

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ROL DE LA ADHESIÓN MEDIADA POR CADHERINA E

LIC. CAROLINA DANIELA GALETTO

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR HUGO CASCO

CODIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA FERNANDA IZAGUIRRE

LABORATORIO DE MICROSCOPIA APLICADA A ESTUDIOS MOLECULARES Y CELULARES

FACULTAD DE INGENIERÍA- UNER

2016

ÍNDICE

Agradecimientos	8
Antecedentes	11
1. Abreviaturas y símbolos	16
2. Resumen	18
3. Summary	22
4. Introducción	25
4.1. Rol de la adhesión mediada por cadherina E	25
4.2. Metamorfosis de anuros regulada por T3	26
4.2.1. Mecanismo de acción de la hormona T3.....	32
4.2.2. Remodelación del tubo digestivo durante la metamorfosis	35
4.3. Uniones celulares	38
4.4. Cadhesomas y UAs	44
4.4.1. Cadherinas	44
4.4.1.1. Dimerización de cadherinas	48
4.4.2. Cateninas	50
4.4.2.1. β -Catenina	50
4.4.2.2. p120-Catenina	53
4.4.2.3. α -Catenina.....	54
4.4.3. UAs y citoesqueleto de actina	56
4.4.4. UAs y determinación de la polaridad epitelial	58
4.5. Dinámica de las UAs y su regulación	59
4.5.1. Rol del tráfico vesicular	59
4.5.2. Rol de las GTPasas pequeñas.....	63
4.5.3. Regulación transcripcional de los componentes de la unión	67
5. Hipótesis y Objetivos	71
5.1. Hipótesis	71
5.2. Objetivo general	71
5.3. Objetivos particulares	71
6. Materiales y métodos	72
6.1. Animales	72

6.2. Inducción de la metamorfosis de <i>Rhinella arenarum</i> y <i>Xenopus laevis</i> por agregado exógeno de hormona tiroidea T3	73
6.3. Determinación de los parámetros anatómicos de crecimiento larval	74
6.4. Técnicas de microscopía	75
6.4.1. Análisis histológico de la región fúndica del estómago	75
6.4.2. Estudios morfométricos ultraestructurales de las uniones intercelulares del epitelio gástrico	76
6.5. Estudios Moleculares	77
6.5.1. Obtención de secuencias nucleotídicas de <i>Rhinella arenarum</i>	77
6.5.2. Determinación de la expresión génica por RT-sqPCR a tiempo final	81
6.6. Estudios bioinformáticos	82
6.6.1. Análisis de las secuencias de <i>Rhinella arenarum</i>	82
6.6.2. Análisis <i>in silico</i> de los genes evaluados	83
6.7. Análisis estadístico	84
7. Resultados	87
7.1. <i>Rhinella arenarum</i>	87
7.1.1. Obtención y análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes bajo estudio	87
7.1.2. Estudios de inducción	90
7.1.2.1. Evaluación del modelo de inducción hormonal a la metamorfosis de <i>R. arenarum</i>	90
7.1.2.2. Evaluación de la expresión génica de β -catenina en tubo digestivo de <i>R. arenarum</i>	95
7.2. <i>Xenopus laevis</i>	96
7.2.1. Evaluación del modelo de inducción hormonal a la metamorfosis de <i>X. laevis</i>	97
7.2.1.1. Evaluación de los cambios de los parámetros anatómicos e histológicos provocados por T3	97
7.2.1.2. Estudio ultraestructural de las uniones intercelulares en células del epitelio gástrico de <i>X. laevis</i>	105
7.2.1.3. Evaluación de los cambios en la expresión génica provocados por T3	108
7.2.2. Expresión génica de las moléculas de los complejos de adhesión en el tubo digestivo de <i>X. laevis</i> inducidos con T3	109
7.2.3. Expresión génica de moléculas que participan en la cascada de señalización intracelular	113
7.2.4. Búsqueda de secuencias consenso de los ERTs en los genes estudiados a nivel transcripcional en <i>Xenopus</i>	119
8. Discusión	123

8.1. Secuencia nucleotídica de β -catenina de <i>Rhinella arenarum</i>	127
8.2. Evaluación del modelo de inducción en anfibios	131
8.3. Regulación transcripcional de los complejos de UAs.....	148
8.4. Rol de las GTPsas pequeñas.....	159
9. Conclusiones	177
Anexo.	180
10. Bibliografía	181

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de reguladores GEFs y GAPs que intervienen en la regulación de distintas GTPasas que actúan a nivel de las UAs.....	65
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en reacciones de amplificación de PCR	78
Tabla 3. Análisis bioinformático de la secuencia obtenida de GAPDH de <i>R. arenarum</i>	88
Tabla 4. Medidas morfométricas de <i>R. arenarum</i>	93
Tabla 5. Medidas morfométricas	99
Tabla 6. Resumen de los resultados de la predicción de elementos de respuesta a T3	121
Tabla 7. Resumen efecto de T3 sobre moléculas de UAs	151
Tabla 8. Resumen efecto de T3 sobre moléculas de UEs.....	158
Tabla 9. Resumen del efecto de T3 sobre GTPasas pequeñas y sus reguladores.....	163
Tabla 10. Medias morfométricas y mortalidad.....	180

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de anfibios.....	27
Figura 2. Representación esquemática de las diversas isoformas codificadas por los genes RT α (A) y RT β (B).	33

Figura 3. Modelo dual de la función de los RTs durante el desarrollo de anfibios..	35
Figura 4. Remodelación del tubo digestivo durante la metamorfosis de <i>Xenopus laevis</i>	37
Figura 5. Complejos de unión entre células epiteliales.	40
Figura 6. Modelo propuesto para la estructura molecular de las uniones adherentes..45	
Figura 7. Representación esquemática de las moléculas que constituyen el complejo adherente dependiente de cadherina E.....	47
Figura 8. Diferencias entre ZA y PA.....	57
Figura 9. Modelo del mecanismo de ensamblaje de UAs epiteliales..	58
Figura 10. Vías del tráfico vesicular de cadherina E.	60
Figura 11. Vías de endocitosis de cadherina E..	62
Figura 12. Estructura y secuencias características de las GTPsas pequeñas.	64
Figura 13. Regulación de las GTPasas pequeñas por el complejo de UAs.	66
Figura 14. Esquema del diseño experimental aplicado..	74
Figura 15. Imágenes señalando los parámetros anatómicos de crecimiento larval evaluados para corroborar los efectos del tratamiento hormonal.....	75
Figura 16. (A) Productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores diseñados.....	89
Figura 17. (A) Esquema de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del fragmento de ADNc obtenido.	91
Figura 18. La hormona T3 induce metamorfosis prematura en larvas de <i>R. arenarum</i> ..92	
Figura 19. La hormona T3 induce remodelación en el tubo digestivo de <i>R. arenarum</i>	94
Figura 20. Niveles de expresión génica de β -catenina de <i>Rhinella arenarum</i> inducida por T3 exógena relativos al grupo control.	96
Figura 21. La hormona T3 exógena induce metamorfosis prematura en larvas de <i>X. laevis</i>	98

Figura 22. La hormona T3 exógena induce remodelación en el tubo digestivo de <i>X. laevis</i> .	100
Figura 23. Morfología de la región fúndica del estómago de <i>X. laevis</i> .	102
Figura 24. Región fúndica del estómago de <i>Xenopus laevis</i> .	104
Figura 25. Distribución de los complejos de unión intercelular.	105
Figura 26. A. Análisis de la ocurrencia de los distintos tipos de uniones intercelulares del epitelio gástrico de <i>X. laevis</i> , durante el desarrollo espontáneo e inducido por T3 exógena.	106
Figura 27. Ultraestructura de los complejos de unión en el epitelio estomacal de <i>X. laevis</i> , durante la metamorfosis espontánea (NF53 y NF66) e inducida por T3 exógena (T324h y T35d).	107
Figura 28. Reciclaje de complejos de unión por acción de T3 exógena, en animales tratados por 24 h (A-C) y 5 días (D-E).	108
Figura 29. Niveles de expresión génica de RT β e I-FABP relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de <i>X. laevis</i> tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66).	109
Figura 30. Niveles de expresión génica de cadherina E, β -catenina, α -catenina y p120, relativos al grupo control inicial (NF53) en tubos digestivos completos de larvas de <i>X. laevis</i> tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h), 5 días (T3x5d) y control final (NF66).	111
Figura 31. Niveles de expresión génica de ocludina y ZO1 relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de <i>X. laevis</i> tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66).	112
Figura 32. Niveles de expresión génica de las pequeñas GTPasas relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de <i>X. laevis</i> tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66).	115

Figura 33. Niveles de expresión génica de los GEFs y GAPs relativos al grupo control (NF53) en tubos digestivos completos de larvas de <i>X. laevis</i> tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66).	117
Figura 34. Niveles de expresión génica de PGGT y ARP2 relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de <i>X. laevis</i> tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66)..	119
Figura 35. Secuencias consenso de los ERTs en genes de respuesta a T3 en <i>Xenopus</i>	120
Figura 36. Resultados del análisis <i>in silico</i> del rastreo de secuencias génicas ERT.....	122
Figura 37. A. La ilustración muestra los cambios del intestino de las larvas de <i>X. laevis</i> durante la metamorfosis.	136
Figura 38. Modelo de señalización de la activación de Rac por cadherinas, que participa en el reconocimiento célula - célula temprano.....	165
Figura 39. Eventos moleculares desencadenados por la HT en el epitelio gastrointestinal durante la metamorfosis.....	176
Figura 40. Efectos anatómicos sobre larvas premetamórficas de <i>R. arenarum</i> de las distintas concentraciones de T3	180

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un profundo agradecimiento al Dr. Víctor Hugo Casco, director de esta tesis, primero por creer en mí, aceptándome bajo su dirección. También le agradezco profundamente el gran apoyo intelectual, compartiendo generosamente cada idea que pudiera hacer de mi tesis un mejor trabajo, lo que fue un aporte invaluable no solo para el desarrollo de esta tesis, sino también a mi desarrollo como investigadora. Además, por la inmensa paciencia y dedicación que me ha brindado a lo largo de todos estos años y principalmente durante la elaboración de este manuscrito.

A la Dra. María Fernanda Izaguirre, codirectora de la tesis, por su colaboración, sus valiosos aportes y principalmente por la posibilidad de diálogo y discusión en numerosas oportunidades, momentos que han enriquecido no solo esta tesis sino mi formación científica.

A todas las instituciones que han posibilitado realizar esta tesis: a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, a sus autoridades y al Comité Académico del Doctorado por recibirme, orientarme y admitirme como alumna de la carrera de doctorado en Ciencias Biológicas; a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos, por permitirme utilizar sus instalaciones para desarrollar el trabajo experimental; a la Universidad Nacional de Entre Ríos por otorgar los distintos subsidios con los que se financió este trabajo y al CONICET por haberme otorgado las becas de posgrado que han posibilitado su desarrollo.

A la Dra. Olga Avila, por atender y responder mis consultas sobre el análisis estadístico de los datos realizados en este trabajo.

Al Dr. Gonzalo Parra y al estudiante de Licenciatura en Bioinformática Nahuel Gonzales, quienes desinteresadamente han colaborado con parte de los estudios bioinformáticos y con gran entusiasmo y predisposición han logrado introducirme en el mundo de los 0 y 1. Especialmente a Nahuel que respondió a cada uno de mis llamados de auxilio cuando no entendía algo, por su esfuerzo en explicarme y en estudiar aquellas veces que el tampoco lo sabía. Además, por alegrar cada una

de nuestras conversaciones con frases desopilantes, logrando sacarme una sonrisa aun en los momentos de desesperación, mil gracias.

A todos mis compañeros del LAMAE, a los de siempre; Javier D. Z., Javier A., Mariana, Silvio; y a los más nuevitos, Valeria, Luciana, Ángel, Juani, Florencia y César, todos han contribuido a su manera al desarrollo de este trabajo, en lo académico y principalmente por su valiosa calidad humana.

Muy especialmente quiero agradecer a mis compañeros de trabajo y amigos entrañables, Enrique, Gabi y Viky, quienes me han acompañado incondicionalmente en cada paso durante este largo camino del doctorado. Tengo la inmensa fortuna de que sean parte de mi vida, porque de ellos he aprendido mucho más que ciencia.

A mis compañeros de docencia, Romina, Andrea, Laura y Adriana por su apoyo sobre todo en este último tiempo.

A mis amigas de toda la vida, que han sabido disculpar mis ausencias, siempre han tenido una palabra de ánimo, además de mostrarse interesadas cuando les intentaba explicar mi trabajo, para que a la siguiente reunión me preguntaran “¿Cómo están tus bichitos?” Estoy absolutamente convencida de que si de algo puedo presumir en esta vida es de los grandes amigos que tengo, lo que me hace sentir una persona muy afortunada. No hace falta que los nombre, ellos saben quiénes son y lo importantes que son para mí y aunque algunos están lejos, tengo la suerte de poder sentirme siempre acompañada.

A mis padres, quiénes me han inculcado el trabajo y el esfuerzo como pilares fundamentales para que los sueños dejen de serlo y se conviertan en logros; gracias a ellos por dejarme tomar las decisiones que me parecían más adecuadas, permitiéndome equivocarme, ya que de los errores he aprendido mucho. A mi papá, quien hoy no está físicamente pero me alcanza con cerrar los ojos para sentir su presencia y su amor; a mi mamá, que es una gran luchadora, siempre lo ha sido y hoy lo es más que nunca, gracias por tu presencia, ayuda y amor incondicional. A mis hermanos Rodrigo y Lautaro, porque cada uno a su manera me han enseñado a ser fuerte.

A Mateo, mi pequeño príncipe, por su infinito amor, por enseñarme a ser paciente, por darme paz y energías en un mismo abrazo, por demostrarme con solo 5 años qué cosas valen la pena y cuáles no; por cederle a esta tesis muchas horas de juego. A Pablo, mi compañero de vida, por acompañarme e impulsarme en este proyecto.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y han hecho posible este gran logro académico.

A todos mi eterno agradecimiento.

ANTECEDENTES

El trabajo de investigación que se describe en esta Tesis ha sido realizado en el Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LAMAE) y en la Cátedra de Biología Molecular y Celular, de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

El mismo fue desarrollado en su mayor parte con fondos de los siguientes proyectos:

PID UNER 60881, **“Influencia de T3 sobre los niveles de expresión de cadherina E, β - y α -catenina en el estómago larval de *Bufo arenarum*”**. Directora: Dra. Ma. Fernanda Izaguirre, co-director: Dr. Víctor H. Casco.

PICTO UNER N° 209, **“Rol de la Adhesión Celular en la Morfogénesis y el Mantenimiento de la Arquitectura Epitelial”**. Director: Dr. Víctor H. Casco.

Proyecto Director Novel UNER 6130, **“Secuenciación y caracterización de los transcritos de β -catenina de *Rhinella arenarum*”**. Director: Lic. Carolina D. Galetto.

Los resultados han sido dados a conocer parcialmente en las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos.

Publicaciones directamente relacionadas con el trabajo de Tesis:

Galetto C. D.; Izaguirre, M. F.; Bessone, V. & Casco, V. H. (2012) Isolation and nucleotide sequence analysis of the of *Rhinella arenarum* β -catenin: An mRNA and protein expression study during the larval stages of the digestive tract development. Gene, 511(2):256-64.

Galetto C. D.; Diaz-Zamboni J. E.; Adur J. F.; Vicente N. B.; Larrea D.; Bessone M. V.; Hasenahuer M.A.; Paravani E.V.; Bianchi M.; Casco V. H. y Izaguirre M. F. (2014) Estudio de la influencia de las hormonas tiroideas en el control de los sistemas de adhesión cadherinas-cateninas durante el desarrollo de vertebrados. *Ciencia, Docencia y Tecnología* (suplemento 4): 142-172. ISSN N° 2250-4559.

Galetto, C.D.; Izaguirre, M.F. and Casco, V.H. In vivo study of epithelial adhesion via E-cadherin- β -catenin–small GTPases and small G proteins under T3 regulation. *Cell Comm. and Signalling*. ISSN: 1873-9601. (Enviado).

Presentaciones en congresos nacionales e internacionales:

Galetto C. D.; Izaguirre, M. F.; Bessone, V. & Casco, V. H. (2011) **Analysis of the nucleotide sequence of *Rhinella arenarum* β -catenin**. 2^{do} Congreso Argentino de Bioinformática, 11–13 mayo de 2011, Universidad Católica de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Galetto C. D.; Izaguirre, M. F.; Bessone, V. & Casco, V. H. (2012) ***Rhinella arenarum* β -catenin-mRNA expression during the digestive tract metamorphosis**. VI International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology (LASDB), 26 al 29 de abril de 2012. Montevideo, Uruguay.

Hasenahuer M.A.; **Galetto C. D.**; Casco, V. H. & Izaguirre, M. F. (2012). **Phylogenetic relationships of *Rhinella arenarum* β -catenin. A developmental biology useful model**. 3^{er} Congreso Argentino de Bioinformática. 26, 27 y 28 de septiembre de 2012, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina.

Galetto C. D.; Izaguirre, M. F. & Casco, V. H. (2015). **Cell adhesion molecule and small GTPase T3-regulated genes in *X. laevis* gut epithelia**. LI Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), 3 al 6 de noviembre de 2015.

Publicaciones y presentaciones a congresos nacionales e internacionales relacionadas indirectamente con el trabajo de Tesis:

Izaguirre, M. F.; Larrea, D.; Adur, J. F.; Diaz-Zamboni, J. E.; Vicente, N.; **Galetto, C. D.** & Casco, V. H. (2010). **E-cadherin role in epithelial architecture maintenance**. **Cell Communication and Adhesion**. *Cell Communication & Adhesion*, 17, 1–12.

Vicente, N.; Diaz-Zamboni, J. E.; Adur, J. F.; Izaguirre; **Galetto, C. D.** & Casco, V. H. (2010). **Development of a semi-automatic algorithm for deconvolution and quantification of three-dimensional microscopy images**. *Acta Microscopica*, 19 (3): 328-33

Izaguirre, M. F.; Larrea, D.; Adur, J. F.; Diaz-Zamboni, J. E.; Vicente, N.; **Galetto, C. D.** & Casco, V. H. (2009). **Evaluación Morfogenética Tridimensional de los Contactos**

Epidérmicos. 10th Inter-American Congress on Electron Microscopy (CIASEM). CIASEM y Sociedad Argentina de Microscopía (SAMIC). Rosario, Santa Fe, Argentina.

ANTECEDENTES DEL GRUPO EN EL TEMA OBJETO DE ESTUDIO

1. Casco, V. H., Izaguirre, M. F. y Paz, D. A. (1998). Efecto de los Anticuerpos anti α -Catenina sobre la Embriogénesis de *Bufo arenarum*. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*, Tomo 69, pp. 55-61. ISSN N° 0037-850X
2. Casco, V.H., Izaguirre, M.F., Peralta Soler, A. and Paz, D.A. (2000). Expression of Polysialic Acid, α - and β -Catenins in Adult Toad Testis in Hibernation Stage and After Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Treatment. *European Journal of Morphology* 38, (3): 167-175. ISSN N° 0924-3860.
3. Izaguirre, M. F.; Peralta Soler, A. and Casco, V. H. (2000). Expression of NCAM-180 and N-cadherin during development in two south-american anuran species (*Bufo arenarum* and *Hyla nana*). *European Journal of Histochemistry*, 44: 407-418. ISSN N° 1121-760X.
4. Izaguirre, M. F.; Peralta Soler, A.; Lajmanovich, R. C. and Casco, V. H. (2001). α -Catenin expression in the digestive tract of metamorphosing *Hyla nana* tadpoles (Anura: Hylidae): an immunohistochemical study. *Amphibia-Reptilia*, 22 (2): 256-261. ISSN N° 0173-5373.
5. Izaguirre, M. F.; Adur, J. F.; Peralta Soler, A. and Casco, V. H. (2001). Alterations induced by E-cadherin and β -catenin antibodies during the development of *Bufo arenarum* (Anura: Bufonidae). *Histology and Histopathology*, 16 (4): 1097-1106. ISSN N° 0213-3911.
6. Izaguirre, M.F. (2003). Influencia de la expresión de las moléculas de adhesión celular en el desarrollo embrionario, larval y metamórfico de *Bufo arenarum*. Tesis de Doctorado, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
7. Adur, J.F.; Diaz-Zamboni, J.E.; Vicente, N.B.; Izaguirre, M.F. and Casco, V.H. (2007). Digital Deconvolution Microscopy: Development, Evaluation and Utilization in 3D quantitative studies of E-cadherin expression in skin of *Bufo arenarum* tadpoles. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*.

- Microscopy Book Series –Vol. 2 Applications in Physical/Chemical Sciences, 906-916. Edition. ISBN N° 13: 978-84-611-9420-9.
8. Salvatelli, A.; Caropressi, J.L.; Delrieux, C.; Izaguirre, M.F. & Casco, V. H. (2007). Cellular outline segmentation using fractal estimators. *Journal of Computer Science and Technology*, 7 (1): 105-111. ISSN N° 1860-4749.
 9. Izaguirre, M.F., García-Sancho, M.N., Miranda, L.A., Tomas, J., and Casco, V.H. (2008). Expression of cell adhesion molecules in the normal and T3 blocked development of the tadpole's kidney of *Bufo arenarum* (Amphibian, Anuran, Bufonidae). *Braz. J. Biol.* 68, 561–569. ISSN N° 1519-6984.
 10. Izaguirre, M. F.; Larrea, D.; Adur, J. F.; Diaz-Zamboni, J. E.; Vicente, N. and Casco, V.H. (2010) Role of E-Cadherin in Epithelial Architecture Maintenance. *Cell Communication and Adhesion* 17, 1–12. ISSN N° 1541-9061 print / 1543-5180 online.
 11. Izaguirre, M.F. and Casco, V.H. (2010). T3 regulates E-cadherin, β - and α -catenin expression during stomach metamorphic remodeling of *Bufo arenarum*. *Biotechnic and Histochemistry* 85 (5): 305-23. ISSN N° 1052-0295.
 12. Acosta, M.G.; Langhi, D.; Lassaga, S.; Casco, V.H. (2010). Estudios Bioinformáticos y Morfológicos en la Caracterización del Mecanismo de Polinización como un Proceso de Adhesión Célula-Célula en *Arabidopsis thaliana*” *Revista Científica Agropecuaria* 14 (1) 5-13. ISSN N° 0329-3602.
 13. Acosta M.A.; Ahumada M.A. Lassaga, S. Casco, V.H. (2012). PUB16 gene expression under abiotic stress and their putative role as an ARM repeat protein in *Arabidopsis thaliana* self-pollination pathway. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3, 609-619 ISSN Print N° 2156-8456, ISSN Online N° 2156-8502.
 14. Hasenahuer, M.A.; Casco V.H. and Izaguirre M.F. (2013). New footprints into metazoan C-1 family cadherin evolution. *Online Journal of Bioinformatics* 14 (1): 76-95, ISSN N° 1443-2250.
 15. Izaguirre, M.F. and Casco, V.H. (2016). E-cadherin roles in animal biology: A perspective on thyroid hormone-influence. *Cell Comm. Signalling* 14: 27, 1-16. ISSN N° 1873-9601.

