esta tesis, en cuanto a aspectos técnicos, metodológicos y formativos.

Primero, quisiera justificar este espacio dentro de la tesis, porque considero que es el lugar correcto para hacer un análisis general del proceso de formación doctoral, desde el punto de vista del alumno. Pienso que este espacio debería ser importante y tal vez, exigido en alguna instancia, como por ejemplo dentro del escrito al finalizar el proceso de la experiencia científica, ya que permite una retroalimentación entre todas las partes involucradas durante la formación de un científico (autor, tutor, comisión, escuela de postgrado en general), porque finalmente todos somos actores con una opinión desde una perspectiva distinta, sin embargo, considero que en general el alumno no tiene el espacio dentro de esta conversación para plantear la suya y es algo que debemos trabajar entre todos, para la calidad en la formación de capital humano.

A continuación, quisiera resumir la serie de cambios que ha experimentado esta tesis desde que se planteó como un proyecto de tesis hace un par de años y cómo esos cambios han impactado en el resultado final que se plasmó en este escrito.

En un comienzo la tesis se titularía *“PGE2 induce la activación de la GTPasa pequeña Rab5 contribuyendo a la EMT en células de Adenocarcinoma Colorrectal”*, título que fue bastante arriesgado considerando que no había antecedentes claros que respalden la hipótesis planteada. Luego del primer avance de tesis, con la ayuda y recomendación de la Comisión Evaluadora, cambiamos el título a *“PGE2 induce la activación de la GTPasa pequeña Rab5 contribuyendo a la internalización de E-cadherina en células HT29 de adenocarcinoma colorrectal”*, de manera que el estudio de EMT se re-dirigió hacia el cambio en la localización de E-cadherina en el modelo celular planteado, de lo cual ya había resultados prometedores. Sin embargo, se planteaba como objetivo específico, evaluar el requerimiento de Rab5 para el cambio generado por PGE2, para lo cual se trabajó en la generación de líneas con expresión estable de un shRNA contra Rab5, en la cual mediante el estímulo con PGE2 y restauración de la función de la GTPasa mediante transfecciones de mutantes para Rab5, se pretendía evaluar el requerimiento de Rab5 para el efecto que generaba PGE2 sobre E-cadherina. Por motivos de contingencia nacional e internacional, este experimento, junto con otros más que se mencionaron en la discusión, no pudieron ser completados. Esto, impulsó un nuevo replanteamiento del diseño de la tesis, de forma que

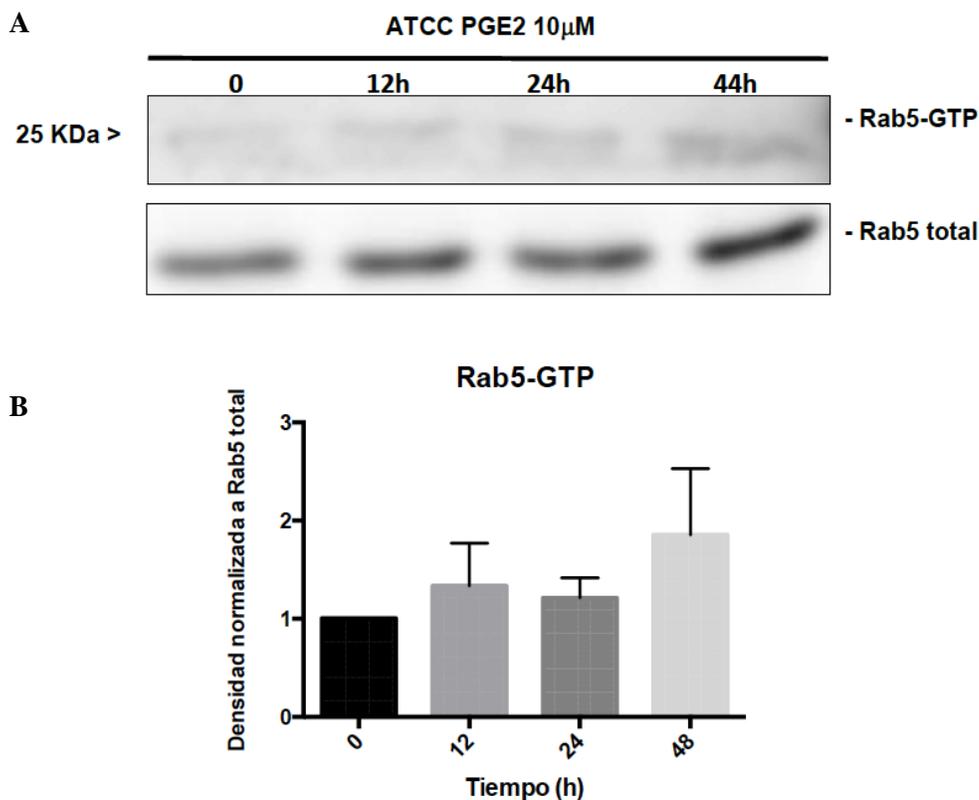
se pudiera dar un cierre a este estudio, con los experimentos ya realizados, hasta el momento de dejar de asistir a realizar trabajo experimental, debido a la contingencia. Así fue como finalmente decidimos plantear el título actual, cuya hipótesis implícita pudo ser respondida, incluyendo estrategias experimentales que en un comienzo habían sido desechadas, pero que sorpresivamente con los cambios introducidos, esta vez apoyaban la hipótesis, como por ejemplo la caracterización del modelo celular HT29(US), la medición del marcador mesenquimal Vimentina y el estudio de migración celular por Transwell, que si bien no posee el número de experimentos independientes para obtener una estadística confiable, apoya la hipótesis, dejando abierto un espacio para proyecciones experimentales futuras.