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
col	Colaboradores
ERT	elementos de respuesta a hormonas tiroideas
Dms	Desmosomas
hs	Horas
HT	Hormona tiroidea
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mm	Milímetros
NF	estadio de desarrollo de <i>Xenopus laevis</i> según Niewkoop y Faber (1967)
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
ppm	partes por millón
RT	Retrotranscripción
RT-sqPCR	Retrotranscripción seguida de PCR semicuantitativa (del inglés

semiquantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

st	estadio de desarrollo
T3	3,5,3'-triiodotironina
UAs	uniones adherentes
UEs	uniones estrechas
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
°C	grado centígrado

2. RESUMEN

La morfogénesis de los epitelios polarizados constituyó una adquisición crítica que condujo a la multicelularidad y a la expansión evolutiva de los metazoos. Conforme se incrementó la complejidad de estos organismos, el tejido epitelial se tornó clave en la diferenciación tisular que permitió la formación de los órganos y sistemas de órganos requeridos para su éxito evolutivo. En los animales superiores, la integridad estructural y funcional de dichos tejidos involucra complejos multiproteicos intercelulares que mantienen a las células adyacentes unidas. Los contactos entre estas células polarizadas contienen tres grandes estructuras adhesivas, ubicadas asimétricamente en la región apical de las membranas laterales, las uniones estrechas (UEs), las uniones adherentes (UAs) y los desmosomas (Dms), definiendo el complejo tripartito apical. En los tres tipos de uniones hay moléculas transmembrana que enlazan las células vecinas a través de interacciones adhesivas, así como por proteínas citoplasmáticas de andamiaje, que organizan vías de señalización y que proporcionan una unión mecánica al citoesqueleto celular. Un grupo clave de las moléculas de adhesión célula-célula lo constituye la superfamilia de cadherinas, de las que cadherina E, ha sido implicada como una molécula crítica en el mantenimiento de la integridad tisular y en la modulación de la señalización celular a través de interacciones citoplasmáticas con las cateninas (β -, α - y p120), desencadenando diversos procesos intercelulares que llevan a la diferenciación epitelial. La formación de UAs modula la actividad de las GTPasas pequeñas RhoA, Rac1, Cdc42 y Rap1, las que a la vez, regulan los procesos de adhesión mediados por cadherina E en la biogénesis epitelial.

Por los motivos antes mencionados, resulta fundamental conocer y comprender el rol de las moléculas que conforman y regulan las UAs durante la formación y el mantenimiento de la estructura epitelial.

Con el fin de profundizar los conocimientos sobre la plasticidad adhesiva intercelular mediada por cadherina E, este trabajo de tesis se ha enfocado en el análisis *in vivo* de la regulación de las UAs bajo la influencia de la hormona tiroidea 3,5,3'-triiodotironina (T3), clave en el desarrollo de metazoos y particularmente, en la remodelación del tubo digestivo de anuros. Este sistema de órganos representa un modelo experimental

clave, ya que su remodelación durante la metamorfosis es profundamente dependiente de la unión de la hormona tiroidea (HT) a sus receptores nucleares, los que son factores de transcripción dependientes de T3. Durante estos procesos de remodelación, las células se desplazan coordinadamente, proliferan y establecen nuevos contactos célula-célula. Para seguir este programa, requieren de una red de mecanismos de regulación que permiten el desmontaje y reestablecimiento de los contactos, al tiempo que deben evitar la pérdida del fenotipo epitelial que, cuando ocurre en tejidos adultos, se correlaciona con procesos de progresión tumoral y metástasis.

El objetivo general del presente estudio, consistió en probar la necesidad del reclutamiento de cadherina E en la membrana, inducido por las hormonas tiroideas, así como su implicancia en las cascadas intracelulares mediadas por las GTPasas pequeñas, para el establecimiento de la polarización y diferenciación epitelial del tracto digestivo.

Los estudios se llevaron a cabo utilizando dos especies de anuros, el sapo sudamericano *Rhinella arenarum* y la rana africana *Xenopus laevis*. Dada la escasa información genética del primero, mediante el uso de herramientas bioinformáticas y moleculares (*sqRT-PCR*) se purificó y secuenció un fragmento de β -catenina, el cuál mostró alta identidad en las secuencias nucleotídicas y peptídicas con sus homólogos de otros vertebrados. Luego se aplicó el modelo de inducción a la metamorfosis con T3 en ambas especies, empleando larvas premetamórficas sometidas a T3 por 24hs y 5 días. Con estos experimentos se logró una remodelación drástica de los renacuajos, tanto en su anatomía externa, como la del tubo digestivo, dicho proceso es muy semejante al que ocurre en la metamorfosis espontánea de estos organismos. Durante la inducción se verificaron tanto procesos apoptóticos, como de proliferación celular, engrosamiento de las capas epiteliales, musculares y serosas, aunque no se produjo el desarrollo de la submucosa ni de la capa muscular de la mucosa. A nivel ultraestructural, mediante un análisis morfométrico de los complejos de unión se evaluó su presencia, localización, así como la separación del espacio intermembrana. A las 24 hs de tratamiento con T3 se observó un aumento en el espacio intermembrana de UAs y Dms y la presencia de vesículas asociadas a las membranas, lo que evidencia

su desensamblaje y endocitosis, sin que se observen cambios en las UEs. En los animales tratados por 5 días se visualizó la formación de nuevos complejos de UAs y Dms, con espacios intermembrana de magnitud similar a los encontrados en animales metamorfoseados espontáneamente, conformando los típicos complejos tripartitos apicales (UEs, UAs y Dms), característicos de los epitelios polarizados.

A nivel molecular, los estudios de expresión génica utilizando RT-*sq*PCR, sobre las moléculas estructurales de las UAs en *Xenopus laevis*, mostraron que tanto cadherina E como β - y α -catenina son genes de respuesta temprana a T3, mientras que para p120 no se verificó una respuesta similar. En *Rhinella arenarum*, los resultados fueron concordantes para β -catenina, el único gen que se logró aislar y caracterizar parcialmente. Mediante la utilización de métodos bioinformáticos se realizó una búsqueda sobre las secuencias genómicas de los sitios de unión a los receptores de la hormona T3 (ERT), registrándose ERTs putativos en los tres genes de respuesta temprana. Los niveles de expresión génica se mantienen relativamente estables en los animales tratados durante 5 días, excepto los niveles de β -catenina que continúan incrementándose significativamente. Los perfiles de expresión correspondientes a las cuatro moléculas, fueron similares a los observados en los animales que en los que ocurre la metamorfosis espontánea. En paralelo, se analizaron dos de las moléculas que conforman las UEs (occludina y ZO1), demostrándose que no son genes de respuesta temprana a T3, aunque aumentan significativamente en los tubos digestivos de los animales tratados durante 5 días. Sólo en el gen de occludina se encontraron ERTs putativos.

A continuación y para profundizar los estudios sobre los posibles mecanismos de regulación, se evaluó el efecto del tratamiento hormonal, sobre los niveles de expresión génica de cuatro GTPasas pequeñas (RhoA, Rac1, Rap1 y Cdc42), por cuanto se ha hipotetizado tienen un rol clave en la morfogénesis epitelial. Los resultados de estos estudios mostraron que la inducción con T3 provoca efectos diferenciales, tanto en magnitud, cuanto en el período de tiempo analizado. En estos estudios, sólo Rac1 mostró el comportamiento de un gen de respuesta temprana a T3, exhibiendo su pico de expresión a las 24 hs de tratamiento, además de presentar en su secuencia génica ERTs putativos. En contraste, Rap1 y Cdc42 mostraron incrementos estadísticamente

significativos, pero que no superaron el umbral para ser consideradas de respuesta temprana a la hormona. Finalmente, los niveles de expresión de RhoA se mantuvieron sin cambios. En función de estos resultados, se propone que en esta etapa, los procesos de remodelación epitelial estarían asociados a la regulación de Rac1 en la formación de lamelipodios que facilitan la migración celular y la formación de nuevos contactos intercelulares. A los 5 días, el principal efecto de la hormona habría resultado en el marcado incremento de la expresión génica de Rap1, mientras que los niveles de Rac1 y RhoA disminuyen y Cdc42 se mantiene constante. De acuerdo a estos resultados se propone que la activación de Rap1 llevaría a la translocación de las cadherinas recicladas a los sitios de unión e intervendría en un ciclo de retroalimentación positiva aumentando los niveles de Rac1 y Cdc42 activas, que llevarían al reforzamiento de las UAs y el establecimiento de la polaridad epitelial.

Los hallazgos presentados en esta Tesis Doctoral, permiten comenzar a dilucidar el rol de la hormona T3 en la dinámica de las UAs y la determinación del fenotipo epitelial polarizado en un modelo *in vivo*. Dicha hormona tiene efectos tempranos sobre los componentes de las UAs demostrando un rol esencial de éstas, en la remodelación del tejido, con la intervención de las GTPasas pequeñas como moduladores de su efecto a nivel intracelular.

3. SUMMARY

The morphogenesis of polarized epithelia constitutes a critical acquisition leading both to the multicellularity and expansion of metazoan evolution. As the complexity of these organisms increasing, the epithelial tissue turned key in tissue differentiation, allowing the formation of organs and organ systems, required for their evolutionary success. In higher animals, the structural and functional integrity of these tissues involves intercellular multiprotein complex that keep neighbor cells together. Contacts between these polarized cells contain three major structures located asymmetrically in the adhesive apical region of the lateral membrane, tight junctions (UEs), adherens junctions (UAs) and desmosomes (Dms), defining the apical tripartite complex. In the three junction's types, there are transmembrane molecules that link neighboring cells through adhesive interactions as well as cytoplasmic scaffolding proteins which organize signaling pathways and provide a mechanical attachment to cell cytoskeleton. A key group of cell-cell adhesion molecules constitutes the cadherin superfamily, of which cadherin E, has been implicated in playing a critical role in maintaining tissue integrity and as a modulator of cell signaling through union interactions with their cytoplasmic partners (β -, α -catenin and p120) triggering various intercellular processes leading to epithelial differentiation. The formation of AJs modulates the activity of small-GTPases, RhoA, Rac1, Cdc42 and Rap1, which simultaneously regulate adhesion processes mediated by E-cadherin in epithelial biogenesis.

For the above reasons, it is important to know and understand the role of molecules that form and regulate AJs during the formation and maintenance of the epithelial structure. To deepen the knowledge of the intercellular adhesive plasticity mediated by E-cadherin, this thesis has been focused on the *in vivo* analysis of the AJs regulation under the influence of thyroid hormone (T3), which is key in the metazoans development, particularly in the digestive tract remodeling of Anurans. This organ system represents a key experimental model because its tissue remodeling during metamorphosis, is profoundly dependent on thyroid hormone mediated by nuclear receptors, which are T3 dependent transcription factors. During these remodeling processes, cells crawl coordinately, proliferate and establish new cell-cell contacts. To

follow this program, cells require a network of regulatory mechanisms that allow the removal and reestablishment of contacts, while avoid the loss of epithelial phenotype, which when it occurs in adult tissues, are correlated with processes of tumor progression and metastasis. The overall objective of this study was to test the need of E-cadherin recruitment at the plasma membrane, induced thyroid hormones, and their implication in intracellular cascades mediated by small GTPases for the polarization establishment and epithelial differentiation of the digestive tract.

The studies were done using two Anuran species, the South American toad *Rhinella arenarum* and the African frog *Xenopus laevis*. Given the little genetic information of the first, using bioinformatic and molecular tools (RT-sqPCR) a β -catenin fragment was isolated, purified and sequenced, showing high identity both in the nucleotide and peptide sequences with their counterparts in other vertebrates. The metamorphosis induction model was then applied by using T3 to premetamorphic larvae in both species, for 24 hours and 5 days. With these experiments, a drastic remodeling of tadpoles was achieved, both in their external anatomy, as the digestive tract. This process was very like what occurs in spontaneous metamorphosis of these organisms. These processes were correlated with the verified at histological and subcellular levels in the *Xenopus laevis* gastrointestinal tract. During induction, both apoptotic processes and cell proliferation were verified. In addition, thickening of epithelial, muscle and serous layers was established, although there was not developed the submucosa or muscular layer of the mucosa by the T3 treatment. At the ultrastructural level, at 24 hs, evidences of the disassembly of the AJs and Dms were verified; no changes were observed in the TJs. In animals treated for 5 days it began to visualize the formation of new UAs and DMs complexes, conforming the typical and characteristic apical tripartite complex (TJs, AJs and DMs), of polarized epithelia.

At the molecular level, studies of gene expression using RT-sqPCR, the structural molecules of the AJs in *Xenopus laevis*, showed that both E-cadherin as β - and α -catenin are T3 early response genes, while in *Rhinella arenarum*, the results were concordant for β -catenin, the only gene that was isolated and partially characterized. Gene expression levels remain relatively stable in animals treated for 5 days, except for β -catenin levels, which continued significantly increasing. Gene expression profiles,

corresponding to the four molecules, were like those observed in animals that spontaneously metamorphose. In parallel, were analyzed two molecules that make the TJs, which are proved that are not early response genes to T3 (occludin and ZO1), were significantly increased in the digestive tracts of animals treated for 5 days.

Next, to deepen the studies on possible regulation mechanisms, the effect of hormone treatment on the gene expression levels of four small-GTPases (RhoA, Rac1, Rap1 and Cdc42) that has been hypothesized to have a key role in epithelial morphogenesis, were evaluated. The results of these studies demonstrate that the T3 induction causes differential effects both in magnitude, as in the period analyzed. In these studies, only Rac1 showed the behavior of an T3 early response gene, exhibiting its expression peak at 24 hours of treatment, while Rap1 and Cdc42 showed statistically significant increases, but that did not exceed the threshold to be considered early response genes. Finally, the expression levels of RhoA remains unchanged. Based on these results, it is proposed that, at this stage, epithelial remodeling processes would be associated with the regulation of Rac1 in the formation of lamellipodia that facilitate cell migration and the formation of new intercellular contacts. At days 5, the main effect of the hormone would result in a marked increase of gene expression of Rap1, while RhoA and Rac1 levels decrease and Cdc42 remains constant. According to these results it is proposed that, the Rap1 activation leads to the translocation of cadherins recycled to the binding sites, and intervenes in a positive feedback cycle by increasing levels of active Rac1 and Cdc42, which would lead to the AJs strengthening and the epithelial polarity establishment.

The findings presented in this thesis, let start to elucidate the role of T3 hormone in the dynamics of the AJs and the determination of the polarized epithelial phenotype in an *in vivo* model. This hormone has early effects on components of AJs demonstrating an essential role of these in tissue remodeling, with the participation of small-GTPases as modulators of its effect at intracellular level.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. Rol de la adhesión mediada por cadherina E

La adhesión célula–célula, además de cumplir su rol adhesivo, determina la polaridad celular y participa en la diferenciación celular y en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis tisular, tanto durante el desarrollo, como en la vida adulta de los organismos pluricelulares, fundamentalmente metazoos.

En diferentes contextos fisiológicos del desarrollo y la vida adulta, esta adhesión es sumamente plástica, remodelándose gracias a numerosas y complejas cascadas de señalización finamente coordinadas en tiempo y espacio, así como durante diversos estados patológicos, tales como la oncogénesis. La configuración de esta adhesión es alterada por cambios genéticos y epigenéticos, que resultan en cambios en las rutas de señalización, pérdida de la inhibición por contacto, migración celular e interacciones estromales alteradas.

Un grupo clave de estas moléculas de adhesión célula–célula lo constituye la superfamilia de cadherinas, cuyo miembro prototípico, cadherina E, fue hallado por primera vez en tejidos epiteliales (Shirayoshi y col., 1986; Yoshida y Takeichi, 1982) y ha sido caracterizado como un potente supresor de invasión y metástasis en estudios que datan de 1990 (revisados por Roy y Berx, 2008).

Al menos tres hechos trascendentes ubican a cadherina E en el foco del presente estudio. El primero es que los epitelios están constituidos por fenotipos celulares que exhiben la máxima polaridad y cuya identidad es prioritariamente otorgada por cadherina E. El segundo hecho se debe a que esta molécula está implicada en los numerosos procesos de selección de fenotipos celulares, migración y movimientos morfogenéticos acontecidos durante el desarrollo de metazoos (Takeichi y col., 2000; Tanos y Rodriguez-Boulan, 2008; Cai y col., 2014; Tucker y Adams, 2014). Finalmente, el tercer motivo, es que debido a la gran extensión que tienen los epitelios en el cuerpo humano y a que se ubican en directo contacto con agentes mutagénicos y/o carcinogénicos, los cánceres epiteliales se desarrollan con mayor frecuencia en la población mundial, abarcando el 85-90% de todos los tipos de cáncer.

Gracias a la importancia que reviste conocer los mecanismos fisiológicos que controlan la homeostasis tisular, se han realizado una plétora de estudios desde la década del 80', cuando estas moléculas se ubicaron en el escenario científico. Sin embargo, avanzar en el conocimiento de la regulación intercelular mediada por cadherina E en modelos pluricelulares *in vivo*, ha planteado numerosos problemas y desafíos. Con el fin de contribuir con un conocimiento más veráz sobre la plasticidad adhesiva intercelular mediada por cadherina E, desde hace varios años, nuestro grupo de trabajo enfoca este análisis *in vivo*, en la regulación de un tipo particular de complejo adhesivo mediado por cadherina E denominado unión adherente, bajo la influencia de las hormonas tiroideas durante el desarrollo de vertebrados. Estas hormonas, entre otras funciones, son determinantes de la proliferación y diferenciación celular y por ello, resultan claves para el desarrollo de los metazoos.

Para lograr profundizar el conocimiento sobre la plasticidad de las uniones adherentes, estudiar la remodelación del tubo digestivo de anuros, representa un modelo experimental singular, por cuanto la remodelación tisular y de órganos que se realiza durante su metamorfosis es profundamente dependiente de la hormona tiroidea (Shi, 2000). A su vez, tanto el estómago como el intestino, representan dos órganos de importancia fundamental no sólo por sus roles fisiológicos sino también por su elevada propensión a sufrir tumorización.

4.2. Metamorfosis de anuros regulada por T3

Los anfibios, en función de las ventajas que presentan como organismos experimentales, han sido históricamente utilizados en distintos campos de investigación biológica. Entre estas ventajas se pueden destacar, el excelente conocimiento de su fisiología, su gran diversidad taxonómica, su tolerancia a las grandes variaciones ambientales, su fácil mantenimiento en cautividad y la posibilidad de extrapolar los datos obtenidos a otros vertebrados, incluyendo humanos. Estos atributos han posicionado a los anfibios como un tercio de los modelos animales y han sido utilizados por varios investigadores galardonados con el Premio Nobel (Pérez y col., 2009).

En esta clase de vertebrados, el desarrollo ontogenético puede dividirse en tres etapas: embrionaria, larval y adulta (Figura 1). El proceso por el cual las larvas se transforman en animales juveniles, se denomina metamorfosis. Este proceso se da en el período postembrionario, donde se produce una extensa y coordinada remodelación anatómica y funcional. El carácter multifacético de la metamorfosis ha convertido a este proceso en un modelo de investigación importante para numerosos problemas biológicos de vertebrados que incluyen el control endocrino del desarrollo

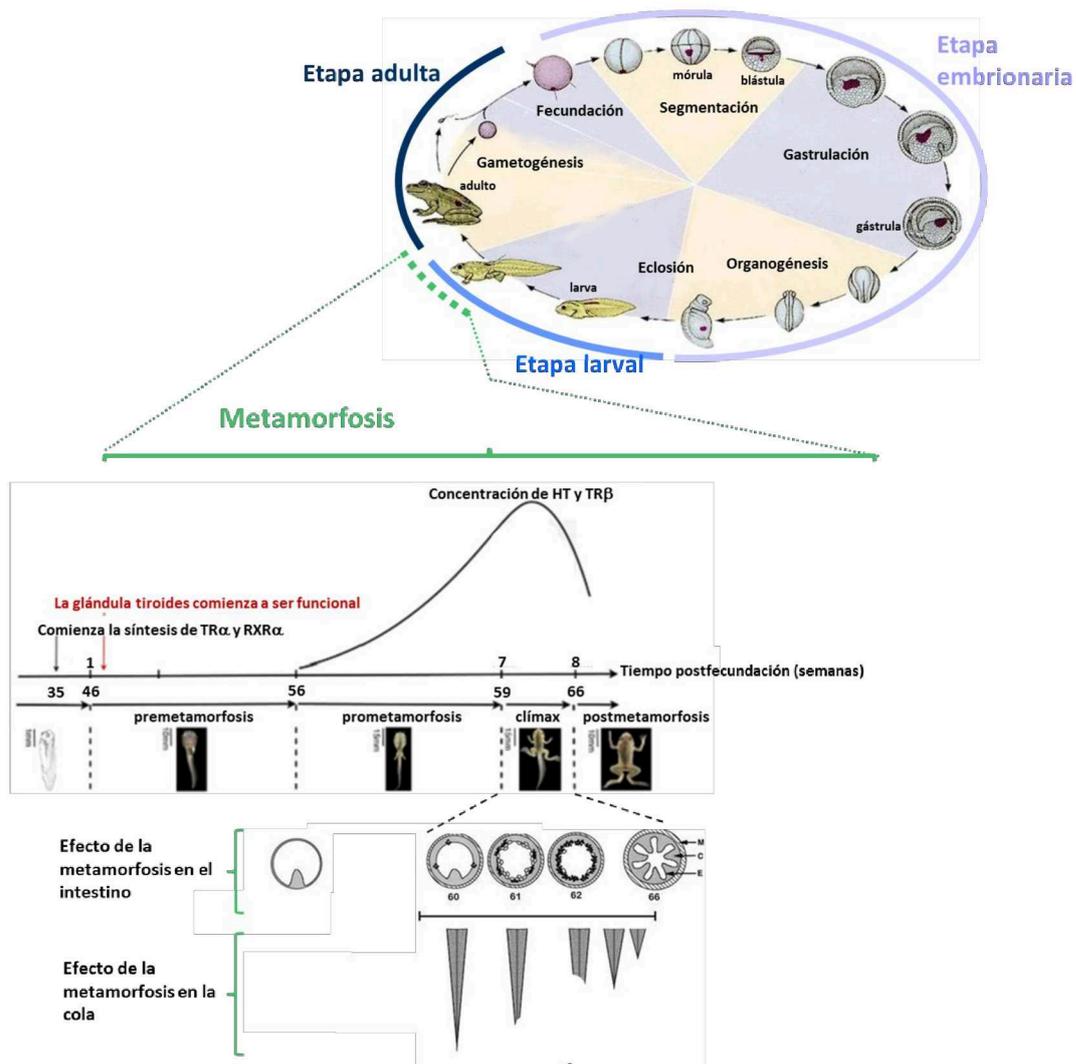


Figura 1. Ciclo de vida de anfibios anuros. Representación esquemática de eventos claves del desarrollo de anuros. En el panel inferior se detallan los eventos durante la metamorfosis. En el eje x se representan el tiempo postfecundación y debajo los estadios de desarrollo alcanzados (NF). Durante el clímax metamórfico se producen cambios drásticos como la remodelación del tejido intestinal y la reabsorción de la cola.