Todos los cambios mencionados, no son ajenos al trabajo científico en general, por lo que no quería dejar de mencionarlos, ya que pienso que son una experiencia fundamental dentro de la formación científica y si bien, en el manuscrito para publicación científica (como generalmente se exige), hicimos una adaptación para mostrar solamente los experimentos que tributan hacia resultados positivos, el trabajo de tesis fue mucho más extenso y con una serie de obstáculos que, más que dificultar mi formación, la enriquecieron y de lo cual me encuentro bastante agradecido, porque en el trabajo científico debe haber capacidad de adaptación, lo cual finalmente conduce a un trabajo más completo en cuanto al método científico se refiere.

A continuación, se muestran una serie de anexos, donde se exponen por orden de objetivo específico relacionado, estrategias experimentales que no pudieron realizarse, resultados de experimentos que si se realizaron y complementan los resultados ya discutidos y otros que se realizaron, pero no tuvieron las repeticiones necesarias para obtener una estadística significativa, pero que tributaron hacia mi formación doctoral independientemente del enfoque y resultado esperado originalmente.

## 2. Cinética de activación de Rab5

Si bien se observó un máximo de activación de Rab5 a las 6h por el estímulo con PGE2, (figura 2), decidimos explorar si esta activación aumentaba en tiempos mayores de estímulo, sin embargo, no encontramos diferencias significativas.