(Buchholz y Hayes, 2005; Buchholz y col., 2006; Denver y col., 2002), la coordinación espacio-temporal de los programas de expresión génica y los cambios morfológicos e histológicos subyacentes (Kanamori y Brown, 1992; Wong y Shi, 1995; Furlow y col.,

1997; Ishizuya-Oka y Shi, 2007), la influencia del entorno sobre los parámetros de vida (Beachy, 1997; Ryan y Semlitsch, 2003), el control genético de la metamorfosis (Voss y Smith, 2005), entre otros. Adicionalmente, la metamorfosis de los anfibios ha recibido considerable atención como un sistema de importancia en el estudio de alteraciones endocrinas (Turque y col., 2005; Zhang y col., 2006; Helbing y col., 2007a, 2007b; Fort y col., 2007).

De los anfibios, el orden de los anuros presenta la metamorfosis con cambios más drásticos, en la que los individuos sufren una extensa y rápida remodelación que resulta en una transformación de una larva acuática, en un juvenil terrestre o semiterrestre (Wilder, 1925; Taylor y Kollros, 1946; Nieuwkoop y Faber, 1967; Rosenkilde y Ussing, 1996; Shi, 2000). El control y la coordinación de estos eventos tienen una base neuroendocrina compleja, influida por factores ambientales (Wilbur y Collins, 1973; Werner, 1986; Wilbur, 1980; Relyea, 2007) y genéticos (Humphrey, 1967; Tompkins, 1978; Voss y Shaffer, 1996; Voss y Smith, 2005), que en la actualidad se conocen sólo parcialmente.

En 1912, Gudernatsch (op. cit. Brown y Cai, 2007) demostró que renacuajos alimentados con extractos de la glándula tiroidea de mamíferos, sufren una rápida transformación de renacuajo a juvenil. Desde entonces, se ha demostrado de manera concluyente que la metamorfosis de los anfibios es controlada por la HT (Allen, 1925; Rosenkilde y Ussing, 1996; Shi, 2000; Denver y col., 2002). Así, el desarrollo larval en anfibios está regido por la concentración plasmática de la HT y típicamente se subdivide en tres etapas (Etkin, 1968) (**Figura 1**). La primera es la premetamorfosis (NF46-NF54 en *X. laevis*), que es un período de crecimiento rápido en el que los niveles séricos de HT son bajos o indetectables. El segundo es la prometamorfosis, durante la cual los niveles de la HT comienzan a incrementarse lentamente. El tercero es el clímax metamórfico, período en el que los niveles de la HT aumentan dramáticamente, verificándose pronunciados cambios moleculares y morfológicos. La acción de la HT es mediada principalmente por sus receptores nucleares, cuyos mecanismos moleculares se detallan en la sección 4.2.1.

La metamorfosis de los anfibios proporciona un maravilloso conjunto de preguntas biológicas. ¿Cómo puede una única hormona controlar programas del desarrollo tan

diversos? El mismo tipo de célula tiene un destino diferente, dependiendo de su ubicación. Por ejemplo, la musculatura de la cola es inducida por la HT a sufrir apoptosis, mientras que el músculo de las extremidades es inducido por la misma hormona para crecer y diferenciarse. Los órganos responden de manera autónoma a la HT. Por ejemplo, en cultivo, las colas amputadas pueden ser inducidas a resorberse por la HT (Weber, 1962). Los tipos de células individuales que comprenden un órgano pueden ser blanco directo de la hormona con programas independientes (Yaoita y Nakajima, 1997).

La metamorfosis de anfibios en general y la de *Xenopus laevis* en particular, es un sistema modelo para estudiar la organogénesis de los vertebrados. Por ejemplo, el intestino de las larvas de *X. laevis* es un tubo largo y simple con un estómago rudimentario y un intestino grueso. En 5 días, durante el clímax metamórfico, se acorta el 75% de longitud y se forma un estómago con nuevas glándulas secretoras (Ishizuya-Oka y Shi, 2005). El intestino delgado desarrolla las conocidas vellosidades y criptas, características de vertebrados adultos típicos. En contraste, el pronefros es una estructura de las larvas que regresa y desaparece al final de la metamorfosis (Fox, 1970). La remodelación de los órganos y sistemas funcionales preexistentes de las larvas incluye la piel (Yoshizato, 1996), los órganos respiratorios (Dodd y Dodd, 1976), el hígado (Atkinson y col., 1998), el sistema inmune (Rollins-Smith, 1998), el cerebro (Kollros, 1981), los ojos (Hoskins, 1986; Mann y Holt, 2001), las narinas (Higgs y Burd, 2001) y la hipófisis (Buckbinder y Brown, 1993; Kikuyama y col., 1993; Huang y col., 2001). Estos eventos de remodelación invariablemente resultan en un órgano vertebrado típico, siendo la HT clave en el programa del desarrollo. Adicionalmente, la HT controla la formación de nuevos órganos y tipos de células después de la metamorfosis que, o bien no existían, o carecían de función en la larva. Estos incluyen los miembros, la médula ósea, la piel y las glándulas del estómago. No todos los órganos de *X. laevis* requieren de la HT para desarrollarse. Una manera de observar estos cambios independientes de HT es el aumento del tamaño de las larvas tratadas con metimazol, un inhibidor que bloquea la síntesis de HT en la glándula tiroidea. Estas larvas crecen alcanzando un tamaño muy grande y pueden vivir hasta 2 años. Si bien normalmente, las gónadas con células sexuales visibles aparecen varios meses después

de la metamorfosis, con el tiempo, estos renacuajos detenidos forman ovocitos primarios y espermatogonias (Dodd y Dodd, 1976, Rot-Nikcevic y Wassersug, 2003). La remodelación del esqueleto de las larvas, especialmente el cráneo, requiere HT. Sin embargo, los renacuajos detenidos no remodelan su esqueleto, aunque se produce la osificación del cráneo y la columna vertebral (Brown, 2007). La HT actúa potenciando la respuesta del hígado al estrógeno y sintetiza vitelogenina (Kawahara y col., 1989; Rabelo y col., 1994). El andrógeno regula la vocalización masculina, pero sólo después de una etapa dependiente de HT (Robertson y Kelley, 1996). Subyacente a muchos de estos cambios, se da la pérdida masiva de agua. Un renacuajo pierde más de la mitad de su peso húmedo en el período de una semana desde NF59 (Nieuwkoop y Faber, 1956) hasta la finalización de la metamorfosis.

El origen y la pérdida en la evolución, de una etapa intermedia de desarrollo dependiente de HT en el ciclo de vida de los vertebrados, son problemas de un interés extraordinario. Muchas variedades de peces experimentan una transición de larvas a juveniles controlada por la HT, que atestigua los orígenes antiguos de la metamorfosis. Así como diferentes especies de insectos exhiben variaciones en su ciclo de vida que van desde el desarrollo directo, a la metamorfosis completa, hay estrategias de anfibios que van desde ranas de desarrollo directo (Callery y col., 2001) y salamandras completamente pedomórficas (animales que son totalmente resistentes a HT) (Wakahara, 1996) a los anuros que sufren metamorfosis completa como *Rana*, *Bufo* y *Xenopus*. La HT es necesaria para completar el ciclo de vida de muchos vertebrados superiores desde las aves a mamíferos, incluyendo a humanos, aunque esta intervención se produce después de la eclosión o el nacimiento. En los seres humanos, la deficiencia de la HT después del nacimiento resulta en el desarrollo del cretinismo, caracterizado por retraso mental, falta de estatura y muchas otras anomalías. Aunque la HT desempeña un papel crucial en la maduración del cerebro de los mamíferos recién nacidos, sólo se han identificado algunos genes blanco candidatos (Thompson y Bottcher, 1997; Bernal, 2005). La HT induce mayores cambios en la expresión génica de las larvas que en los sistemas de mamíferos, a juzgar por los experimentos con microarreglos (Yen y col., 2003; Das y col., 2006). Los receptores tiroideos (RTs) y sus *partners* receptores del ácido retinoico (RXR) se conservan desde los peces y anfibios

a los humanos (Bertrand y col., 2004). El mismo sitio de unión al ADN para el heterodímero RT-RXR se ha identificado en varios vertebrados. Muchos de los coactivadores y correpresores de receptores nucleares descubiertos en mamíferos, también se detectan en anfibios y están implicados en la metamorfosis inducida por la HT (Furlow y Neff, 2006). Sin embargo, hasta la fecha, el único camino fisiológico que se sabe está regulado por la HT en mamíferos y anfibios, es el lazo de retroalimentación negativa entre la glándula tiroides y la pituitaria anterior, en la que la tirotropina hipofisaria u hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH), estimula la glándula tiroides para sintetizar la HT y su exceso regula la producción de TSH (Dodd y Dodd, 1976, Huang y col., 2001).

Debido a que todos los vertebrados utilizan un reparto similar de factores endocrinos y a que los mecanismos de señalización molecular están altamente conservados evolutivamente, la naturaleza dramática de la metamorfosis de los anfibios constituye un modelo útil para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la señalización por la HT en vertebrados (Paul y col., 2007; Matsuda y col., 2009). Ciertamente, este proceso exhibe grandes similitudes con el desarrollo perinatal (postembrionario) de los mamíferos, tanto a nivel molecular como morfológico (Tata y col., 1993; Shi, 2000; Laudet, 2011), permitiendo extrapolar a esta clase de vertebrados los resultados obtenidos.

Los dos anfibios más populares utilizados para estudiar la metamorfosis han sido *X. laevis* y la rana gigante *Rana catesbeiana*. Durante la mayor parte del siglo XX la rana toro fue favorecida por los estudios bioquímicos debido a la disponibilidad y el gran tamaño de los renacuajos maduros. Las ranas gigantes permanecen como renacuajos durante 3 años y luego requieren años adicionales para alcanzar la madurez sexual. *X. laevis* ha reemplazado a la rana toro porque es fácil de criar en el laboratorio y tiene un ciclo de vida más corto. La embriogénesis dura 1 semana. La etapa larval (de NF46 a 59) es el período más variable del ciclo de vida, oscilando de 6 o más semanas, dependiendo de las condiciones de cría. El clímax metamórfico (NF59 a 66) es reproducible y dura 8 ± 1 días (Figura 1). Los machos y las hembras son fértiles a los seis y doce meses respectivamente.

4.2.1. Mecanismo de acción de la hormona T3

La HT controla diversos procesos celulares por unión a sus receptores y disparando funciones sinérgicas o antagónicas, lo cual explica su rol pleiotrópico (Kress y col., 2009). La glándula tiroides que se encuentra presente en todos los grupos de vertebrados, es responsable de la síntesis de hormonas iodadas, conocidas como HTs (Paris y Laudet, 2008; Carr y Patiño, 2011). Las células foliculares son las responsables de la síntesis y secreción tanto de 3,5,3'-triiodotironina (T3) como 3,5,3'5'-tetraiodotironina L-tiroxina (T4), siendo esta última la más abundante a nivel plasmático. La T4 es una prohormona relativamente inactiva que se convierte en la forma más activa T3 en los tejidos diana por la actividad de deiodinasas (Denver y col., 2002; Brown, 2005). Tres selenoenzimas iodo-tironina deiodinasas (D1, D2 y D3) regulan su activación y catabolismo. D1 y D2 catalizan la deiodinación 5' de T4 a T3 en la circulación o en las células diana respectivamente. En contraste, D3 cataliza la deiodinación irreversible de T4 y T3 a las formas inactivas de T3 reversa 3,3'5'-triiodotironina (rT3) y 3,3'-diiodotironina (T2) respectivamente, protegiendo a las células blanco del exceso de HT. La T3 activa actúa interaccionando con los receptores de las hormonas tiroideas (RTs), los cuales son factores de transcripción nucleares que funcionan activando o reprimiendo la expresión de genes dependientes de la HT (Buchholz y col., 2006).

En anfibios, al igual que en peces, aves y mamíferos, existen dos tipos de RTs, α - y β - (Yaoita y Brown, 1990; Wang y col., 2008), cuyas secuencias están evolutivamente muy conservadas. Los RTs de *Xenopus*, como la mayoría de los receptores nucleares, se organizan (desde el extremo amino al extremo carboxilo) en cuatro dominios que indican funciones diferentes, A/B, C, D y E (Figura 2), aunque las funciones de cada dominio pueden superponerse. El dominio A/B generalmente participa en la activación de la transcripción. El dominio C es uno de los dominios característico de todos los receptores nucleares. Esta región altamente conservada está implicada en la unión al ADN y por lo tanto, en el reconocimiento específico de los elementos de respuesta a la HT (ERTs), presentes en estos genes. La secuencia consenso de los ERTs consta de dos repeticiones de la secuencia hexamérica AGGTCA, separadas por una zona espaciadora. La especificidad hormonal está determinada por el número de nucleótidos del espaciador, así como por su dirección. El dominio D es una región

bisagra que influencia a los dominios que lo flanquean (C y E) y está involucrado en el proceso de importación nuclear. El dominio E es una región compleja que controla tanto la unión del ligando, como la dimerización del receptor y la activación transcripcional en presencia del ligando o la represión en su ausencia. Los RTs se unen al ADN como monómero, homodímero o heterodímero. El segundo receptor de los heterodímeros de mayor frecuencia es el receptor del ácido retinoico X (RRX), un receptor nuclear al que se une el ácido 9-*cis* retinoico. La unión del ligando al RRX no es necesaria para la heterodimerización con RT o la respuesta a la HT. Sin embargo, RRX es fundamental para la función de los RTs en anfibios, ya que sin éste, el RT exhibe un efecto débil sobre la transcripción de genes de respuesta a la HT *in vivo* (Puzianowska-Kuznicka y col., 1997). La acción de la HT parece estar conservada en anfibios y exhibe un importante grado de versatilidad ya que, si bien la transcripción de la mayoría de sus genes blanco es positiva, sobre algunos ejerce un efecto inhibitorio. Los RTs son codificados por los genes RT α y RT β , que generan múltiples isoformas mediante el uso de distintos promotores y procesos de corte y empalme

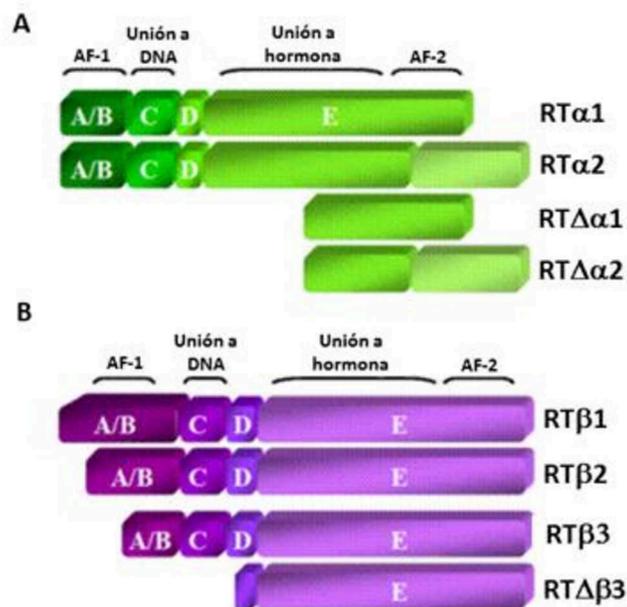


Figura 2. Representación esquemática de las diversas isoformas codificadas por los genes RT α (A) y RT β (B). Las isoformas son generadas por corte y empalme alternativo o el uso de diferentes promotores. Las imágenes muestran los diferentes dominios implicados en la función del RT. Estos incluyen dominios de unión a la hormona “E” y de unión a ADN “C”, presentes específicamente en RT α 1 y en RT β 1, 2 y 3, los cuales son auténticos receptores nucleares de T3. Las isoformas RT α 2 y las RT $\Delta\alpha/\beta$ carecen de uno o ambos dominios. Otras regiones funcionales de los RTs incluyen dominios de unión de cofactores (situados en A/B, D y E), así como los dominios de dimerización (situados en C y E). Los dominios AF-1 y AF-2 son importantes para la activación transcripcional. Adaptado de Sirakov y Plateroti, 2011.

alternativo (Figura 2). El locus de $RT\alpha$ codifica al menos cuatro proteínas diferentes, pero sólo el $RT\alpha 1$ es un receptor nuclear (Koenig y col., 1989; Chassande y col., 1997; Plateroti y col., 2001). El locus de $RT\beta$ codifica dos receptores, $RT\beta 1$ y $RT\beta 2$ (Flamant y Samarut, 2003).

Los RTs, dependientes de la HT, tienen una acción dual activando o reprimiendo procesos de transcripción. En función de la importancia del rol de los RTs en el desarrollo de anuros, estos organismos proporcionan un excelente sistema para examinar su doble función *in vivo*.

Mientras que los receptores comienzan a detectarse tempranamente en los estadios larvales, la hormona comienza a incrementar sus niveles recién al comienzo de la metamorfosis. Tomando en consideración el modelo dual, las funciones de los RTs son distintas en ambas fases (Sachs y Shi, 2000; Sachs y col., 2000). Durante el período larval, el RT sin su ligando reprime los genes de respuesta a HT (Figura 3), mientras que durante el período metamórfico (en presencia de la hormona) el RT ligado a HT activa los genes blanco (Sachs y Shi, 2000; Sachs y col., 2000). Por ello, algunos genes que son inducidos por HT, y que son esenciales para la organogénesis embrionaria, exhiben niveles basales de expresión durante este período (Figura 3). Al alcanzar la etapa larval premetamórfica, los RTs comienzan a sintetizarse (fundamentalmente el $RT\alpha$) y actúan reprimiendo los genes de respuesta a HT (Figura 3). Debido a que muchos de estos genes participan en la metamorfosis, su represión por los RTs carentes de ligando, contribuye a la prevención de la metamorfosis prematura, garantizando un período de crecimiento larval adecuado. Al inicio de la metamorfosis, la estimulación de la glándula tiroides conduce a un aumento de la síntesis y secreción de HT circulante (Figura 3).