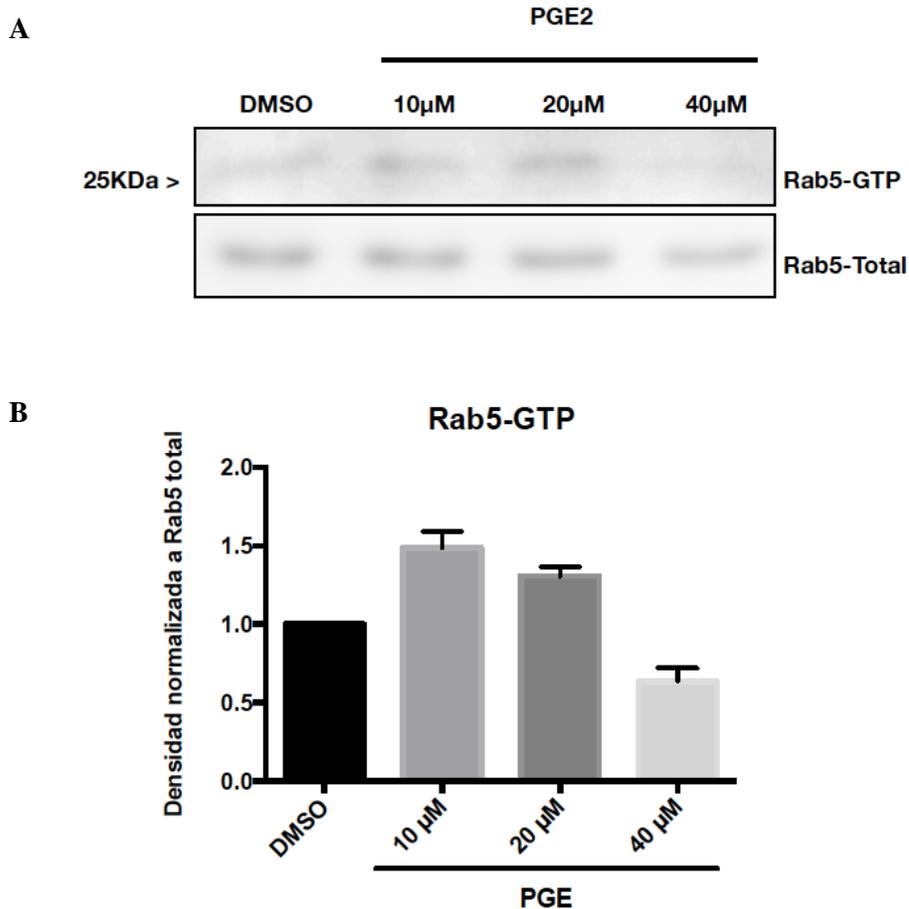


### **Anexo 2: Cinética de activación de Rab5 en células HT29(ATCC) estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M.**

A: Imagen representativa de Western Blot para Rab5-GTP y Rab5-total obtenidos por la técnica de pulldown, en células estimuladas con PGE2 10 $\mu$ M por 0, 12, 24 y 48h. B: Gráfico que representa las medias de las densidades de 4 experimentos independientes de Rab5-GTP relativo a su respectivo Rab5-total (ANOVA test, diferencias no significativas).

### 3. Efecto de concentraciones de PGE2 mayores a 10µM en la activación de Rab5

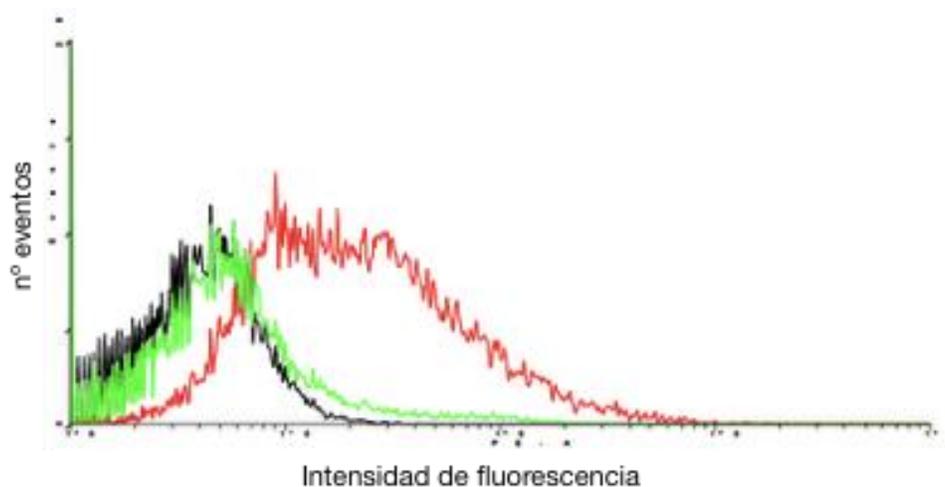
El efecto óptimo de activación de Rab5 se logró con una concentración de 10µM, sin embargo, decidimos explorar si con concentraciones mayores de PGE2 se lograba un efecto mayor, pero no logramos observar diferencias significativas.



**Anexo 3: Niveles de Rab5-GTP en células HT29(ATCC) estimuladas con concentraciones crecientes de PGE2 por 6h.** A: Imagen representativa de Western Blot para Rab5-GTP y Rab5-total obtenidos por la técnica de pulldown, en células estimuladas con PGE2 10, 20 y 40µM por 6h. B: Gráfico que representa las medias de las densidades de 3 experimentos independientes de Rab5-GTP relativo a su respectivo Rab5-total (ANOVA test, diferencias no significativas).

#### 4. Cuantificación de la internalización de E-Cadherina de superficie

Para obtener información cuantitativa de la internalización de E-cadherina inducida por PGE2, se realizó la técnica de citometría de flujo en células no permeabilizadas, marcadas con un anticuerpo dirigido contra la región extracelular de E-cadherina. Se observó que la intensidad de fluorescencia para E-cadherina superficial (G media, N=1) disminuye aproximadamente 4 veces frente al tratamiento con PGE2 10 $\mu$ M (G media: 21,94 y 5,45 en condición control y tratadas con PGE2, respectivamente). Lo anterior sugiere que si bien la E-cadherina total no está siendo degradada a las 6h de estímulo, sí está siendo internalizada desde la superficie (Figura 10). La técnica quedó en etapa de estandarización antes de lograr obtener repeticiones óptimas para obtener una estadística significativa.