Conforme las concentraciones intracelulares de HT aumentan, la unión de T3 al $RT\alpha$ frecuentemente provoca la conmutación de la función represora, por la activadora, induciendo la expresión de genes de respuesta a HT, promoviendo el inicio de la metamorfosis. El mismo $RT\beta$, es un gen de respuesta directa a T3 (Kanamori y Brown, 1990) el cual tiene un rol importante durante los procesos finales de la metamorfosis cuando el nivel de la HT es máximo. El $RT\alpha$ media los eventos tempranos de la metamorfosis que involucran principalmente programas de crecimiento; mientras el

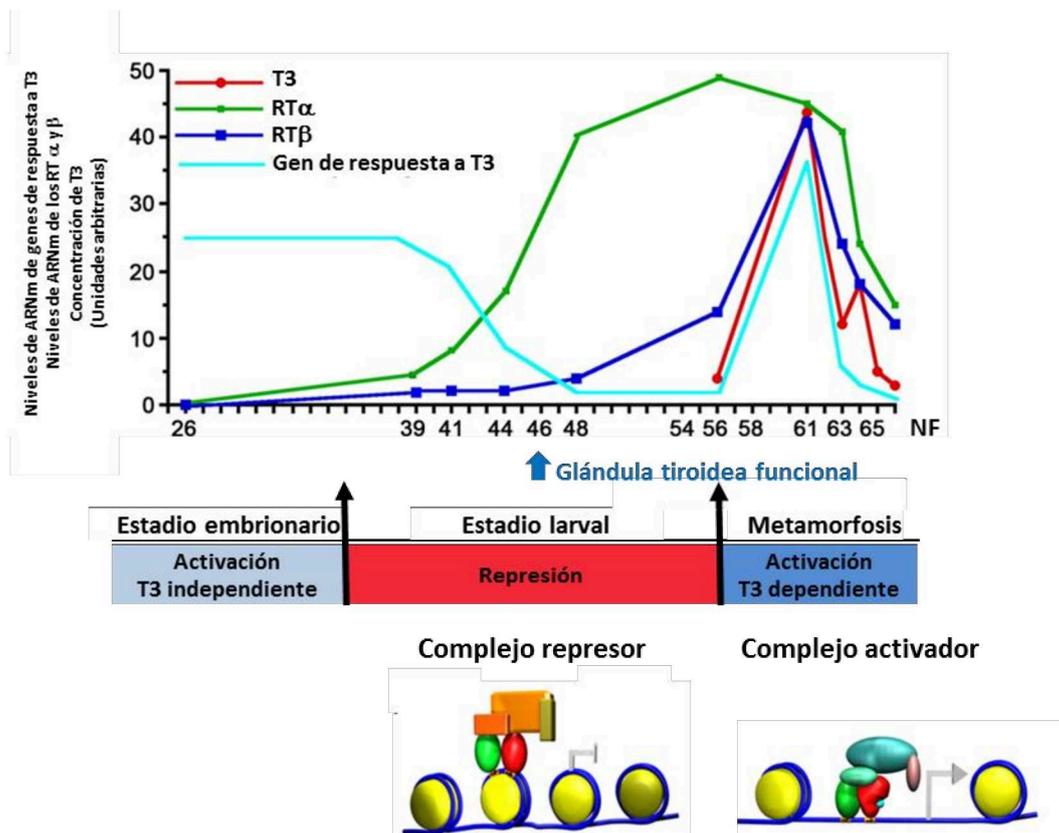


Figura 3. Modelo dual de la función de los RTs durante el desarrollo de anfibios. Durante las etapas embrionarias del desarrollo de *Xenopus laevis*, la concentración de T3 y los niveles tanto de RT α como β son bajos (líneas roja, verde y azul) y los genes sensibles a T3 se expresan de una manera independiente a la hormona (línea celeste). Después de la eclosión, la expresión de RT α aumenta progresivamente, junto con la maduración de la glándula tiroides, aunque en estas primeras etapas, la concentración de T3 sigue siendo baja. Esto lleva al heterodímero RT/RRX (rojo/verde) a los ERTs (sitios amarillo con flechas sobre el ADN) para reclutar el complejo correpresor. De esa manera reprimen la expresión de genes dependientes de T3, evitando así la metamorfosis prematura (panel inferior izquierdo). Durante la metamorfosis, las altas concentraciones de T3 se asocian con una fuerte expresión de RT β . La presencia de ambos resulta en la liberación del complejo correpresor (naranja/amarillo) y el reclutamiento del complejo coactivador (celeste/rosa) a los ERTs, promoviendo así la expresión de genes de respuesta a T3 (panel inferior derecho). ADN: línea azul alrededor del octámero histónico (amarillo). Adaptado de Grimaldi y col., 2012.

RT β es inducido cuando la concentración de HT es lo suficientemente alta, contribuyendo a cambios tardíos que involucran muerte y remodelación celular.

4.2.2. Remodelación del tubo digestivo durante la metamorfosis

La función de la HT y los RTs sobre los procesos de proliferación o diferenciación celular no tiene efectos homogéneos. De hecho, la respuesta a la HT depende en gran medida del tipo celular, su estado de diferenciación (progenitoras o diferenciadas), su estado fisiopatológico (células normales o tumorales) y el contexto tisular. El equilibrio entre los procesos de proliferación y diferenciación celular es de fundamental importancia para el control de la homeostasis de los tejidos. Dado que en este trabajo de tesis se seleccionó el tubo digestivo para evaluar el efecto de T3 sobre las UAs

durante su morfogénesis, a continuación se describirán los principales eventos de la remodelación que sufre este órgano durante la metamorfosis.

En las etapas premetamórficas, el tracto gastrointestinal de los anfibios es una estructura extensa y espiralada (Nieuwkoop y Faber, 1967; Chalmers y Slack, 1998). Conforme avanza la metamorfosis se producen cambios drásticos (**Figura 4**), que incluyen una gran disminución en su longitud, la pérdida de espiralización (Horiuchi, 1980) y concomitantemente, cambios histológicos, estructurales y funcionales que llevan a la conformación del tracto gastrointestinal adulto. Por su extensa remodelación, el intestino ha concentrado gran atención en su estudio (Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1987; Shi y Brown, 1993; Shi y Ishizuya-Oka, 1996; Amano, 1998; Smith y col., 2000; Schreiber y col., 2005; Buchholz y col., 2007; Ishizuya-Oka y Hasebe, 2008). Por el contrario, el proceso de metamorfosis en el estómago ha sido menos investigado debido a su complejidad anatómica (Nieuwkoop y Faber, 1967; Forte y col., 1969; Forte y Forte, 1970; Fox y col., 1972; Hausen y Riebesell, 1991).

Los estudios histológicos muestran que el estómago larval se compone principalmente de tejido epitelial (con células mucosas superficiales y células glandulares), tejido conectivo y una delgada capa de células musculares. Durante la metamorfosis, se observa que el epitelio larval sufre muerte celular por apoptosis y es reemplazado por epitelio de tipo adulto, presumiblemente originado a partir de precursores de células epiteliales adultas (Ishizuya-Oka y col., 1998, 2003). El epitelio adulto está formado por células mucosas superficiales, mucosas del cuello y oxinticopépticas, configurando las glándulas gástricas del estómago adulto. El seguimiento de la transición del epitelio larval a uno adulto funcional ha sido determinada usando genes marcadores, los cuales indicarían la determinación de un estómago adulto funcional después del clímax (Ikuzawa y col., 2003, 2004, 2007). Sin embargo, los mecanismos moleculares intervinientes en la metamorfosis dependiente de T3 sólo han sido extensamente estudiados en el intestino.

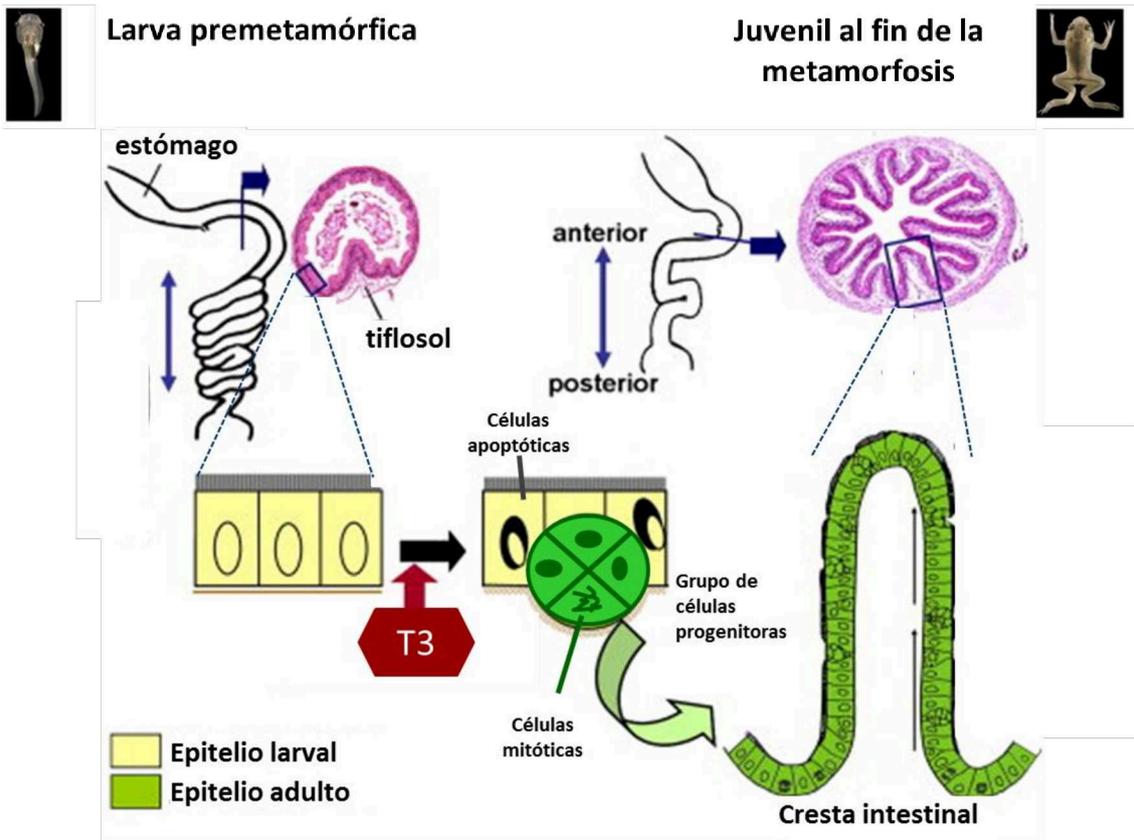


Figura 4. Remodelación del tubo digestivo durante la metamorfosis de *Xenopus laevis*. El extenso intestino larval posee un único pliegue (tiflosol). Su mucosa está conformada por un epitelio simple y finas capas de tejido conectivo y muscular larvales. Durante la metamorfosis el intestino se acorta significativamente y sufre una remodelación compleja. Parte del epitelio larval comienza a sufrir apoptosis y aproximadamente en el NF60 se distinguen los primordios del epitelio adulto, con células indiferenciadas y mitóticas. Se activa la proliferación y comienza a invaginarse el tejido conectivo. Adaptado de Ishizuya-Oka, 2007.

El intestino larval de *Xenopus* es una estructura tubular sencilla (**Figura 4**), compuesta por una monocapa de células epiteliales larvales con delgadas capas de tejido conjuntivo y muscular, excepto en la zona que presenta un único pliegue, el tiflosol, donde el tejido conectivo es abundante (McAvoy y Dixon, 1977; Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1987; Shi y Ishizuya-Oka, 1996). Durante la metamorfosis intestinal, las células epiteliales larvales también sufren apoptosis inducida por T3 y formación del epitelio adulto, pero el origen de éste es aún motivo de controversias (Ishizuya-Oka y Shi, 2005; Schreiber y col., 2005; Ishizuya-Oka y col., 2009).

Con el objetivo de comenzar a desentrañar los mecanismos moleculares que rigen los cambios morfológicos inducidos por T3, numerosos grupos han dedicado sus esfuerzos en la identificación de los genes regulados por esta hormona durante la morfogénesis del intestino de anfibios. Los primeros en ser identificados se estudiaron por técnicas

de hibridación sustractiva (Kanamori y Brown, 1992; Shi y Brown, 1993; Amano, 1998) y posteriormente con el advenimiento de técnicas de búsqueda masiva, como los microarreglos, se encontraron cerca de 2.000 genes diferencialmente regulados por T3. Estos genes muestran cambios de expresión de 1,5 o más veces respecto al grupo control durante la remodelación intestinal metamórfica. Las categorías funcionales ontológicas asociadas fueron proteólisis, ciclo celular, desarrollo, transcripción, transporte de electrones y metabolismo (Buchholz y col., 2007; Heimeier y col., 2010).

Existen evidencias que en la remodelación de los tejidos epiteliales durante la metamorfosis, las UAs tienen un rol crítico. En concordancia con esta hipótesis nuestro grupo ha realizado ensayos de bloqueo de cadherina E durante el desarrollo de *Rhinella arenarum* cuyos resultados permiten sugerir que esta molécula tiene un rol importante en la morfogénesis de derivados neuroectodérmicos y endodérmicos, siendo estos últimos los precursores del tracto digestivo de metazoos (Izaguirre y col., 2001; Izaguirre y Casco, 2010, 2011).

Si bien aún quedan muchos aspectos del proceso por dilucidar, en este trabajo se aportan nuevos fundamentos sobre la regulación de la morfogénesis del tubo digestivo durante la metamorfosis dependiente de T3; principalmente, en relación con la incógnita sobre la existencia de controles transcripcionales de las principales moléculas que participan en las UAs.

4.3. Uniones celulares

Los organismos multicelulares están compuestos por distintos fenotipos celulares, que durante el desarrollo se organizan adoptando diferentes patrones de organización para formar tejidos y órganos. En particular los epitelios, soportan la estructura de los órganos y sirven como una barrera efectiva contra los patógenos, además de separar ambientes químicos y fisiológicos diferentes. Estas funciones vitales requieren la estrecha asociación entre las células, a través de un conjunto de uniones que estabilizan mecánicamente el tejido. Así, la adhesión celular puede considerarse como uno de los procesos más importantes implicados en la regulación del establecimiento y mantenimiento de estas estructuras tisulares. A nivel evolutivo y fundamentalmente en relación con los epitelios, la aparición de los mecanismos de adhesión célula-célula pueden considerarse una adquisición clave para los metazoos, ya que habrían

permitido la integración de señales y adicionalmente, creado barreras de protección con el medio ambiente, segregando diferentes poblaciones celulares y dando origen a tejidos especializados y órganos. En este contexto, las uniones celulares pueden darse tanto entre células vecinas, como con la matriz extracelular circundante, siendo las primeras el objeto de estudio de esta tesis.

Las uniones se pueden clasificar de acuerdo a su función en tres grupos: las *uniones oclusivas*, las cuales sellan las células epiteliales vecinas de tal manera que evitan el libre tránsito de moléculas pequeñas de una capa a otra; las *uniones adherentes* o de *anclaje*, que ejercen funciones de sujeción mecánica de las células y sus citoesqueletos, con las células vecinas y la matriz extracelular y las *uniones comunicantes* o *en hendidura*, que permiten el intercambio de señales químicas y eléctricas entre células adyacentes. Estos tipos de unión son especialmente abundantes en los tejidos epiteliales.

Los tejidos epiteliales se caracterizan por la fuerte asociación de las células individuales que lo componen. Éstas se organizan formando uno o varios estratos que descansan sobre una capa de matriz extracelular denominada lámina basal. Los epitelios cumplen funciones de protección contra agresiones mecánicas, químicas y biológicas y desempeñan un papel importante en el transporte selectivo de agua y solutos (Guyton y Hall, 2006). Algunos tejidos epiteliales como la epidermis y el epitelio de la córnea limitan con el medio externo, mientras que otros tapizan los órganos huecos, como el tubo digestivo y el aparato respiratorio, que limitan con el medio interno (Guyton y Hall, 2006). El tejido epitelial de vertebrados presente en una serie de glándulas y órganos cavitarios, presenta entre células adyacentes un complejo de unión tripartito característico, aunque puede diferir en su disposición de un órgano a otro (Farquhar y Palade, 1963). Ultraestructuralmente se reconocen las uniones estrechas (del tipo ocluyente), las uniones adherentes y los desmosomas (ambas de anclaje) en este complejo. Dichos elementos, que ocupan una posición juxtaluminal en dirección apico-basal (**Figura 5A**) están formados por receptores transmembrana (generalmente glicoproteínas), que interaccionan con el citoesqueleto de la célula mediante su asociación a proteínas citoplasmáticas.

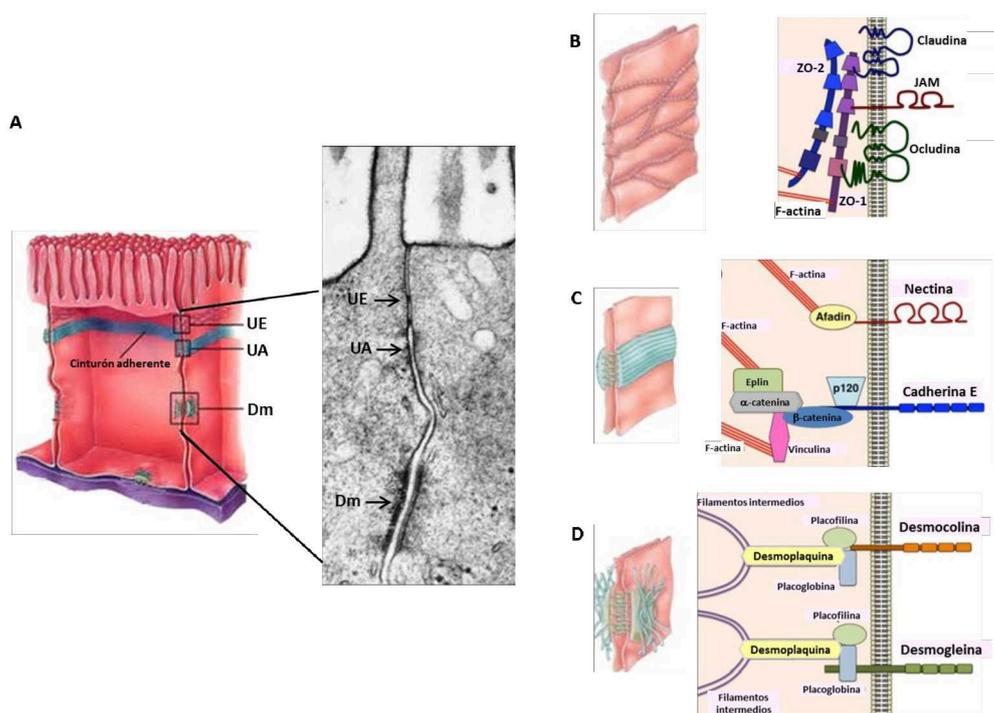


Figura 5. Complejos de unión entre células epiteliales. (A) A la izquierda diagrama de la zona de unión entre células epiteliales, donde se muestra el complejo tripartito y a la derecha, micrografía electrónica en la que se distinguen los 3 tipos de unión distribuidas apico-basalmente, uniones estrechas (UEs), adherentes (UAs) y desmosomas (Dms). (B-D) Estructuras moleculares de cada complejo de unión, las uniones estrechas (B) uniones adherentes (C) y desmosomas (D). Adaptado de Kawauchi, 2012 y Totoro y Derricks, 2014.

Las *uniones estrechas* (UEs), actúan como barreras de permeabilidad de los epitelios y se le atribuyen dos funciones principales. En primer lugar, la regulación de la permeabilidad paracelular del epitelio, mediante la regulación del pasaje de iones y solutos pequeños (Furuse y Tsukita, 2006; Van Itallie y Anderson, 2006). En segundo lugar, la formación de una barrera física que previene la difusión lateral intramembrana de lípidos y proteínas, manteniendo su distribución asimétrica y contribuyendo a la generación de la polaridad epitelial (Stevenson y Keon, 1998; Tsukita y col., 2001), (Figura 5B).

Al presente, se han identificado varias proteínas transmembrana de las UEs. La primera en ser identificada fue la ocludina, la cual posee 4 dominios transmembrana, dos *loops* extracelulares y sus extremos N- y C-terminales localizados hacia el citoplasma (Figura 3B). El dominio C-terminal contiene los sitios de unión para proteínas de andamiaje, como las proteínas de las zónulas occluyentes (ZO-1, ZO-2, ZO-3) (Stevenson y col., 1986) y la cingulina (Furuse y col., 1993; González-Mariscal y

col., 2003). La función de la ocludina aún no ha sido completamente dilucidada, pero numerosos estudios indican que tiene un papel crucial en la estructura y permeabilidad de las UEs (Al-Sadi y col., 2011). Empleando la ocludina como sonda, se identificaron a las claudinas, otros componentes integrales de membrana (Furuse y col., 1993). Éstas comprenden una familia de 24 miembros y la combinación de sus subtipos, determina la estrechez y la especificidad funcional de las UEs (Turksen y Troy, 2004; Furuse y Tsukita, 2006).

Estas proteínas constituyen la base molecular de las UEs e inducen su formación (Furuse y col., 1998). También son las responsables de establecer una barrera de permeabilidad, formando poros acuosos selectivos por tamaño y carga (Tsukita y Furuse, 2000; Van Itallie y Anderson, 2006). Intracelularmente, estas proteínas se asocian a proteínas con dominios PDZ (Ruffer y Gerke, 2004).

Otra proteína integral con cuatro dominios transmembrana presente en las UEs es la tricelulina, localizada principalmente en las regiones de UEs bi- y tricelulares (Ikenouchi y col., 2005).

Como parte estructural de las UEs, además de las proteínas transmembrana de múltiples pasos, también fueron identificadas, proteínas de paso único, tales como las JAM (por sus siglas en inglés *junctional adhesion molecules*) y las CAR (por sus siglas en inglés: *cox sackievirus and adenovirus receptor*) (Cohen y col., 2001). Éstas interactúan con las proteínas andamio del complejo de unión (Cohen y col., 2001; Ebnet y col., 2000, 2001, 2003) y se les han adjudicado funciones regulatorias durante la formación de las UEs (Cohen y col., 2001; Hirabayashi y col., 2003; Raschperger y col., 2004; Mandicourt y col., 2007). Sus dominios intracelulares interactúan con proteínas citosólicas como las ZO, las cuales presentan múltiples dominios proporcionando un andamio intracelular necesario para la regulación y el mantenimiento de las UEs. Además intervienen en el anclaje del complejo al citoesqueleto de actina, lo que resulta vital para el mantenimiento y función de las UEs (Lee, 2015).

Los *desmosomas* (Dms), son uniones de anclaje altamente especializadas que enlazan filamentos intermedios a los sitios de unión intercelular, facilitando así la formación de una estructura supracelular que distribuye las fuerzas mecánicas a lo largo de un

tejido. Por lo tanto, estas uniones son particularmente importantes en el mantenimiento de la integridad de los tejidos que soportan estrés físico, como la epidermis o el miocardio y facilitan la comunicación entre células a través de la transmisión de señales (Brooke y col., 2012). Mediante estas uniones, los filamentos intermedios de las células adyacentes están indirectamente conectados formando una red continua que se extiende por todo el tejido (Figura 5A y D). El tipo de filamentos intermedios anclados a los Dms depende del tipo celular. Los Dms están compuestos principalmente por receptores transmembrana pertenecientes a la familia de cadherinas: desmogleína y desmocolina y proteínas de la placa de unión pertenecientes a las familias de proteínas armadillo y desmoplaquinas (Getsios y col., 2004). Las colas citoplasmáticas de las cadherinas desmosómicas proporcionan una plataforma de unión para las proteínas de la familia armadillo: placoglobina y placofilina (Anastasiadis y Reynolds, 2000), mientras que la desmoplaquina vincula los filamentos intermedios con regiones especializadas de la membrana plasmática (Hatsell y Cowin, 2001). Las interacciones laterales entre las proteínas de la placa de unión refuerzan su estabilidad (Getsios y col., 2004). La alteración del ensamblaje de los Dms, perturba, no sólo su función adhesiva intercelular sino también sus funciones en la comunicación y la regulación celular, dando lugar a diversas patologías y lesiones, tales como miocardiopatías, queratodermia palmoplantar, queratosis, epidermólisis ampollosa, displasia ectodérmica y alopecia, entre otras (Brooke y col., 2014).