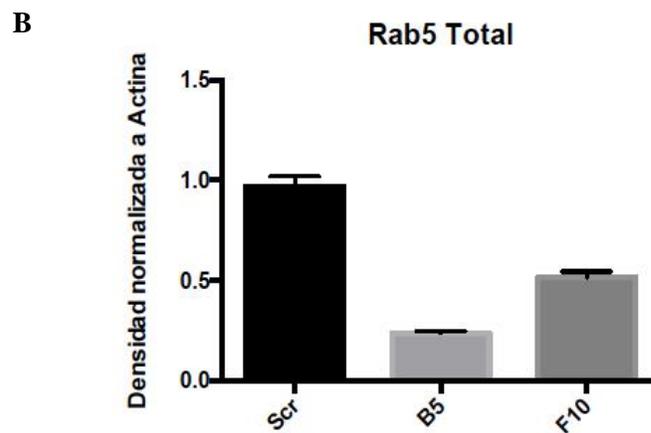
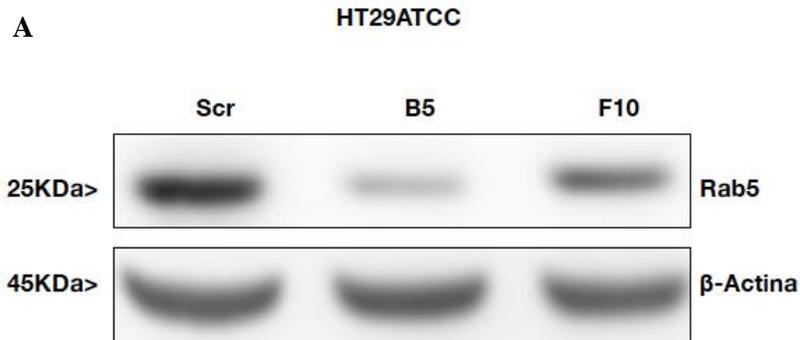


**Anexo 4: Internalización de E-cadherina por Citometría de Flujo.** Histograma que muestra número de eventos por intensidad de fluorescencia. En negro se muestra la condición sin anticuerpo secundario, en rojo y verde se muestran condiciones incubadas con el anticuerpo secundario. Rojo, células sin tratamiento (media de fluorescencia 21,94); verde, células tratadas con PGE2 10 $\mu$ M por 6h (media de fluorescencia de 5,45) (N=1, experimento suspendido en fase de estandarización).

## **5. Generación de líneas celulares HT29(ATCC) con expresión estable de shRNA contra Rab5.**

Anteriormente durante el desarrollo de esta tesis, se había propuesto profundizar en el rol directo que pudiera tener Rab5 en la internalización de E-cadherina inducida por PGE2, lo que constituía un objetivo específico por sí solo, pero por diversos motivos estos experimentos no pudieron ser llevados a cabo. Para evaluar el requerimiento de Rab5 en la internalización de E-cadherina inducida por PGE2, primero fue necesario generar las líneas celulares HT29(ATCC) con expresión estable de shRNA contra Rab5. Como se detalla en materiales y métodos, se obtuvieron 3 vectores lentivirales codificantes para un shRNA contra Rab5 (Scr, B5 y F10). Luego, se infectaron células HT29(ATCC) con los medios enriquecidos en partículas lentivirales y posteriormente, ya que los plasmidios utilizados poseen un gen para la resistencia a Puromicina, se realizó un proceso de selección, utilizando medio de cultivo con Puromicina 2µg/mL. Una vez estabilizadas las células, estas se amplificaron y criopreservaron para su uso en los siguientes experimentos. El silenciamiento de la expresión de Rab5 fue comprobado mediante Western Blot, en homogenizados totales de las distintas líneas celulares y se observó que, tanto las secuencias de shRNA B5 y F10 disminuyen la expresión total de Rab5 significativamente, siendo B5 el más eficaz, ya que disminuye la expresión de Rab5 a un 24% residual, con respecto al Scr, mientras que en F10, la disminuye a un 53% residual.