Las *uniones adherentes* (UAs), están constituidas por dos tipos de proteínas transmembrana: cadherinas y nectinas (Figura 5A y C). Las primeras establecen asociaciones con moléculas citoplasmáticas, tales como β - y α -catenina y otras proteínas asociadas, formando una estructura denominada cadhesoma, mientras que las nectinas tienen como moléculas de anclaje a las afadinas. Ambos grupos de proteínas son responsables de unir los filamentos de actina del citoesqueleto formando zonas de unión extensas, denominadas cinturones de adhesión (Niessen y Gottardi. 2008).

Pese a que nectinas y cadherinas actúan conjuntamente durante el ensamblaje y el mantenimiento de las UAs epiteliales, hay varias diferencias fundamentales entre

éstas. A diferencia de las cadherinas, las nectinas participan en mecanismos de adhesión célula-célula calcio-independientes y con afinidad de unión promedio mucho mayor que la de las interacciones mediadas por cadherina (Takai y col., 2003); además pueden formar tanto uniones homo- como heterotípicas, siendo más fuertes estas últimas (Sato-Horikawa y col., 2000).

A la fecha, no hay consenso del mecanismo de interacción entre estos dos complejos adherentes ni del mecanismo de coordinación de sus actividades en la membrana, tanto durante la formación de los contactos, como en su mantenimiento. Mientras un conjunto de trabajos muestran evidencias que soportan la responsabilidad de las nectinas como iniciadoras y reguladoras de las UAs (Ikeda y col., 1999; Honda y col., 2003; Takai y col., 2008), otros sostienen lo opuesto (Trojanovsky y col., 2015).

Las nectinas son proteínas transmembrana y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgGs). Las proteínas de la subfamilia de las nectinas (1 a 4) poseen un dominio extracelular compuesto de tres bucles símil IgG, un dominio transmembrana de paso único y un dominio citoplasmático (C-terminal), (Figura 5C). Como las cadherinas, las nectinas forman homodímeros laterales que pueden participar tanto en la adhesión homofílica como heterofílica con otras nectinas o receptores símil nectina. Su dominio citoplásmico, contiene un motivo que sirve para interactuar con el dominio PDZ de una proteína de unión a actina conocida como AF6/afadina (Takahashi y col., 1999; Zhadanov y col., 1999; Irie y col., 2004). Afadina es una proteína que interactúa también con la superfamilia Ras de las GTPasas, en particular con Rap, así como otras proteínas de unión a actina, tales como ZO-1 y α -catenina (Yokoyama y col., 2001). Al igual que α -catenina, el noqueo de afadina revela un rol esencial en la organización epitelial (Ikeda y col., 1999; Zhadanov y col., 1999).

Dado que el cadhesoma que compone las UAs, constituye uno de los objetivos principales de estudio de la presente tesis, será desarrollado más extensamente en las secciones subsiguientes.

4.4. Cadhesomas y UAs

4.4.1. Cadherinas

Las cadherinas son proteínas de la superficie celular, que participan en la adhesión celular dependiente de Ca^{2+} y desempeñan un rol fundamental en la formación de tejidos (Takeichi, 1995; Tepass, 1999; Gumbiner, 2005). Los miembros de esta superfamilia, son glicoproteínas transmembrana que se caracterizan por la presencia de repeticiones tipo cadherinas “EC” (por sus siglas en inglés: *extracelular cadherin*) en su dominio extracelular. Estas repeticiones poseen secuencias de aproximadamente 110 aminoácidos que adquieren un plegamiento sándwich β , compuesto por siete láminas β dispuestas como dos hojas β paralelas con los extremos N- y C-terminal opuestos (Figura 6B) (Overduin y col., 1995; Shapiro y col., 1995; Nollet y col., 2000; Posy y col., 2008). Esta topología exhibe semejanzas con los dominios de las IgGs, aunque las interacciones de ensamblaje que estabilizan dicho plegamiento son diferentes (Shapiro y col., 1995). Adicionalmente, las cadherinas contienen motivos con carga negativa (DXD, DRE y DXNDNAPXF) implicados en la unión del Ca^{2+} (Takeichi, 1990). Los ECs se repiten en tándem (entre 5 y 34) en todas las moléculas pertenecientes a la superfamilia. La presencia de los iones Ca^{2+} es condición indispensable para la función adherente de las cadherinas, por lo que el nombre de éstas deriva de la abreviatura del término en inglés “*calcium-dependent adherent protein*” (Patel y col., 2003). Las repeticiones EC y su dependencia de Ca^{2+} son las características moleculares distintivas de esta superfamilia, mientras que la secuencia de aminoácidos de otras regiones, en particular del dominio citoplasmático, divergen considerablemente entre las subfamilias. En base a la organización genómica, la estructura molecular y composición de los dominios, la superfamilia de cadherinas se puede subdividir en dos ramas principales; una rama de proteínas relacionadas a cadherina, subdividida en cuatro familias y 11 subfamilias y la rama de cadherinas, subdividida en dos familias (C-1 y C-2) y ocho subfamilias. La familia C-1 tiene seis subfamilias, entre ellas las cadherinas clásicas o de tipo I, cadherinas de tipo II, desmocolinas, desmogleinas, cadherinas con siete pasos transmembrana (cadherina-7TM) y CDH13 (Hulpiau y van Roy, 2009).

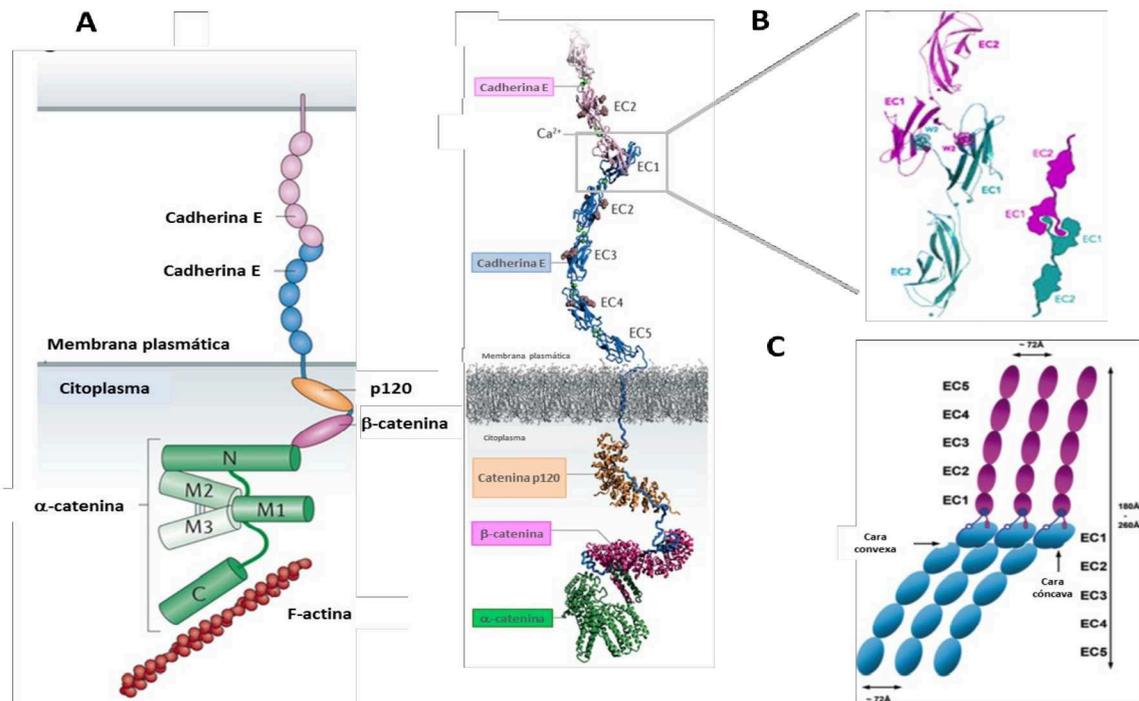


Figura 6. Modelo propuesto para la estructura molecular de las uniones adherentes. A. Complejo cadherina–cateninas–citoesqueleto de actina. **B.** Representación de la interacción homofílica en *trans* del complejo, A en base a la estructura cristalográfica. Se muestran los iones Ca²⁺ como esferas verdes y los glicanos como esferas marrones, la isoforma A4 de p120 en naranja unida al dominio yuxtamembrana de cadherina E en azul, β -catenina unida a cadherina en rosa intenso y α E-catenina monomérica en verde. En forma ampliada se muestra el modelo de la interacción de los EC1 mediante el intercambio de cadenas β , a la cual se inserta el residuo triptófano de un EC1 en el interior del bolsillo hidrofóbico del EC1 en la membrana opuesta. **C.** Representación esquemática de las UAs formadas por interacciones *cis* y *trans*. Las moléculas representadas en azul se organizan en paralelo a través de interacciones laterales *cis*. A su vez, cada una de las moléculas ubicadas en *cis* forma un dímero *trans* por intercambio de cadenas con las moléculas representadas en color magenta, que pertenecen a la célula opuesta. Adaptado de Takeichi y col., 2014.

El primer miembro de la superfamilia de las cadherinas descrito fue cadherina E. Ésta fue caracterizada como una molécula de 150 kDa, capaz de mantener las uniones célula-célula dependientes de Ca²⁺ en la línea celular V79 del hámster chino (Takeichi, 1977).

Posteriormente, fue descrita como la molécula responsable de las uniones entre blastómeros en embriones murinos (Gumbiner y Simons, 1987), razón por la cual también fue denominada uvomorulina. Finalmente, esta molécula fue denominada cadherina epitelial debido a su localización diferencial en la mayoría de las células epiteliales (Yoshida-Noro y col., 1984). Con la clonación del ADNc de cadherina E murina se determinó que la proteína funcional, de aproximadamente 728 aminoácidos (AA), se genera a partir de un precursor, el cual cuenta con una secuencia señal de aproximadamente 130 AA que permite su translocalización al retículo endoplasmático

(Nagafuchi y col., 1987). La proteína madura comprende un dominio transmembrana de unos 28 AA, un dominio citoplásmico de alrededor de 150 AA y un dominio extracelular de alrededor de 550 AA, que comprende cinco dominios EC en tándem (Figura 6A y Figura 7) (Takeichi, 1990; Shapiro y Weis, 2009).

Los ectodominios presentan múltiples sitios de unión a Ca^{2+} , son repeticiones ricas en residuos de aminoácidos ácidos situados en las regiones entre dominios EC y están entre las secuencias filogenéticamente más conservadas de las cadherinas (Nollet y col., 2000; Yagi y Takeichi, 2000; Posy y col., 2008; Shapiro y Weis, 2009). Tres iones de Ca^{2+} se unen con afinidades diferentes a cada una de estas regiones (Nagar y col., 1996; Chitaev y Troyanovsky, 1998; Tamura y col., 1998; Prasad y col., 2006) (Figura 6A y Figura 7), lo que sugiere que las cadherinas pueden responder dinámicamente a los cambios en los niveles del catión. La unión del calcio induce una transición conformacional en la proteína, desde una estructura desorganizada y flexible, a una en forma de varilla rígida, permitiendo interacciones homofílicas (Pokutta y col., 1994; Nagar y col., 1996; Boggon y col., 2002; Haussinger y col., 2002), tanto en solución (Koch y col., 1997; Haussinger y col., 2002), como entre dos células vecinas (Kim y col., 2011). La depleción del Ca^{2+} de los dominios EC, conduce a un desorden en la orientación de las secuencias entre éstos (Pokutta y col., 1994), al aumento de la sensibilidad a la proteólisis y al incremento de la movilidad entre los dominios (Haussinger y col., 2002). Para las uniones homofílicas es esencial la secuencia HAV (Histidina-Alanina-Valina) presente en la posición 79-81 del EC1, la cual se encuentra conservada en todas las cadherinas clásicas (Blaschuk y col., 1990; Nollet y col., 2000; Zhu y col., 2003). Adicionalmente, los dominios extracelulares poseen sitios de reconocimiento para proteasas y metaloproteinasas que generan formas de menor peso molecular (Steinhusen y col., 2001; McGuire y col., 2003; Najy y col., 2008; Zheng y col., 2009).

La región citoplasmática de cadherina E es un componente estructural importante. Esta región exhibe un alto grado de conservación tanto entre sus homólogos de distintas especies, como entre otras cadherinas clásicas del tipo I (Nollet y col., 1999; Oda, 2012). Esta región desempeña un rol importante en la detección y transducción de señales. Si bien este dominio parece ser prescindible para el reclutamiento de

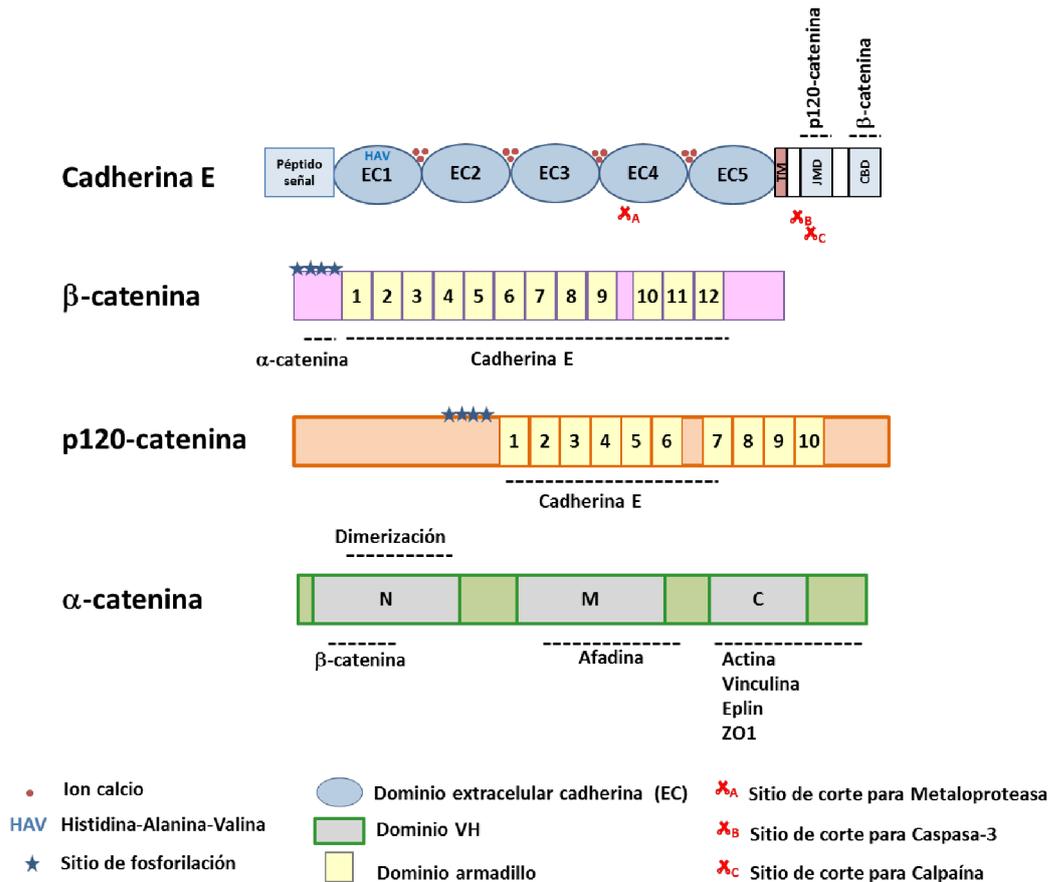


Figura 7. Representación esquemática de las moléculas que constituyen el complejo adherente dependiente de cadherina E. Se muestran las regiones estructurales características de cada una, como así también las zonas de interacción con otras proteínas. Galetto, 2016.

cadherinas a los sitios de contacto célula-célula (Hong y col., 2010; Harrison y col., 2011), resulta crítico en la regulación de la remodelación de las UAs y en la interacción de dichas uniones con el citoesqueleto y la maquinaria de tráfico vesicular. Este dominio se organiza en un subdominio yuxtamembrana (JMD, por las siglas en inglés *juxtamembrane domain*), adyacente al segmento transmembrana de la molécula y el subdominio C-terminal de unión a cateninas (CBD, por sus siglas en inglés *catenin-binding domain*). El primero actúa en la unión con p120 y proteínas relacionadas a ésta (Thoreson y col., 2000; Ishiyama y col., 2010), mientras que el CBD interactúa con β-catenina y placoglobina (Huber y Weis, 2001). Este último dominio, en ausencia de sus proteínas de unión tiende a desestructurarse (Huber y col., 2001). Por otro lado, se ha postulado que la asociación con p120 provoca el reordenamiento de la región yuxtamembrana, pero esto aún no se ha verificado experimentalmente. Conforme son sintetizadas, las moléculas de cadherina E se asocian a β-catenina en el retículo

endoplásmico y el complejo es transportado a la superficie celular (Hinck y col., 1994). Esta unión impide la destrucción proteosómica de cadherina E, ya que la unión de β -catenina en su sitio específico oculta una secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (denominada PEST), que es reconocida por ligasas de ubiquitina (Huber y Weis, 2001; Huber y col., 2001).

Las modificaciones postraduccionales de las cadherinas clásicas son críticas para la modulación de su estructura y función (Takeichi, 1988). Como parte del proceso de control de calidad, las cadherinas son N-glicosiladas en numerosos sitios de los dominios EC, en su tránsito por la red del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Boggon y col., 2002), lo cual interfiere con su estado oligomérico (Brasch y col., 2011).

4.4.1.1. Dimerización de cadherinas

El paso inicial clave para la asociación de las cadherinas clásicas durante la formación de UAs y la agregación de tipos celulares, involucraría la dimerización de su región extracelular (Nose y col., 1990; Al-Amoudi y col., 2007). Se ha postulado que las interacciones intercadherinas en *trans* habilitan el establecimiento del contacto intercelular, mientras que las interacciones en *cis* refuerzan la estructura del complejo adhesivo (Yap y col., 1997; Troyanovsky, 2005; Shapiro y Weis, 2009; Hong y col., 2010).

Numerosos reportes apoyan la idea de que los dímeros se forman por interacción de los dominios EC1 (Nose y col., 1990; Klingelhöfer y col., 2002; Shan y col., 2004), aunque serían necesarios, pero no suficientes para la adhesión mediada por cadherinas (Handschuh y col., 2001; Shan y col., 2004; Prakasam y col., 2006). Una característica clave de la dimerización *trans* es el intercambio de las cadenas β del extremo N de los dominios EC1. Éste, estaría estabilizado por el establecimiento de dos tipos de interacciones. En primer término, la que se da entre un residuo triptófano conservado en la posición 2 (Trp2), en el extremo de una de las cadherinas del par y un bolsillo hidrofóbico de la otra (Figura 6B) (Tamura y col., 1998). La segunda interacción consiste en la formación de un puente salino entre el grupo amino del N-terminal de una de las cadherinas, con el residuo glutamato 89 de la otra (Glu89) (Harrison y col., 2005). En función de estas interacciones, la remoción proteolítica de un prodominio es un evento clave en la activación de la función adhesiva de las cadherinas (Haussinger y

col., 2004). El intercambio de cadenas requiere la formación de un lazo flexible, que podría darse entre moléculas ancladas a la misma membrana (intercambio *cis*) así como en membranas opuestas (intercambio *trans*) (Trojanovsky y col., 2003). La prevalencia de uno u otro tipo de unión estaría regida por el Ca^{2+} ligado; en presencia de este catión, el dominio extracelular presentaría una conformación favorable para el intercambio *trans*, mientras que su depleción favorecería la *cis* (Pokutta y col., 1994; Chitav y Trojanovsky, 1998; Shan y col., 2000). Sin embargo, aún no se dispone de evidencias *in vivo* que comprueben algún rol en la adhesión de estos dímeros por intercambio *cis* y tampoco resultan concluyentes los estudios de coimmunoprecipitación (Trojanovsky, 2005), ni los de FRET realizados con ectodominios de cadherina recombinante (Zhang y col., 2009). Algunos autores sugieren que la formación de dímeros por intercambio *cis* transitorios y débiles, permite el aumento de la densidad local de moléculas de cadherina (Huber y col., 1999). Aunque a la fecha no se ha logrado probar definitivamente la existencia de dímeros por intercambio *cis* estables, los análisis estructurales de las interacciones presentes en las estructuras cristalinas de las cadherinas E, N y C han revelado que los dímeros de intercambio de cadenas *trans* forman contactos *cis* funcionales a la adhesión, ya que organizarían a las moléculas de cadherina en arreglos lineales (Boggon y col., 2002; Harrison y col., 2011). Estos contactos se darían por una interacción asimétrica entre la cara cóncava del dominio EC1 de una molécula y la convexa del dominio EC2 de la cadherina adyacente (Figura 6C). La superficie de la unión *cis* en el EC1 es opuesta a la interfaz del dímero *trans* y la interacción se estabilizaría por un pequeño núcleo hidrofóbico y varios enlaces intermoleculares puente hidrógeno. Cada molécula de cadherina puede proporcionar simultáneamente tanto superficies cóncavas en el EC1, como convexas en el EC2 pudiendo formar dos interacciones *cis* idénticas con ambas cadherinas adyacentes. En base a estos datos, se ha propuesto que las interacciones *cis* en cooperación con las interacciones *trans*, producirían estructuras adhesivas estables y ordenadas, en las que las interacciones *trans* por intercambio de cadena, son estables sólo una vez que están interconectadas por las *cis* (Harrison y col., 2011).

4.4.2. Cateninas

Las cateninas son elementos críticos para el establecimiento y regulación de la adhesión entre células. En las UAs, tres tipos de cateninas (β -, α - y p120) participan en la interacción del dominio intracelular de cadherina E con los componentes del citoesqueleto. De éstas, β -catenina y p120 lo hacen directamente, mientras que α -catenina interacciona con β -catenina y con el citoesqueleto. Tanto β -catenina como p120 pertenecen a la superfamilia de las proteínas armadillo (Huber y col., 1997).