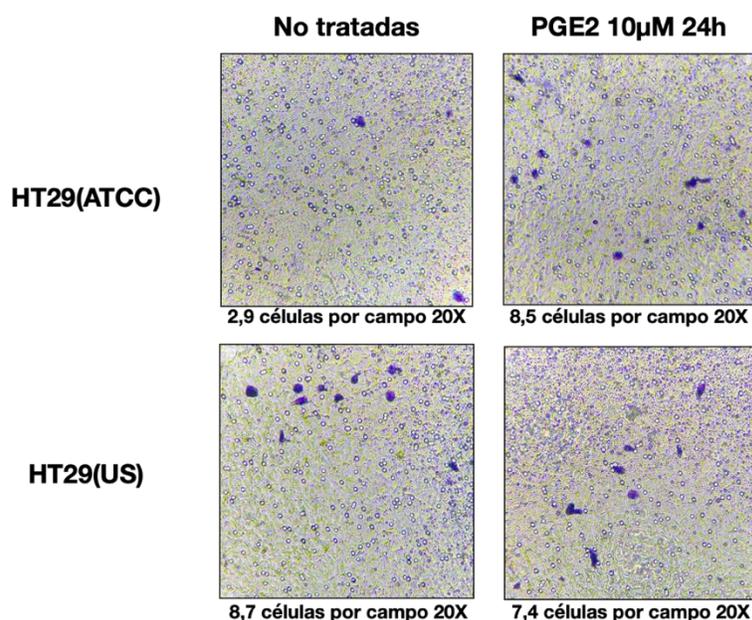
El objetivo experimental de este material fue evaluar el efecto de PGE2 en la internalización de E-cadherina en células que basalmente poseen una disminución la expresión de la GTPasa pequeña Rab5 que, como nuestros resultados indican, pareciera estar implicada en este proceso, primero porque es activable por PGE2 y segundo, porque E-cadherina es endocitada a endosomas tempranos EEA1-positivos. El siguiente paso consistía en transfectar estas células ya sea con secuencias *Wild Type*, con la mutante activa o la mutante inactiva para ver si la re-expresión de un Rab5 funcional, es capaz de restaurar el efecto de PGE2 sobre E-cadherina. Sería interesante que en el futuro se siga explorando esta estrategia experimental, considerando que el material ya se generó exitosamente.



**Anexo 5. Expresión de Rab5 en homogenizados totales de células HT29ATCC que expresan establemente un shRNA contra Rab5.** En A, Western Blot representativo que muestra la expresión protéica de Rab5 en células HT29ATCC-shRNARab5-Scr, B5 y F10, además del control de carga  $\beta$ -Actina. En B se muestra la gráfica en donde se comparan las densidades de las bandas normalizadas a  $\beta$ -Actina para cada caso, resultado de 3 experimentos independientes ( $p < 0,05$ )

## 6. Ensayo de migración celular en *Transwell*

Durante la comparación fenotípica y caracterización de las células HT29(ATCC) y HT29(US) mostradas en las figuras 7 y 8, quisimos, además, estudiar la diferencia en la capacidad migratoria de ambas líneas celulares y observar si PGE2 es capaz de inducir un aumento en esta capacidad. Debido a uno de los cambios introducidos durante el desarrollo de esta tesis, la continuación de este trabajo experimental se discontinuó. Sin embargo, finalmente decidimos estudiar la sobre-activación de Rab5 y la internalización de E-cadherina como contribuyentes al estado de EMT, cuando comparamos las líneas celulares HT29(ATCC) y su derivada más metastásica HT29(US). En ese contexto, estos resultados, si bien no poseen las repeticiones experimentales para obtener una estadística significativa, apuntan hacia el estado mesenquimal de las células HT29(US), ya que al parecer migran más que las células HT29(ATCC) y que estas últimas, al ser estimuladas con PGE2, aumentan su capacidad migratoria. Sería interesante continuar con esta línea de investigación en el futuro, ya que es probable que la sola internalización de E-cadherina inducida por PGE2 en las células HT29(ATCC), sería suficiente para permitir el aumento en la capacidad migratoria de estas células. Asimismo, sería interesante indagar la posibilidad de que la migración celular inducida por PGE2 sea dependiente de la activación de Rab5.

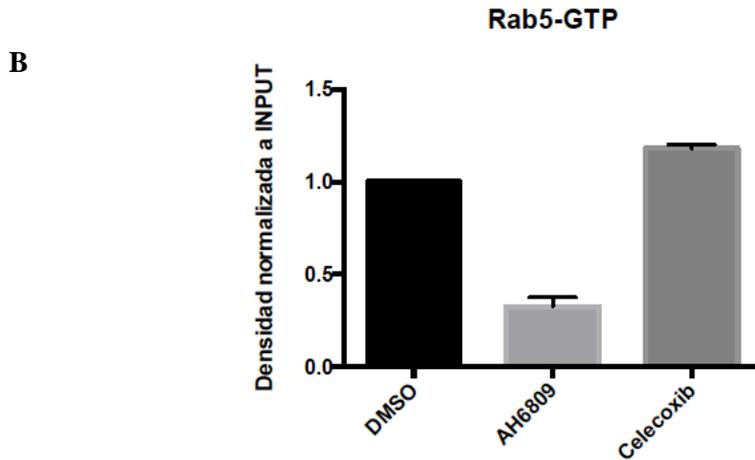
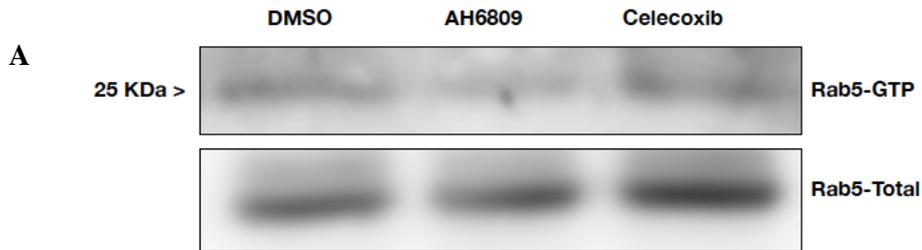


**Anexo 6. Ensayo de Transwell para evaluar migración celular en células HT29(ATCC) y HT29(US), tratadas o no con PGE2 10 $\mu$ M. Se muestran imágenes representativas del fondo de pocillos para Transwell teñidos con cristal violeta para identificar a las células bajo microscopía de luz (no hay repeticiones para obtener estadística, 20X).**

## 7. Efecto de PGE2 sobre Rab5 en células HT29(US)

En la figura 9, se discutió sobre el posible efecto de PGE2 sobre el alto nivel de activación en estado basal en las células HT29(US), donde se observó que las células no responden al estímulo externo con PGE2 sobre-activando a Rab5 por sobre el nivel basal y además se demostró que al incubar las células con AH6809, antagonista de EP2, ese nivel basal disminuye significativamente, indicando que el estado de activación de Rab5 en estas células, es influenciado por la activación del receptor de PGE2. En este punto además utilizamos Celecoxib para inhibir río arriba la generación de PGE2, es decir a nivel de la enzima COX-2, ante lo que esperábamos una situación parecida a la observada con AH6809, sin embargo, el nivel de activación de Rab5 en células incubadas con Celecoxib, no disminuyó, lo que nos genera una serie de interrogantes que serían interesantes de estudiar en el futuro. En primer lugar, pensamos que los tiempos de incubación con Celecoxib y la inhibición de la COX-2, puede no haber sido suficiente para ser evidenciados en la eventual disminución de la concentración de PGE2 ya secretada en el medio de cultivo. Tiempos mayores de incubación, serían interesantes de analizar. Por otra parte, la inhibición de COX-2 está en un punto mucho más alejado dentro de la cascada de señalización que teorizamos, llega hasta la activación de Rab5. Sólo podemos deducir que al menos en el período de tiempo estudiado, la sobreproducción de PGE2 no es la directa responsable del nivel de activación de Rab5 en células HT29(US), pero sí, la señalización desde su receptor EP2, que pudiera estar sobre-activado por diversas razones que pudieran ser analizadas en el futuro.

Finalmente, para dar el cierre a la teoría de que las células HT29(US) al ser más malignas producen más PGE2, y que debido a esto presentan una mayor activación de Rab5 y una mínima expresión de E-cadherina, se tuvo en mente la medición cuantitativa de la producción PGE2 en los medios de cultivo, mediante el uso de un kit de ELISA *Prostaglandin E2 ELISA kit monoclonal* (Cayman Chemicals #514010) para la detección de PGE2. Por diversos motivos de contingencia mundial, logramos conseguir el kit y diseñar los experimentos respectivos, pero estos no alcanzaron a ser realizados, por lo que también queda pendiente para ser estudiado en el futuro.



**Anexo 7. Niveles de Rab5-GTP en células HT29(US) incubadas con AH6809 o Celecoxib.** A: Western Blot representativo para Rab5 y Rab5-total en homogenizados totales. B: la gráfica muestra los promedios de las densidades de las bandas normalizadas a sus respectivos Rab5-total de 3 experimentos independientes (test ANOVA, t test \* $p < 0,05$  entre DMSO y AH6809; entre DMSO y Celecoxib no hubo diferencias significativas).