4.4.2.1. β -Catenina

Es una proteína de 92 kDa que fue originalmente purificada de células epiteliales de *Xenopus* mediante coimmunoprecipitación con cadherina E (McCrea y col., 1991; Aberle y col., 1996). A diferencia de la multiplicidad de cadherinas y de las diversas variantes de α -catenina que poseen especificidad tisular, β -catenina es una proteína altamente conservada. Las secuencias de β -catenina de *Xenopus* y humana tienen sólo seis aminoácidos diferentes y exhiben un 67% de identidad con su homóloga de *Drosophila*. Diversos estudios filogenéticos han demostrado que es una molécula clave para dilucidar la transición hacia la pluricelularidad de los metazoos (Grimson y col., 2000; Coates y col., 2002; Dickinson y col., 2011, 2012; Murray y Zaidel-Bar, 2014). Adicionalmente, se han encontrado potenciales homólogos de β -catenina en otros organismos no metazoos tanto pluri- como unicelulares, tales como *Arabidopsis thaliana* (Coates, 2003) y *Volvox carteri* (Prochnik y col., 2010), ambos pertenecientes al Reino *Plantae* y *Saccharomyces cerevisiae* del Reino *Fungi* (Wang y col., 1998). Este conjunto de antecedentes, sugieren que β -catenina pudo haber existido en el último ancestro común que dio origen a algas verdes, plantas, hongos y animales.

La estructura primaria de β -catenina consiste en 781 aminoácidos con una región N-terminal de aproximadamente 150 AA, un gran dominio central de alrededor de 520 AA compuesto de 12 repeticiones armadillo y una región C-terminal de 100 AA (Figura 7). Como se describió previamente, β -catenina interacciona con el dominio CBD de la cola citoplasmática de cadherina E. Sin embargo, la membrana no es su única localización subcelular, sino que el *pool* asociado a las UAs está en constante equilibrio con otros presentes en el citoplasma y en el núcleo, reflejando su multiplicidad

funcional (Nathke y col., 1994; Kam y Quaranta, 2009). Además de su función estructural y regulatoria en las UAs, β -catenina tiene un rol fundamental como coactivador transcripcional en la vía de señalización Wnt (Clevers, 2006; Cadigan y Peifer, 2009). Sus diferentes funciones son mediadas por diferentes regiones de la molécula. Específicamente, la interacción con α -catenina se lleva a cabo vía el dominio N-terminal, uniéndose a las cadherinas por su dominio central armadillo, mientras que su función de activación transcripcional es a través de su región C-terminal, de carácter fuertemente ácido (Aberle y col., 1996; Shapiro y Weis, 2009; Ishiyama y Ikura, 2012). Además del sitio de unión a α -catenina, el extremo N-terminal presenta sitios de fosforilación para la GSK3 β (Aberle y col., 1994). Por otro lado, el extremo C-terminal interacciona con varias proteínas de la maquinaria transcripcional, tales como: la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Hecht y col., 1999), Pontina (Bauer y col., 1998), Teashirt (Gallet y col., 1999), Sox 17 y 13 (Zorn y col., 1999), SMAD4 (Nishita y col., 2000) o CREB (Miyagishi y col., 2000; Takemaru y Moon, 2000). Además, este dominio es esencial para la transcripción mediada por factores de la familia Tcf/Lef (Rubinfeld y col., 1995; Behrens y col., 1996). El dominio armadillo es muy estable y rígido (Huber y col., 1997). Su estructura cristalina revela que cada repetición de 42 AA consiste en tres pequeñas hélices α , las cuales forman con las adyacentes una superhélice cilíndrica, que forma un gran surco en el que las cargas positivas quedan expuestas hacia la superficie. La profundidad de este surco aumenta entre las repeticiones 9 y 10, originando un “bolsillo” con carga positiva. Los dominios armadillo son estructuras de interacción proteína-proteína, que en el caso de β -catenina une múltiples ligandos, tales como cadherina E, Tcf/Lef, APC y axina, formando complejos mutuamente excluyentes. Sin embargo, el dominio armadillo no sufriría ningún cambio conformacional para adaptarse a sus diferentes ligandos (Gottardi y Gumbiner, 2001) cargados negativamente, ya que su interacción sería de carácter electrostático (Huber y col., 1997).

La función de señalización de β -catenina en la vía Wnt depende de la regulación de su estabilidad en el citoplasma (Peifer y Polakis, 2000; Tolwinski y Wieschaus, 2004; Brembeck y col., 2006). La unión de ligandos Wnt al complejo receptor de membrana formado por Frizzled y Lrps5/6, induce la estabilización del *pool* citoplásmico de β -

catenina (Logan y Nusse, 2004; Moon y col., 2004), lo que permite su traslado al núcleo, donde actúa como un activador transcripcional asociado con proteínas de unión al ADN, como el factor de células T (Tcf), el factor potenciador linfocitario 1 (Lef-1) y la Pangolina (Pan). En ausencia de ligandos de la vía de señalización Wnt, el pool citoplasmático de β -catenina es degradado por un complejo de destrucción formado por el producto del gen supresor de tumor de la poliposis adenomatosa coli (APC, por sus siglas en inglés *adenomatous polyposis coli*), axina, glucógeno sintasa quinasa 3- β (GSK-3 β) y caseína quinasa (CKI) (Stamos y Weis, 2013).

La función de adhesión de β -catenina a cadherina E también es regulada por diferentes fosforilaciones (Perez-Moreno y col., 2006). Mientras que la fosforilación de los tres residuos serina del dominio citoplásmico de cadherina E (S684, S686, S692) por las quinasas CKII y GSK-3 β aumentan la afinidad de unión de β -catenina (Lickert y col., 2000; Huber y Weis, 2001). Por el contrario, la fosforilación de los residuos tirosina Y489 o Y654 de β -catenina interfieren su unión con cadherina, mientras que la fosforilación de Y142 debilita la unión a α -catenina (Lilien y col., 2002). La base estructural de este comportamiento es que el residuo Y654 de β -catenina, forma un enlace puente de hidrógeno con la asparagina 665 de cadherina E, el cual estabiliza la interacción (Lickert y col., 2000). Entre las quinasas implicadas en estas fosforilaciones han sido identificadas Src y la quinasa receptora de EGF que fosforilan el residuo Y654 (Hoschuetzky y col., 1994; Piedra y col., 2001), Abl que actúa sobre el Y489 (Rhee y col., 2002) y Fer que fosforila Y142 (Piedra y col., 2003). Nuestro grupo ha demostrado *in vivo* que la fosforilación de las moléculas involucradas en los complejos adhesivos epiteliales deslocalizan de los sitios de contactos entre cadherina E y β -catenina promoviendo así el desensamblaje de las UAs (Izaguirre y col., 2010). Sin embargo, existe evidencia que la actividad de la tirosina quinasa, en algunos casos, también promovería la formación de uniones adherentes (McLachlan y Yap, 2007).

En función de los hallazgos logrados al presente, se cree que β -catenina potencia la adhesión dependiente de cadherina principalmente a través de dos mecanismos, el primero implica la regulación del tráfico de cadherina desde el retículo endoplásmico/Golgi a la membrana plasmática (Chen y col., 1999). El otro mecanismo implicaría la estabilización de las cadherinas en la membrana plasmática, mediante el

reclutamiento de α -catenina a las UAs (Miyashita y Ozawa, 2007; Troyanovsky y col., 2011).

4.4.2.2. p120-Catenina

La catenina p120 fue descubierta como un sustrato de la tirosina quinasa Src (Reynolds y col., 1989) y posteriormente reconocida como un miembro de la superfamilia de proteínas armadillo, que interactúa con la región citoplásmica de cadherinas (Reynolds y col., 1992, 1994; Peifer y col., 1994). Como ya se ha descrito, esta molécula interactúa específicamente con el dominio JMD de cadherinas (Thoreson y col., 2000; Ishiyama y col., 2010) a través de su dominio armadillo. A diferencia de β -catenina, p120 posee un dominio central arqueado (residuos 368-825) con 9 repeticiones armadillo y una secuencia intermedia entre las repeticiones 5^{ta} y 6^{ta} (Choi y Weis, 2005) (Figura 7). El dominio central está flanqueado por una región regulatoria N-terminal (NTR) y una región C-terminal (CTR) (Ishiyama y col., 2010) variables y dependientes de la isoforma (Anastasiadis y Reynolds, 2000). En ambas regiones regulatorias terminales se han identificado numerosos sitios de fosforilación (Mariner y col., 2001; Xia y col., 2003), pero la consecuencia funcional de estas modificaciones no es clara (Reynolds, 2007; Hong y col., 2016). Adicionalmente, la región NTR y un segmento dentro del dominio armadillo de p120, interactúan con GTPasas pequeñas de la familia Rho, tales como RhoA y Rac1 (Anastasiadis, 2007; Yanagisawa y col., 2008).

La estructura cristalina del complejo p120/cadherina E ha proporcionado una idea preliminar de cómo esta catenina reconoce específicamente el JMD de cadherina y regula la internalización de los complejos cadherina-catenina vía endocitosis (Ishiyama y col., 2010). Así, la carencia de p120 en diferentes tipos celulares tanto *in vitro* como *in vivo* conduce a una disminución de los niveles de cadherina y al desensamblaje de las UAs (Davis y col., 2003; Davis y Reynolds, 2006; Perez-Moreno y col., 2008; Taulet y col., 2009). Dos mecanismos explicarían la función proadhesiva de esta proteína; el más directo implica la estabilización de las cadherinas en la superficie celular vía la inhibición de su endocitosis (Ishiyama y col., 2010; Hartsock y Nelson, 2012) y/o la promoción de la exocitosis (Davis y col., 2003; Xiao y col., 2005; Chiasson y col., 2009). El segundo mecanismo propuesto, postula la unión e inactivación de la GTPasa

pequeña RhoA, que indirectamente disminuiría el reciclaje de las cadherinas en las UAs mediante la estabilización del citoesqueleto de actina perimembranoso (Noren y col., 2000; Wildenberg y col., 2006; Taulet y col., 2009).

Antagonizando con esta función adhesiva, se ha encontrado que a través de su dominio armadillo, p120 es capaz de reclutar y ligarse al represor transcripcional Kaiso, que modula la señalización no canónica Wnt (Daniel y Reynolds, 1999; Kim y col., 2004; Park y col., 2006).

4.4.2.3. α -Catenina

Es una proteína citosólica de 102 kDa y aproximadamente 900 aminoácidos, implicada en el anclaje del complejo de adhesión celular cadherina/catenina al citoesqueleto de actina en las UAs (Kobielak y Fuchs, 2004). A diferencia de β -catenina y p120, no posee repeticiones armadillo y no se une directamente al dominio citoplasmático de cadherina (Nagafuchi y col., 1991; Ozawa y Kemler, 1992). Estructuralmente está estrechamente relacionada a vinculina, proteína de unión a actina e indirectamente asociada con cadherinas mediante la unión al segmento N-terminal de β -catenina (Ozawa y col., 1990; Aberle y col., 1994). Al presente, en los mamíferos, se conocen tres subtipos de α -catenina, α E (epitelial), α N (neuronal) y α T (testicular y cardíaca), mientras que en invertebrados se ha descrito un único homólogo $D\alpha$ (*Drosophila*), (Oda y col., 1993; Costa y col., 1998). Estudios previos han revelado que esta proteína contiene tres dominios principales: N-terminal (N) involucrado en la unión a β -catenina y en la homodimerización (Aberle y col., 1994; Pokutta y Weis, 2000), modulador (M) implicado en la unión a vinculina (Yang y col., 2001; Yonemura y col., 2010) y C-terminal (C) comprometido en la unión y agrupamiento de los filamentos de actina (Rimm y col., 1995) (**Figura 7**). Cada uno de los tres dominios contienen regiones homólogas a las de vinculina (VH1, VH2 y VH3) (Herrenknecht y col., 1991; Nagafuchi y col., 1991). Se ha postulado que α -catenina actúa en la interacción con el citoesqueleto de actina, aunque el mecanismo molecular, sigue siendo desconocido (Yonemura y col., 1995; Meng y Takeichi, 2009; Ivanov y Naydenov, 2013). Dado que los dominios N y C de α -catenina contienen respectivamente sitios de unión definidos para β -catenina y filamentos de actina, originalmente se asumió que α -catenina actuaría como un conector estable entre los complejos cadherina-catenina y

filamentos de actina (Gates y Peifer, 2005; Weis y Nelson, 2006). Sin embargo, este modelo "tradicional" está en discusión, por cuanto α E-catenina sólo interacciona con los filamentos de actina en forma de homodímero y no se había logrado aislar el complejo cuaternario cadherina- β -catenina- α -catenina-actina F (Drees y col., 2005; Yamada y col., 2005). Al presente, no se ha podido desentrañar concluyentemente el mecanismo por el cual las UAs están relacionadas con el citoesqueleto de actina. En la actualidad se proponen distintos modelos. Uno de ellos propone que α -catenina se disociaría del complejo cadherina-catenina para formar homodímeros e interactuar con los filamentos de actina (Dress y col., 2005). Más recientemente se ha propuesto que α -catenina, ligada al complejo cadherina-catenina adoptaría una conformación monomérica activa para unirse directamente a los filamentos de actina (Kwiatkowski y col., 2010; Desai y col., 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que varias proteínas de unión a actina, también son capaces de interactuar con α -catenina (Yonemura y col., 1995), sugiriendo que la interacción con actina podría ser indirecta. Entre estas proteínas se destacan Eplin (por sus siglas en inglés *epithelial protein lost in neoplasm*) (Abe y Takeichi, 2008; Taguchi y col., 2011), α -actinina (Knudsen y col., 1995; Yamada y col., 2005) y vinculina (Watabe-Uchida y col., 1998; Weiss y col., 1998; Bakolitsa y col., 2004; Yamada y col., 2005). Adicionalmente, existen otras proteínas presentes en las uniones que tienen el potencial para conectar cadherinas a los filamentos de actina, ya que presentan dominios de unión a actina y además interactúan con cadherina (Geisbrecht y Montell, 2002; Sayegh y col., 2004; Maddugoda y col., 2007; Mangold y col., 2011). Entre ellas, cortactina (Helwani y col., 2004; Sayegh y col., 2004); y miosina VI (Maddugoda y col., 2007; Mangold y col., 2011). Por otro lado, varios estudios recientes postulan que α -catenina actúa como un mecanosensor de las UAs, en el que las fuerzas dependientes de actomiosina desencadenarían un cambio conformacional en α -catenina, que llevaría al reclutamiento de vinculina a los sitios de contacto célula-célula, conectando el complejo cadherina-catenina con los filamentos de actina tanto directa-, como indirectamente (Duc y col., 2010; Smutny y Yap, 2010; Yonemura y col., 2010). Estos modelos alternativos no serían mutuamente excluyentes, por lo que es posible que las cadherinas utilicen diferentes mecanismos moleculares para unirse físicamente a los filamentos de actina, tal vez en función del contexto fisiológico-estructural.

4.4.3. UAs y citoesqueleto de actina

Como se ha expresado precedentemente, las cadherinas clásicas cumplen su función en estrecha cooperación con el citoesqueleto. Desde hace mucho tiempo es ampliamente estudiada la interacción con el citoesqueleto de actina, pero existe evidencia creciente que las cadherinas también interactúan con los microtúbulos (Bogatcheva y Verin, 2008; Meng y Takeichi, 2009; Niessen y col., 2011; Han y Yap, 2012).

A pesar de no estar consensuado el mecanismo por el cual las cadherinas y cateninas se vinculan al citoesqueleto de actina, existe acuerdo en que la plasticidad de las UAs implica una regulación bidireccional entre cadherinas y actina.

Las UAs exhiben diversas morfologías, dependiendo de la forma en que se asocian a los filamentos de actina (Takeichi, 2014); en células epiteliales polarizadas, los filamentos de actina se disponen paralelos a las membranas celulares estableciendo un cinturón continuo en la circunferencia de las células, recibiendo la denominación de zónula adherente (ZA) (Figura 8A) (Farquhar y Palade, 1963; Franke, 2009). Las UAs también pueden adoptar un aspecto puntiforme, conocidas como puntos adherentes (PAs) (Tepass y Hartenstein, 1994; Rose y col., 1995). En éstos, los filamentos de actina se ubican perpendiculares a las membranas celulares (Figura 8B). Los filamentos de actina tensionan a las cadherinas a ambos lados de la unión, lo que provoca una apariencia discontinua en la distribución del receptor. Este tipo de UA también se conoce como puntual, radial, discontinua o focal (Takeichi, 2014) y se pueden visualizar distribuidas a lo largo de la superficie lateral de las células epiteliales (Drenckhahn y Franz, 1986) y en células no epiteliales (Fannon y Colman, 1996; Uchida y col., 1996; Wuchter y col., 2007).

Los PAs facilitan los procesos de anclaje, por lo que generalmente se encuentran en las primeras etapas de desarrollo de las UAs en células epiteliales polarizadas (Yonemura y col., 1995; Vasioukhin y col., 2000; Wuchter y col., 2007). Si bien son formas precursoras de estas uniones, los PAs a veces se mantienen y son funcionales en tejidos maduros tanto epiteliales (como los queratinocitos de epitelios estratificados) como en otros tejidos (como el músculo cardíaco, donde reciben el nombre de *fascia adherente*, (Sheikh y col., 2009). A su vez, las UAs pueden exhibir diversas formas

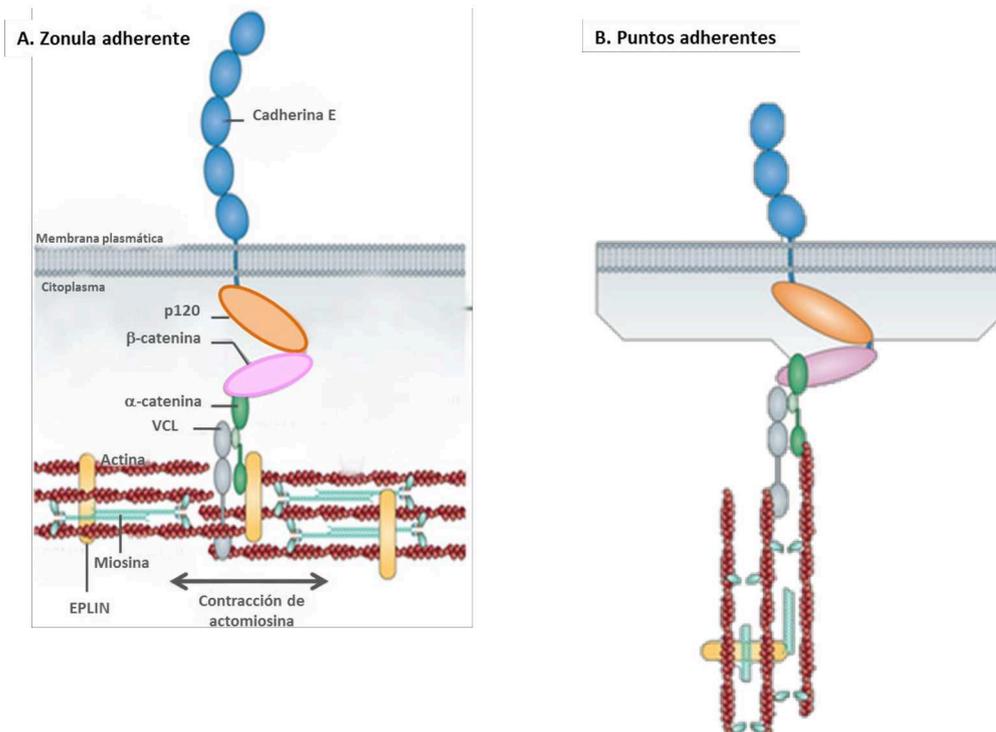


Figura 8. Diferencias entre ZA y PA. Modelo de las dos formas de contactos célula-célula dependientes de cadherinas de las células epiteliales. En esta vista lateral se ilustran los componentes moleculares implicados. **A.** Los filamentos de actina se disponen paralelos a la membrana de la célula para formar UAs lineales. **B.** En las UAs puntiformes, los filamentos de actina se ubican perpendiculares a las uniones y traccionan de las cadherinas presentes a ambos lados de la unión. Se postula la interconvertibilidad entre UAs lineales y puntiformes de células epiteliales, dependiendo del contexto celular. Adaptado de Takeichi, 2014.

intermedias entre ZA y PA, sugiriendo que ambos tipos son interconvertibles (Taguchi y col., 2011) o especializarse en los sitios en que varias células epiteliales convergen (Yonemura, 2011).

Se postula que el proceso de formación de las UAs comenzaría con un contacto oportunista entre dos células (Figura 9), promovido por una actividad exploratoria de protrusiones de las membranas, basadas en actina (Adams y col., 1996; Vasioukhin y Fuchs, 2001; Vasioukhin y col., 2001). Tras este contacto, los monómeros de cadherina difundirían y formarían rápidamente interacciones homofílicas *trans*, originando pequeños agrupamientos con menor movilidad (Adams y col., 1998), los cuales reclutan nuevas moléculas, promoviendo el crecimiento de la zona de unión y la conexión con el citoesqueleto de actina (Vasioukhin y col., 2001). En los sitios de contacto célula-célula, los haces de actina radiales son reemplazados posteriormente por haces paralelos al contacto. Estos haces madurarían progresivamente hasta formar

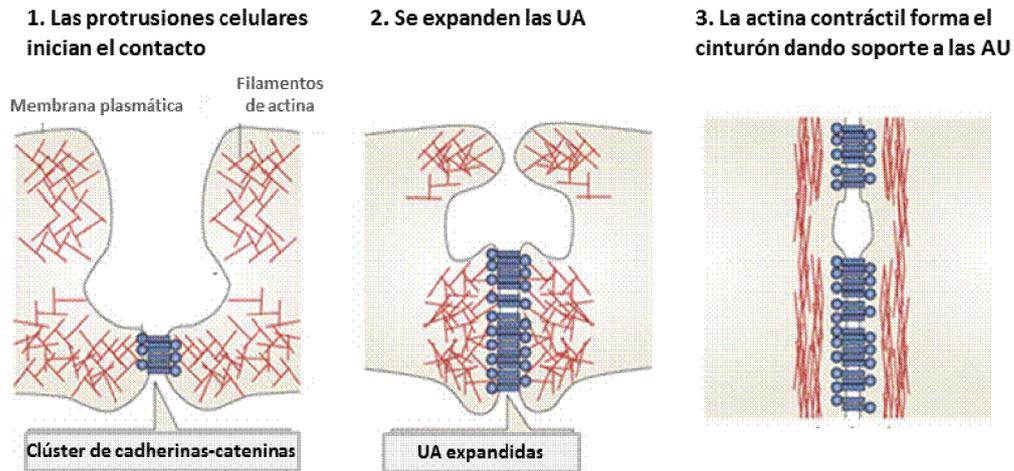


Figura 9. Modelo del mecanismo de ensamblaje de UAs epiteliales. 1. La agrupación de complejos cadherina–catenina en las protuberancias de membrana inician los contactos celulares. 2. El incremento en el reclutamiento de complejos cadherina–catenina promueve la ampliación de la zona de unión intercelular. 3. Una vez que las UAs se han extendido de manera considerable reclutan α -catenina para promover la formación de haces de actina contráctil, que lleven al fortalecimiento de las UAs. Adaptado de Harris y Teppas, 2010.

el típico cinturón de los epitelios maduros, por asociación con proteínas de unión a actina, tales como miosina II y α -actinina (Hirokawa y col., 1983; Drenckhahn y Dermietzel, 1988). Esta remodelación masiva de actina requiere su polimerización mediada por al menos dos tipos de nucleadores: el complejo Arp2/3, el cual promueve la ramificación de actina y las forminas, que favorecen el crecimiento lineal de los filamentos de actina (Vasioukhin y Fuchs, 2001; Kovacs y col., 2002; Kobiela y col., 2004; Verma y col., 2004).