## Referencias

1. Nakanishi, M. & Rosenberg, D. W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin. Immunopathol.* **35**, 123–137 (2013).
2. Wang, D. & Dubois, R. N. Prostaglandins and cancer. *Gut* **55**, 115–122 (2006).
3. Jakobsson, P. J., Thorén, S., Morgenstern, R. & Samuelsson, B. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7220–7225 (1999).
4. Coleman, R. A., Smith, W. L. & Narumiya, S. VIII. International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* **46**, 205–229 (1994).
5. Sugimoto, Y. & Narumiya, S. Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 11613–11617 (2007).
6. Ota, S., Bamba, H. & Kato, A. Colorectal cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Acta Pharmacol. Sin.* **21**, 391–395 (2000).
7. Rosenberg, L. *et al.* A hypothesis: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 355–358 (1991).
8. Fischer, S. M., Hawk, E. T. & Lubet, R. A. Coxibs and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in animal models of cancer chemoprevention. *Cancer Prev. Res.* **4**, 1728–1735 (2011).
9. Waddell, W. R., Ganser, G. F., Cerise, E. J. & Loughry, R. W. Sulindac for polyposis of the colon. *Am. J. Surg.* **157**, 175–179 (1989).
10. Gupta, R. A. & Dubois, R. N. Colorectal Cancer Prevention of Cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 11–21 (2001).
11. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436–444 (2008).
12. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
13. Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *BBA - Rev. Cancer* **1198**, 11–26 (1994).
14. Janiszewska, M., Primi, M. C. & Izzard, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J. Biol. Chem.* **295**, jbc.REV119.007759 (2020).
15. Shapiro, L. & Weis, W. I. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1–21 (2009).

16. Cavallaro, U. & Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 118–132 (2004).
17. Makrilia, N., Kollias, A., Manolopoulos, L. & Syrigos, K. Cell adhesion molecules: Role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest.* **27**, 1023–1037 (2009).
18. Igarashi, T. *et al.* Association of RAB5 overexpression in pancreatic cancer with cancer progression and poor prognosis via E-cadherin suppression. *Oncotarget* **8**, 12290–12300 (2017).
19. Gloushankova, N. A., Zhitnyak, I. Y. & Rubtsova, S. N. Role of Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Progression. **83**, (2018).
20. Li, Z., Yin, S., Zhang, L., Liu, W. & Chen, B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 16445–16455 (2017).
21. Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W. & Van Roy, F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**, 107–119 (1991).
22. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
23. Brüser, L. & Bogdan, S. Adherens junctions on the move—membrane trafficking of E-cadherin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, 1–18 (2017).
24. Manuscript, A. Erratum to Adherens junctions: From molecular mechanisms to tissue development and disease (Sub-cellular biochemistry)). *Subcell. Biochem.* **60**, E1 (2015).
25. Cadwell, C. M., Su, W. & Kowalczyk, A. P. Cadherin tales: Regulation of cadherin function by endocytic membrane trafficking. *Traffic* **17**, 1262–1271 (2016).
26. Wandinger-Ness, A. & Zerial, M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a022616 (2014).
27. Pylypenko, O., Hammich, H., Yu, I. M. & Houdusse, A. Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. *Small GTPases* **9**, 22–48 (2018).
28. Numrich, J. & Ungermann, C. Endocytic Rabs in membrane trafficking and signaling. *Biol. Chem.* **395**, 327–333 (2014).
29. Pfeffer, S. R. Rab GTPases: Master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* **28**, 712–715 (2017).
30. Mosesson, Y., Mills, G. B. & Yarden, Y. Derailed endocytosis: An emerging feature of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 835–850 (2008).
31. Torres, V. A. Rab'ing tumor cell migration and invasion. *Cell Adh. Migr.* **8**, 84–87 (2014).

32. Mendoza, P. *et al.* Rab5 activation promotes focal adhesion disassembly, migration and invasiveness in tumor cells. *J. Cell Sci.* **126**, 3835–3847 (2013).
33. Silva, P. *et al.* Hypoxia promotes Rab5 activation, leading to tumor cell migration, invasion and metastasis. *Oncotarget* **7**, 29548–29562 (2016).
34. Silva, P. *et al.* Down-regulation of Rab5 decreases characteristics associated with maintenance of cell transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 642–646 (2015).
35. Díaz, J. *et al.* Rab5 is required in metastatic cancer cells for caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion. *J. Cell Sci.* **127**, 2401–2406 (2014).
36. Kimura, T., Sakisaka, T., Baba, T., Yamada, T. & Takai, Y. Involvement of the Ras-Ras-activated Rab5 guanine nucleotide exchange factor RIN2-Rab5 pathway in the hepatocyte growth factor-induced endocytosis of E-cadherin. *J. Biol. Chem.* **281**, 10598–10609 (2006).
37. Yang, J. *et al.* Rab5-mediated VE-cadherin internalization regulates the barrier function of the lung microvascular endothelium. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 4849–4866 (2015).
38. Kisslov, L., Hadad, N., Rosengraten, M. & Levy, R. HT-29 human colon cancer cell proliferation is regulated by cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  dependent PGE2 via both PKA and PKB pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 1224–1234 (2012).
39. Jee, Y. S., Jang, T. J. & Jung, K. H. Prostaglandin E2 and interleukin-1 $\beta$  reduce E-cadherin expression by enhancing snail expression in gastric cancer cells. *J. Korean Med. Sci.* **27**, 987–992 (2012).
40. Castellone, M. D., Teramoto, H., Williams, B. O., Druey, K. M. & Gutkind, J. S. Medicine: Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin- $\beta$ -catenin signaling axis. *Science (80-. ).* **310**, 1504–1510 (2005).
41. Reyes, M. *et al.* Nuclear accumulation of  $\beta$ -catenin is associated with endosomal sequestration of the destruction complex and increased activation of Rab5 in oral dysplasia. *FASEB J.* **34**, 4009–4025 (2020).
42. Mendoza, P., Díaz, J., Silva, P. & Torres, V. A. Rab5 activation as a tumor cell migration switch. *Small GTPases* **5**, 1–4 (2014).
43. O’Callaghan, G. & Houston, A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: Possible therapeutic targets? *Br. J. Pharmacol.* **172**, 5239–5250 (2015).
44. Yang, W. L. *et al.* E-Cadherin Is Required for Caveolin-1-Mediated Down-Regulation of the Inhibitor of Apoptosis Protein Survivin via Reduced  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-Dependent Transcription. *Cancer Metastasis Rev.* **27**, 7703–7717 (2007).
45. Torres, V. A., Mielgo, A., Barilà, D., Anderson, D. H. & Stupack, D. Caspase 8 promotes

- peripheral localization and activation of Rab5. *J. Biol. Chem.* **283**, 36280–36289 (2008).
46. Torres, V. A. *et al.* E-Cadherin Is Required for Caveolin-1-Mediated Down-Regulation of the Inhibitor of Apoptosis Protein Survivin via Reduced  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-Dependent Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7703–7717 (2007).
  47. Mizuno, R., Kawada, K. & Sakai, Y. Prostaglandin E2/EP signaling in the tumor microenvironment of colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
  48. Mellman, I. & Yarden, Y. Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
  49. Piotrowski, I. *et al.* Increased expression of Rab5A predicts metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **8**, 422–427 (2017).
  50. Zhang, D., Lu, C. & Ai, H. Rab5a is overexpressed in oral cancer and promotes invasion through ERK/MMP signaling. *Mol. Med. Rep.* **16**, 4569–4576 (2017).
  51. Asting, A. G., Iresjö, B. M., Nilsberth, C., Smedh, U. & Lundholm, K. Host knockout of E-Prostanoid 2 receptors reduces tumor growth and causes major alterations of gene expression in prostaglandin E2-Producing tumors. *Oncol. Lett.* **13**, 476–482 (2017).
  52. Brouxhon, S. *et al.* Sequential down-regulation of E-cadherin with squamous cell carcinoma progression: Loss of E-cadherin via a prostaglandin E2-EP2-dependent posttranslational mechanism. *Cancer Res.* **67**, 7654–7664 (2007).
  53. Gloushankova, N. A., Rubtsova, S. N. & Zhitnyak, I. Y. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. *Tissue Barriers* **5**, 1–15 (2017).
  54. Vu, T. & Datta, P. K. Regulation of EMT in colorectal cancer: A culprit in metastasis. *Cancers (Basel)*. **9**, 1–22 (2017).
  55. Kourtidis, A., Lu, R., Pence, L. J. & Anastasiadis, P. Z. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp. Cell Res.* **358**, 78–85 (2017).
  56. Le Bras, G. F., Taubenslag, K. J. & Andl, C. D. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 365–373 (2012).
  57. Woichansky, I., Beretta, C. A., Berns, N. & Riechmann, V. Three mechanisms control E-cadherin localization to the zonula adherens. *Nat. Commun.* **7**, 1–11 (2016).
  58. Schiano Lomoriello, I. *et al.* A self-sustaining endocytic-based loop promotes breast cancer plasticity leading to aggressiveness and pro-metastatic behavior. *Nat. Commun.* **11**, 1–20 (2020).
  59. Wainszelbaum, M. J., Proctor, B. M., Pontow, S. E., Stahl, P. D. & Barbieri, M. A. IL4/PGE2 induction of an enlarged early endosomal compartment in mouse

macrophages is Rab5-dependent. *Experimental Cell Research* 312, 2238–2251 (2006).