Las cadherinas controlan la actividad de estos dos tipos de nucleadores, mediante la activación de cascadas de señalización que involucran GTPasas pequeñas, cuyos mecanismos de acción y regulación se detallan más adelante.

4.4.4. UAs y determinación de la polaridad epitelial

Una característica fundamental de los epitelios simples es que forman una lámina bidimensional de células estructural- y funcionalmente polarizadas, gracias a los contactos adhesivos mediados por cadherina E (Wang y col., 1990; Nejsun y Nelson, 2007). Las UAs formadas conducen a su vez a una importante reorganización de los citoesqueletos de actina y de microtúbulos, tanto proximales (Kovacs y col., 2002; Chu y col., 2004; Drees y col., 2005; Scott y col., 2006; Yamada y Nelson, 2007) como

distales (Adams y col., 1998; Ehrlich y col., 2002; Vaezi y col., 2002; Yamada y Nelson, 2007) para estabilizar los contactos célula-célula.

Los epitelios presentan dominios diferenciales en la membrana plasmática apical y basolateral, debido a la composición asimétrica de transportadores involucrados en su función secretora y absorptiva y porque tienen una maquinaria de tráfico vesicular polarizada que se compone de orgánulos secretorios (RE, complejo de Golgi) y compartimientos endosomales necesarios para la generación y mantenimiento de la distribución asimétrica de las proteínas de membrana (Rodríguez-Boulan y Macara, 2014). Sin embargo, los mecanismos por los cuales se produce la polarización no están completamente comprendidos. Se cree que el establecimiento inicial de la polaridad podría ser controlado tanto por la posición del complejo adhesivo en la membrana plasmática, como por la rápida organización del citoesqueleto y la maquinaria exocítica (Nelson y col., 2013). Como se verá más adelante, este conjunto de procesos, también está vinculado con la actividad de las GTPasas pequeñas.

4.5. Dinámica de las UAs y su regulación

Dada su importancia en los procesos morfogénéticos, las UAs son estrictamente reguladas durante el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de los tejidos. Debido a que durante la morfogénesis los epitelios deben continuar cumpliendo su función, a pesar de estar sufriendo modificaciones, se requiere una gran complejidad molecular para mantener la homeostasis. Así, deberá darse una coordinación muy fina entre estabilidad y flexibilidad de las uniones, en la que están íntimamente relacionados la dinámica de las uniones, el tráfico vesicular y los procesos mediados por las GTPasas pequeñas.

4.5.1. Rol del tráfico vesicular

La entrega de las proteínas del complejo de unión por exocitosis, desde el sitio de síntesis (retículo endoplasmático) al sitio donde cobran funcionalidad (membrana plasmática), es esencial para la formación de nuevas interacciones adhesivas mientras que la remoción de estas proteínas desde la membrana plasmática vía endocitosis, es crítica tanto para la disrupción como para el reciclaje de las UAs. La remodelación de las UAs puede ser parcial, reemplazando moléculas individuales o un pequeño grupo

de ellas dentro del contacto adhesivo (sin interrupción de la adhesión intercelular) o alternativamente, pueden darse remodelaciones de las uniones a gran escala, con la interrupción y reformación de los contactos adherentes (Ivanov y col., 2005). En este contexto, el tráfico vesicular es un proceso clave en su remodelación.

Como ocurre con otras proteínas de la vía secretora, las cadherinas se transportan desde su sitio de síntesis en el retículo endoplásmico a la membrana plasmática mediante vesículas recubiertas de clatrina (Figura 10) (Deborde y col., 2008). Como se ha expresado precedentemente, la evidencia sugiere que las cadherinas viajan formando complejos con β -catenina, aunque la composición molecular de estas estructuras sigue siendo controversial (Miranda y col., 2003; Wahl y col., 2003; Curtis y col., 2008). Cadherina E parecería estar localizada en una subpoblación de endosomas de reciclaje enriquecidos con Rab11. Por otro lado, tanto esta última como Rab8 han sido implicadas en la regulación del tráfico de cadherinas a las UAs epiteliales (Yamamura y col., 2008). Se desconoce si Rab8 asiste a la entrega de cadherina E desde la red *trans* del Golgi a los endosomas o vía endosomas de reciclaje desde la membrana plasmática. La interacción de las vesículas transportadoras de cadherinas

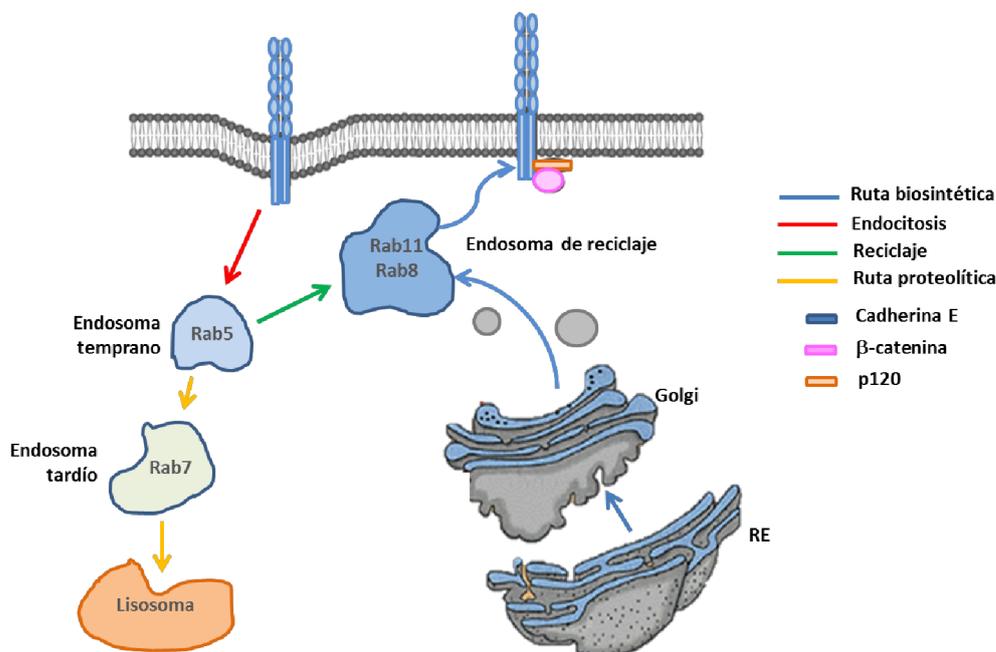


Figura 10. Vías del tráfico vesicular de cadherina E. El diagrama representa la vía de exocitosis de cadherina E recién sintetizada a la membrana plasmática, así como destinos intracelulares de cadherina E internalizada. Galetto, 2016.

con la membrana plasmática es un proceso de múltiples pasos que está mediada por complejos proteicos de anclaje y fusión, como los complejos exocisto (Grindstaff y col., 1998; Yeaman y col., 2004; He y Guo, 2009; Xiong y col., 2012) y SNARE basolateral (Jahn y Scheller, 2006; Malsam y col., 2008). En cuanto a la localización en que se produce dicha fusión, las cadherinas son susceptibles de ser enviadas a cualquier ubicación dentro del dominio basolateral de la membrana plasmática y llegan a las UAs a través del flujo intramembranoso de dirección apical (Kametani y Takeichi, 2007).

Por otro lado, la endocitosis de cadherina juega un rol fundamental en los procesos morfogénicos que requieren una remodelación rápida y extensa de los contactos adherentes epiteliales (Jarrett y col., 2002; Georgiou y col., 2008; Lee y Harland, 2010; Levayer y col., 2011). Mientras que la internalización de cadherinas en estado estacionario puede ser controlada y compensada con el fin de evitar la interrupción irreversible de los contactos célula-célula, la inducción de la endocitosis promovida por estímulos externos puede conducir a una faltante drástica de cadherinas en la membrana plasmática y por lo tanto, en un desensamblaje de las UAs. Existen una serie de estímulos que desencadenan la internalización de cadherina a gran escala, por ejemplo, la disminución de la concentración de calcio extracelular interrumpe la dimerización en *trans*, produce la endocitosis de las cadherinas y como consecuencia, la ruptura de todos los complejos de unión (Kamei y col., 1999; Le y col., 1999; Izumi y col., 2004; Ivanov col., 2004; Troyanovsky y col., 2006). Adicionalmente, se ha verificado que la exposición de las células epiteliales a estímulos relacionados con enfermedades tales como el estrés oxidativo, carcinógenos, factores de crecimiento y patógenos bacterianos también inducen el desensamblaje de las UAs y la endocitosis de cadherina (Lerch y col., 1997; Xie y col., 2010; Ivanov y Naydenov, 2013). Estos datos sugieren que la endocitosis de cadherina representa un mecanismo importante involucrado en la ruptura de las barreras epiteliales bajo diferentes condiciones fisiopatológicas.

La internalización de cadherinas, al igual que muchas otras proteínas transmembrana, puede ocurrir por diversas vías (Figura 10 y Figura 11), siendo las mejor caracterizadas la endocitosis mediada por clatrina, la mediada por calveolina/balsas lipídicas y la macropinositosis (Ivanov, 2008). La endocitosis mediada por clatrina es la vía más

común para las cadherinas clásicas, tanto en estado estacionario, como en las sometidas a estimulación. Este mecanismo involucra la formación de fosas recubiertas con clatrina, seguido de una escisión de la membrana plasmática y posterior fusión con un endosoma (Bonifacino y Traub, 2003). El reclutamiento de las cadherinas a las fosas recubiertas de clatrina es mediado por una proteína adaptadora especial 2 (AP-2 por sus siglas en inglés: “*adaptor protein*”). El motivo de dileucinas, mediante el cual las cadherinas unen proteínas AP, es una región esencial para la internalización de la molécula (Miyashita y Ozawa, 2007) y la existencia de este sitio de unión en el JMD explica la función estabilizadora que tiene p120, al unirse a la misma región e impedir el reconocimiento por parte de AP-2 y su internalización (Xiao y col., 2005; Chiasson y col., 2009; Ishiyama y col., 2010). Además de AP-2, se han descrito dos adaptadores monoméricos, Numb y disabled (Dab-2) (Yang y col., 2007; Sato y col., 2011), pero sus mecanismos de acción aún no han sido clarificados.

La endocitosis dependiente de caveolina/balsas lipídicas promueve la internalización mediante invaginaciones de la membrana ricas en colesterol y esfingolípidos, frecuentemente asociadas con proteínas como caveolinas y flotilinas (Hansen y Nichols, 2009; Orlichenko y col., 2009). En el caso de la macropinocitosis, es un proceso dependiente de actina iniciado desde la membrana plasmática que da lugar a grandes vacuolas endocíticas llamados macropinosomas (Paterson y col., 2003; Bryant y col., 2007; Padmanabhan y Taneyhill, 2015).

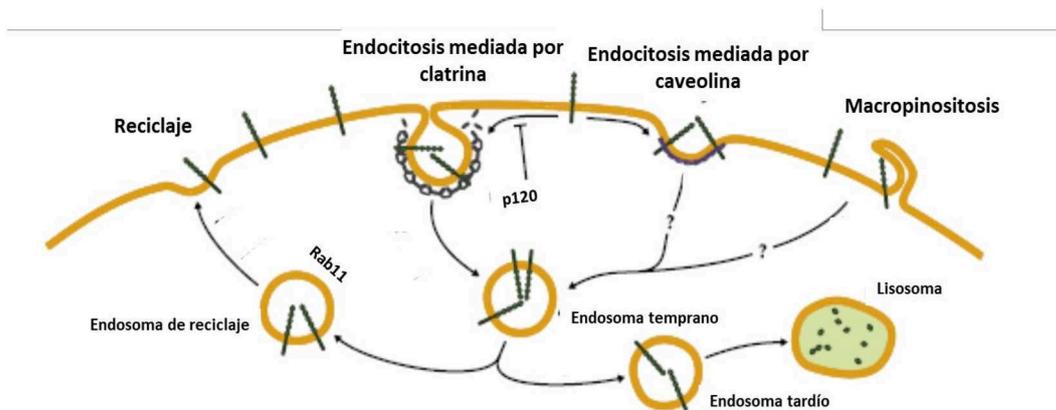


Figura 11. Vías de endocitosis de cadherina E. La internalización de cadherina E puede producirse a través de vesículas mediadas por clatrina, por caveolina o las vías de macropinocitosis. La cadherina internalizada se clasifica para la degradación lisosomal o para su reciclaje a la membrana plasmática. Galetto, 2016.

4.5.2. Rol de las GTPasas pequeñas

Las uniones adherentes mediadas por cadherina E generan señales intracelulares. Entre las más importantes, se destacan las que involucran a las GTPasas pequeñas (Braga y Yap, 2005; Samarin y Nusrat, 2009; Watanabe y col., 2009). La formación de UAs modula a las GTPasas pequeñas RhoA, Rac1, Cdc42 y Rap1y, a la vez, éstas controlan los procesos de adhesión mediados por cadherina E en la biogénesis epitelial. Este grupo de moléculas actúa a través de sus efectores, los cuales modulan tanto la polimerización como la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina y el tráfico vesicular. Adicionalmente, están involucradas en el establecimiento de la polaridad epitelial.

La superfamilia de GTPasas Ras (por sus siglas en inglés: *rat sarcoma*) tienen la capacidad de unir e hidrolizar GTP a GDP, determinando su estado funcional: activo (unido a GTP) e inactivo (unido a GDP) (Figura 12C), actuando como interruptores moleculares (Barbacid, 1987; Etienne-Manneville y Hall, 2002). Esta superfamilia consta de varias familias con un alto grado de similitud estructural y funcional (Figura 12A y B) (Vetter y Wittinghofer, 2001). A la fecha, se han identificado unas 150 en mamíferos, clasificadas en 5 familias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran.

La activación de estas proteínas es mediada por estímulos variados, que actúan sobre factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, por sus siglas en inglés: *guanine nucleotide exchange factors*), que promueven el intercambio de GDP por GTP.

El estado activo de las GTPasas pequeñas permite que estas proteínas se unan a efectores y propaguen señales intracelulares (Figura 12B) (Fukata y Kaibuchi, 2001; Ridley, 2001; Benitah y col., 2004; Jaffe y Hall, 2005). Ya que la actividad GTPasa intrínseca es débil, requieren la interacción con proteínas activantes de GTPasas para volver a su estado inactivo (GAP, por sus siglas en inglés: *GTPase activating proteins*), las cuales facilitan la hidrólisis de GTP a GDP. Adicionalmente, la superfamilia de GTPasas puede poseer otro nivel de regulación que implica inhibidores específicos de disociación del GDP (GDI, por sus siglas en inglés *GDP dissociation inhibitors*), que se unen a GTPasas inactivas manteniéndolas en este estado en el citosol (Figura 12C). Los distintos GEFs y GAPs poseen un perfil de especificidad con cada miembro de las

Tabla 1. Resumen de reguladores GEFs y GAPs que intervienen en la regulación de distintas GTPasas que actúan a nivel de las UAs.

GEFs	GTPasa	Referencias bibliográficas
TIAM	Rac1	Hordijk, 1997; Lampugnani y col., 2002; Kraemer y col., 2007
C3G	Rap1	Hogan y col., 2004
GAPs	GTPasa	Referencias bibliográficas
ARHGAP12	Rac1	Matsuda y col., 2008; Gentile y col., 2008
Rich	Cdc42	Wells y col., 2006; Citi y col., 2011
SPA-1	Rap1	Noren y col., 2001; Bustos y col., 2008; Ratheesh y col., 2012
p190RhoGAP	RhoA	

Sin embargo, tanto el modo, como el estado de activación de cada una de estas GTPasas continúan siendo tema de debate, ya que los resultados son materia de controversia y varían según los sistemas experimentales considerados.

Como se ha dicho previamente, a partir de su activación las GTPasas pueden regular el citoesqueleto de actina asociado a las UAs en dos niveles: por un lado actuando sobre el ensamblaje/desensamblaje de los clústeres de cadherina en las UAs y por otro, controlando su movilidad lateral en la membrana (Figura 13).

Las UAs epiteliales maduras están asociadas con un citoesqueleto bien desarrollado (Zhang y col., 2005; Cavey y col., 2008) que experimenta un continuo recambio (Yamada y col., 2005; Kovacs y col., 2011). Por lo tanto, la actina se debe ensamblar de forma continua para reponer el *pool* de filamentos en la unión. La etapa crítica de este proceso es la nucleación, la cual es mediada por moléculas específicas, incluyendo el complejo Arp2/3 (Pollard y col., 2000) y los miembros de las forminas (Goode y Eck, 2007). En este sentido, se ha reportado la activación vía las proteínas WASP/WAVE del complejo Arp2/3 como respuesta a Rac1 o Cdc42 activadas (Insall y Machesky, 2009).

Adicionalmente, muchos miembros de la familia de las forminas poseen dominios de unión a RhoA, cuyo reclutamiento permite su activación directa (Otomo y col., 2005; Goode y Eck, 2007). Si bien ambos procesos de nucleación han sido implicados en la función de las cadherinas, el papel de RhoA y sus efectos potenciales sobre el ensamblaje de los filamentos de actina son menos claros. Esta GTPasa también estaría involucrada en la activación de la miosina II del anillo contráctil de actomiosina, produciendo su contracción (Utech y col., 2005; Samarin y col., 2007; Vicente-Manzanares y col., 2009).

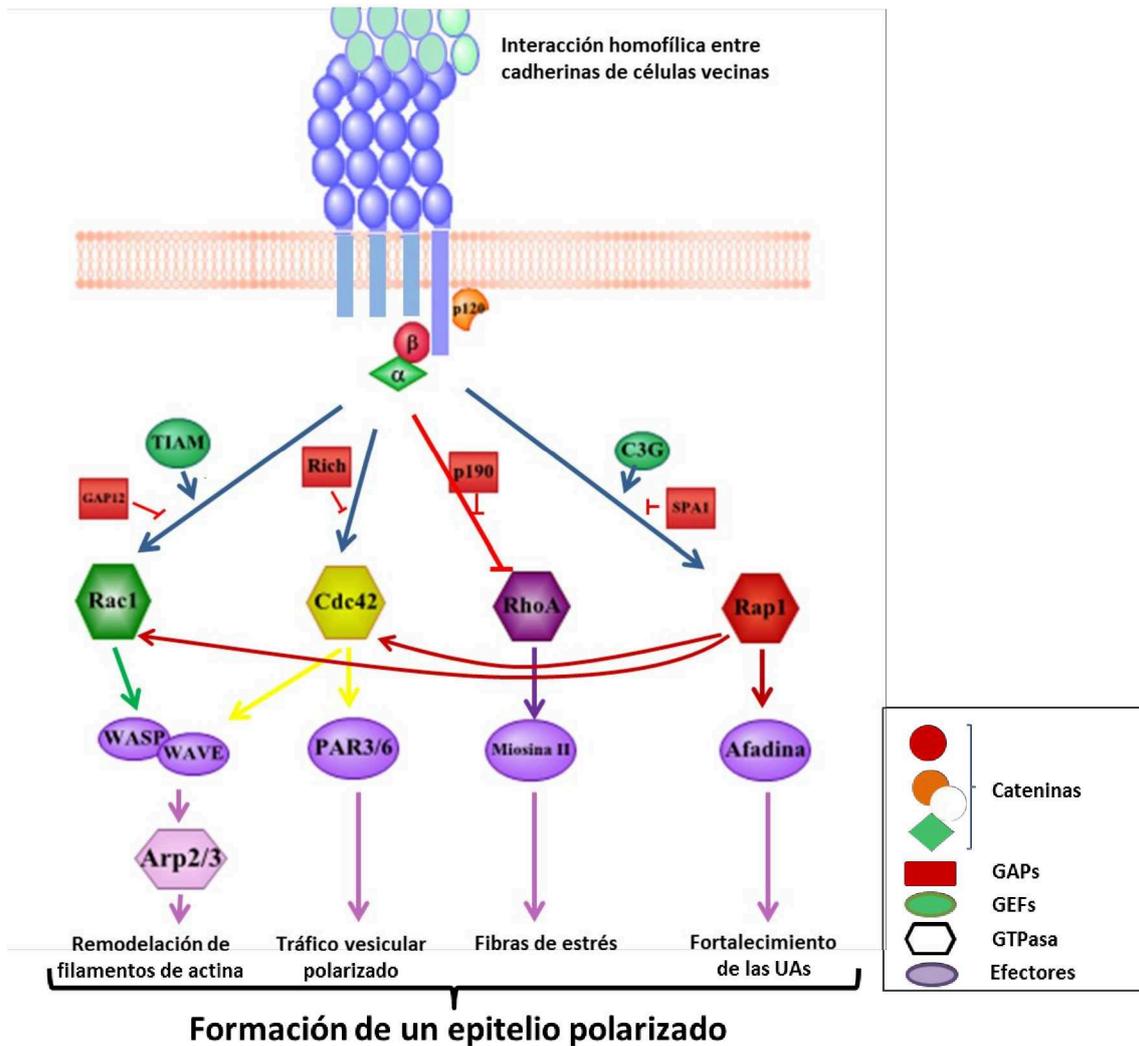


Figura 13. Regulación de las GTPasas pequeñas por el complejo de UAs. Diagrama esquemático que ilustran las principales proteínas y vías involucradas en la regulación Rac1, Cdc42, RhoA y Rap1 en las uniones de las células epiteliales. Las flechas indican la interacción física/funcional, la activación o la promoción al reclutamiento en la unión. Líneas con barra indican inhibición.

Adicionalmente al rol de las GTPasas pequeñas modulando el establecimiento y mantenimiento de las UAs a través de la organización del citoesqueleto, numerosos estudios las vinculan actuando sobre los complejos de polaridad apical de los epitelios. Se ha establecido un rol clave de las proteínas del complejo apical Par (Par 3/Bazooka, aPKC y PAR6) y del complejo Crumbs en la determinación del dominio apical de las células epiteliales. Notablemente, las interacciones entre estos módulos apicales junto con los complejos que definen los dominios basolaterales (los complejos Scribble y Yurt), generarían zonas de exclusión mutua alrededor de las UAs, definiendo el eje apicobasal característico de un epitelio polarizado (Assémat y col., 2008).

Adicionalmente, estos complejos cooperan con la formación de las UAs completamente diferenciadas (Müller y Wieschaus, 1996) y correctamente posicionadas (Harris y Peifer, 2005). Una vez que se han establecido UAs estables, Cdc42-GTP junto a los componentes de los complejos apicales Par y Crumbs regularían el tráfico de componentes de las UAs y proteínas de polaridad apical; función que adquiere especial importancia en tejidos que sufren constante remodelación (Harris y Tepass, 2008). El complejo Par y Cdc42 también han sido implicados en la regulación de RhoA en las UAs (Warner y Longmore, 2009), apoyando una señalización bidireccional entre GTPasas y proteínas del complejo apical.

Adicionalmente, se sabe que Rac1 y Cdc42 activadas por las interacciones homofílicas de cadherina E, inhiben su endocitosis, con lo que estabilizan las UAs (Le y col., 1999; Izumi y col., 2004).

Si bien ha sido la menos estudiada, Rap1 ha evidenciado tener un rol crítico tanto en la formación *de novo*, como en la regulación dinámica de uniones célula-célula (Pannekoek y col., 2009). Esta GTPasa, una vez activada, actúa sobre sus efectores afadina (Boettner y col., 2000) y Rac1/Cdc42 (Sato y col., 2006). Este comportamiento, sugiere que Rap1 es parte de un sistema de retroalimentación positiva que involucra la familia Rho de GTPasas, que promovería el establecimiento de la adhesión célula-célula basada en cadherinas y nectinas, pero no su mantenimiento (Hogan y col., 2004; Fukuyama y col., 2005; Dubé y col., 2008).

4.5.3. Regulación transcripcional de los componentes de la unión

La regulación de las uniones celulares se da en múltiples niveles, que van desde el control de la expresión génica a modificaciones postraduccionales que regulan la presencia superficial, por tráfico o clivado. La mayoría de estos mecanismos de regulación han sido extensamente estudiados; sin embargo, desde hace algunos años nuestro grupo ha puesto especial interés en un aspecto escasamente abordado, la regulación hormonal de la expresión génica de las moléculas que componen las UAs. Por tal motivo, el desarrollo de esta tesis se ha focalizado en el efecto de dicha regulación a nivel transcripcional, tanto de los componentes de las UAs, como de algunas de las moléculas intervinientes en las cascadas intracelulares desencadenadas por la formación de dichas uniones. En este sentido, ha resultado de gran interés,

avanzar en la comprensión de los mecanismos que intervienen en dicha regulación, por lo que durante el desarrollo de este trabajo se aportarán nuevos e importantes hallazgos sobre este tópico.

Cadherina E está codificada por el gen CDH1 (Yagi y Takeichi, 2000), el cual se transcribe como un único ARN mensajero (ARNm) que luego es traducido a un precursor que se procesa para dar lugar a la proteína madura (Figura 7). Uno de los contextos en los que la regulación transcripcional de cadherina E ha sido más estudiada, es la transición epitelio-mesénquima. Este es un proceso reversible del desarrollo, que permite a poblaciones de células epiteliales perder sus características, para adquirir las de células mesenquimáticas y migratorias, para establecer nuevos tejidos epiteliales. Los rasgos típicos de tal transición son la pérdida de la polaridad y de las UAs, originando un reordenamiento del citoesqueleto y el aumento de la motilidad celular. Esta transición aumenta notablemente en situaciones patológicas como la progresión del cáncer, cuando las células adquieren propiedades migratorias e invasivas.

La regulación negativa de cadherina E se ha descrito en múltiples tipos de carcinomas (cánceres de origen epitelial) y durante la progresión tumoral (Yoshiura y col., 1995; Matsumura y col., 2001; Li y col., 2001; Nojima y col., 2001; Reinhold y col., 2010). Su represión transcripcional es un signo de mal pronóstico para múltiples tipos de carcinomas epiteliales (Siitonen y col., 1996; Paul y col., 1997; Dunsmuir y col., 2000), ya que se asocia tanto con los procesos de invasión (Berx y col., 1995; Christofori y Semb, 1999; Matsumura y col., 2001), como de metástasis (Paul y col., 1997; Nass y col., 2000). Se han reportado múltiples factores individuales que regulan la expresión de cadherina E en uno u otro tipo de cáncer (Yoshiura y col., 1995; Richards y col., 1999; Hiraguri y col., 1998; Matsumura y col., 2001; Li y col., 2001; Nojima y col., 2001; Tsutsumida y col., 2004; Reinhold y col., 2010). La pérdida de expresión y/o función de cadherina E, ha sido asociada a distintos mecanismos regulatorios, entre ellos la represión transcripcional. Los factores que intervienen en tal represión pertenecen a la familia de “dedos de zinc” como Snail, E12/E47 y SIP1 y a la familia hélice-bucle-hélice, como Twist y Slug. Estos últimos se unen a las cajas “E” (“E-box”) (Cano y col., 2000; Batlle y col., 2000) del promotor de cadherina E, reprimiendo su expresión (Berx y col.,

1996; Graff y col., 2000; Cleton-Jansen, 2002; Strathdee, 2002; Vandewalle y col., 2005; Peinado y col., 2007). La represión iniciada por Snail, se mantiene por la acción de los represores Zeb (1 y 2) (Guaita y col., 2002; Beltran y col., 2008; Hugo y col., 2011), que a su vez pueden ser reprimidos por micro ARNs durante la transición epitelio-mesénquima (Korpál y col., 2008). Además los cambios epigenéticos como la metilación CpG del promotor, resultan en el silenciamiento a largo plazo de la expresión génica (Berx y col., 1998; Reinhold y col., 2010).

En el caso de β -catenina, la información existente también ha sido obtenida de modelos de cáncer. Así, estudios *in vitro* han revelado que en células de cáncer colorrectal, β -catenina actúa como factor de cotranscripción de su propio promotor (Bandapalli y col., 2009). Por otro lado, en cáncer de pulmón se han encontrado evidencias que vincularían al represor Kaiso y a p120 como represores o inductores de la transcripción de β -catenina, dependiendo de la línea celular y de las isoformas de p120 involucradas. Si predomina la actividad represora de Kaiso, el silenciamiento del gen de β -catenina aumenta la migración y metástasis, debido a una disminución de los contactos adhesivos (Liu y col., 2009, 2014). Por otro lado, en modelos *in vivo* no patológicos se ha determinado que el gen de β -catenina posee sitios de unión a receptores de hormonas tiroideas que actúan como inductores de su transcripción (Plateroti y col., 2006).

Es sabido que diversas señales, tales como factores de crecimiento y hormonas (Blaschuk y Farookhi, 1989; Choi y col., 1990; Farookhi y col., 1997; Al Moustafa y col., 1999; Izaguirre, 2003; Larsson y col., 2004; Boccelino y col., 2005; Izaguirre y col., 2008), serían responsables de regular la formación y funcionamiento de las UAs mediadas por cadherinas. Entre las señales hormonales, se ha probado que las hormonas tiroideas son potentes reguladores del crecimiento y la diferenciación epitelial (Poluektov, 1964; Fujieda y col., 1993; Lopez-Barahona y col., 1995; Meng y col., 2001; Wang y col., 2002; Gentile y col., 2006). Éstas son capaces de regular la transcripción de genes blanco, a través de la unión a su receptor específico (RT) (Sap y col., 1986; Weinberger y col., 1986).

En el año 2003, nuestro grupo demostró mecanismos de regulación positiva sobre los niveles de cadherina E, β - y α -catenina en el epitelio estomacal, durante el desarrollo

de *Rhinella arenarum* que fueron tratados con hormona tiroidea 3,5,3'-triiodotironina (T3) exógena (Izaguirre, 2003). Dichas observaciones se extendieron al tejido renal durante la ontogénesis de esta especie (Izaguirre y col., 2008), mostrando su control morfo genético dependiente de T3.

En función de la necesidad de información en relación con la regulación hormonal a nivel transcripcional, no sólo de las moléculas que forman parte del complejo adherente, sino también de sus moléculas reguladoras, el objetivo del presente estudio fue comenzar a determinar el rol de los principales actores de la ruta de señalización de las UAs mediada por cadherina E, que son disparadas por la hormona T3, evaluando su impacto sobre los niveles de los distintos transcritos implicados en el incremento regionalizado de la expresión de cadherina E, requerido tanto para la polarización celular, como para formación y mantenimiento de las uniones adherentes.

Para llevar adelante la presente tesis se ha seleccionado un modelo *in vivo*, lo que le confiere un valor intrínseco, dado que la mayoría de los antecedentes sobre este tópico se han logrado a partir de sistemas *in vitro*, cuya posibilidad de interpretación y extrapolación a organismos se ve fuertemente restringida. El sistema seleccionado es el estómago larval de anfibios anuros, dado que el mismo sufre una extensa remodelación sistemática y coordinada durante la metamorfosis, bajo el control desencadenante de prácticamente un único factor, la hormona T3.

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

5.1. Hipótesis

Como hipótesis principal de este trabajo se postuló que durante la metamorfosis, las hormonas tiroideas constituyen los principales inductores de la expresión génica de las moléculas constitutivas de las uniones adherentes y de un conjunto de GTPasas pequeñas que promueven la formación de complejos cadherina E–cateninas–citoesqueleto y la consecuente activación de la vía de señalización de las GTPasas pequeñas, produciendo el reclutamiento de nuevas cadherinas en la membrana y el establecimiento de la polaridad del epitelio del tubo digestivo.

5.2. Objetivo general

Demostrar la necesidad del reclutamiento de cadherina E en la membrana inducido por las hormonas tiroideas, para el establecimiento de la polarización y diferenciación epitelial del tracto digestivo.

5.3. Objetivos particulares

1. Demostrar que cadherina E y β -, α -catenina y p120-catenina, son genes de respuesta temprana al estímulo desencadenado por la hormona T3.
2. Determinar la incidencia de T3 sobre las UAs, la polarización y diferenciación epitelial del tracto digestivo.
3. Comenzar a establecer las vías de activación transcripcional de las GTPasas pequeñas en la diferenciación del sistema estudiado.
4. Establecer si la respuesta final de esta ruta de señalización, involucra síntesis *de novo* y/o modulación del reciclaje de vesículas endocíticas de cadherina E en el sistema estudiado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

RHINELLA ARENARUM

Las larvas fueron obtenidas por fecundación *in vitro*. Para tal fin fueron seleccionados machos y hembras sexualmente maduros. La ovulación de las hembras fue inducida por inyección intraperitoneal de 2.500 UI de Gonadotropina Coriónica Humana (Endocorion® de Elea, Buenos Aires, Argentina). Al comienzo de la liberación de los primeros ovocitos, aproximadamente a las 12 hs posteriores a la inyección, las hembras fueron desmeduladas y los cordones ovígeros fueron extraídos del ovisaco y depositados en cajas de Petri con solución Holtfreter (Holtfreter, 1931). Los embriones fueron obtenidos fecundando los ovocitos con homogenatos frescos de tejido testicular, los cuales fueron incubados en la misma solución a 20 ± 2 °C (Rengel y col., 1988). Los distintos estadios embrionarios fueron seleccionados y mantenidos en solución fisiológica Holtfreter, en acuarios apropiados a 20 ± 2 °C, fotoperíodo 12L:12O. La clasificación de los estadios embrionarios y larvales fue realizada conforme la clasificación de Gosner (1960). Cuando los embriones alcanzaron el estadio larval 26 (st 26) fueron transferidos a acuarios con agua artificial de laboratorio (AAL: pH 6,86; conductividad 149 ohms^{-1} ; 66,6 ppm de CaCO_3 ; 4,8 ppm Ca^{+2} ; 7,2 ppm Mg^{+2} ; concentración de O_2 disuelto 5,5 mg/l) y alimentados con lechuga hervida. El AAL fue renovada semanalmente.

La condición de los embriones fue cuidadosamente analizada, eliminándose los ovocitos no fecundados y los embriones que mostraron malformaciones o retrasos marcados. Los ejemplares adultos en condiciones reproductivas óptimas fueron capturados en la región o adquiridos en un proveedor autorizado.

XENOPUS LAEVIS

Las larvas y juveniles fueron adquiridos de un proveedor autorizado (Liquanfish Acuario, Buenos Aires, Argentina). La clasificación de los estadios larvales se realizó conforme Niewkoop y Faber (1967).

Las larvas y juveniles fueron mantenidas en acuarios apropiados con AAL a 20 ± 2 °C, fotoperíodo 12 L:12 O, hasta que alcanzaron los estadios necesarios para realizar los ensayos que se detallan a continuación.

6.2. Inducción de la metamorfosis de *Rhinella arenarum* y *Xenopus laevis* por agregado exógeno de hormona tiroidea T3

Las inducciones fueron realizadas en larvas premetamórficas (*R. arenarum*, st 33 y *X. laevis* NF53), debido a que a partir de estos estadios se sintetizan los receptores TR α , pero no la hormona T3 endógena. Por lo tanto, el efecto de inducción a la metamorfosis es exclusivo de la hormona exógena agregada. Los experimentos fueron realizados a densidades de 10 larvas/litro para *R. arenarum* y de 5 larvas/litro para *X. laevis*. Los períodos de inducción fueron realizados a 20 ± 2 °C, confotoperíodos 12 L:12 O y con renovación diaria de la solución de 3,3',5-triiodotironina (T3). Dicha solución fue preparada a partir de 3,3',5-triiodo-L-tironina sódica (T2752, derivado sintético, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178, USA). Los puntos muestrales fueron:

Control inicial (st33/NF53): Larvas premetamórficas sin tratamiento, muestreo realizado al comienzo del ensayo.

Control final (st46/NF66): Larvas sin tratamiento, mantenidas en AAL hasta el final de su metamorfosis espontánea.

T3x24hs: Larvas tratadas con una solución de 3,3',5-triiodotironina (T3) en AAL de 5nM para *R. arenarum* y de 7,5 nM para *X. laevis*, durante 24 hs.

T3x5d: Larvas tratadas con una solución acuosa de 3,3',5-triiodotironina (T3) en AAL de 5nM para *R. arenarum* y de 7,5 nM para *X. laevis*, durante 5 días.

Cada bioensayo fue realizado por quintuplicado, empleando 10 animales en cada réplica. De cada punto experimental, fueron extraídos los ARNs totales de los tubos digestivos disecados (8 de los 10 animales de cada réplica) y procesados inmediatamente para realizar los estudios de expresión génica. Los animales restantes fueron fijados (Carnoy y Karnosky) y procesados para realizar los estudios de microscopía.

En la **Figura 14** se esquematizan el diseño experimental y los puntos muestrales.

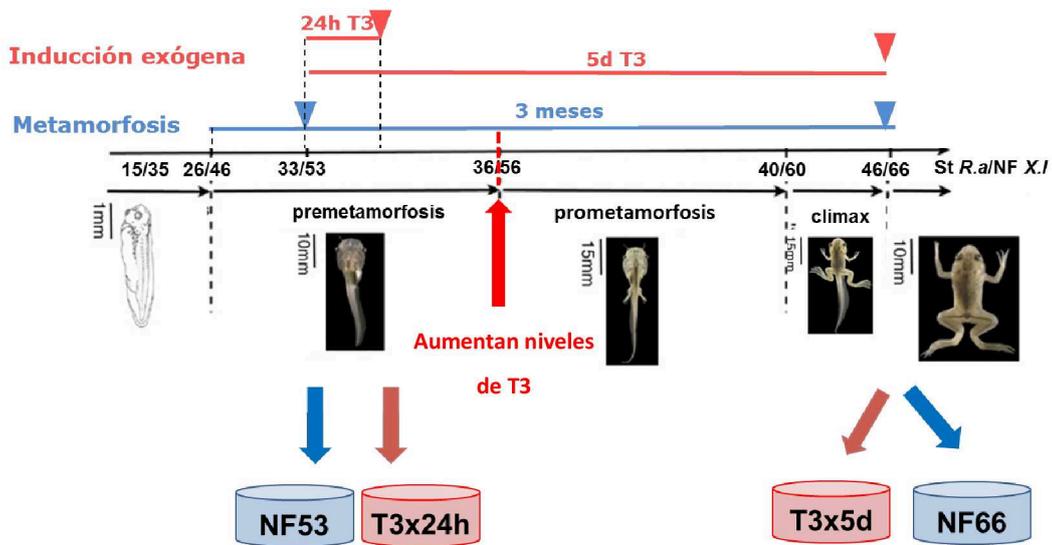


Figura 14. Esquema del diseño experimental aplicado. Se muestra la escala de estadios de desarrollo de *R. arenarum* y *X. laevis* y los cambios morfológicos dependientes de T3 más notables. Para los ensayos de inducción se tomaron larvas premetamórficas en estadio 33/53 (línea roja), es decir previo a la síntesis endógena de T3 (flecha roja) y se las sometió en grupos separados al tratamiento hormonal durante 24h y 5 días. Se tomaron muestras controles del inicio (st33/NF53) y final (st46/66) (celestes); y de los tratamientos (T3x24h y T3x5d) (rosado).

6.3. Determinación de los parámetros anatómicos de crecimiento larval

Los parámetros determinados sobre animales vivos e inmovilizados fueron: longitud total de los animales (LT), que comprende la distancia que va desde la boca al extremo de la cola; longitud de cabeza + tronco (LCTr), que es la distancia que se extiende desde la boca al borde posterior de la cloaca; longitud de la cola (LCo), que abarca desde el borde posterior de la cloaca al extremo de la cola; longitud de las extremidades posteriores (LMP) y los valores relativos de LMP/LCTr y LCo/LCTr. Estas dos últimas relaciones fueron establecidas, debido a que los valores absolutos de tamaño varían en las distintas cohortes, mientras que los valores relativos correspondientes a los distintos estadios de desarrollo metamórfico mantienen un alto grado de uniformidad (Etkin, 1968). Como indicadores de la remodelación craneal se midieron las distancias interoculares (Dist. IO) y entre las narinas y el bulbo olfatorio (Dist. N/BO) (Figura 15).

Los parámetros de crecimiento de los animales fueron registrados tanto al comienzo (st33/NF53) como al final de la inducción de 5 días (T3x5d). Para ello, cada uno de los animales de cada punto experimental fue fotografiado y a partir de estos registros,

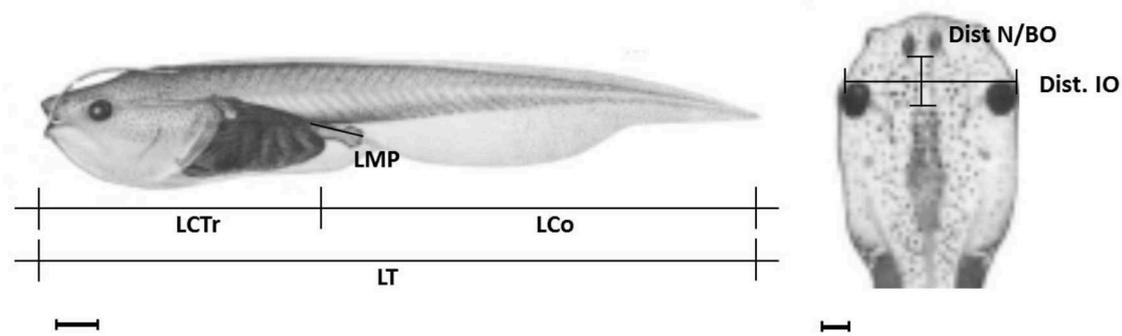


Figura 15. Imágenes señalando los parámetros anatómicos de crecimiento larval evaluados para corroborar los efectos del tratamiento hormonal. Barras = 1 mm.

fueron realizadas las mediciones utilizando el *software* ImageJ 1.47 (Schneider y col., 2012).

6.4. Técnicas de microscopía

6.4.1. Análisis histológico de la región fúndica del estómago

El análisis morfológico de la región fúndica de los estómagos de *X. laevis* tratados con hormona tiroidea durante los distintos períodos (24 hs y 5 días) y su comparación con los controles, fueron conducidos para evaluar el efecto de T3 y los posibles cambios en la estructura de dichos tejidos. Los estudios estructurales por microscopía óptica directa fueron realizados para correlacionar las observaciones morfológicas con los eventos moleculares que acompañan estos fenómenos. Para el análisis de dicha estructura en *R. arenarum* se utilizaron los antecedentes de Izaguirre (2003).

Los animales completos de cada punto experimental fueron fijados por inmersión en solución fijadora Karnovsky 3% en *buffer* fosfato 0,1M, pH 7,4 durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez fijados los tubos digestivos completos fueron disecados y posteriormente definidas las porciones del estómago a estudiar, basados en su posición respecto al hígado, al páncreas y al conducto biliar, el cual está ubicado en la zona de transición entre el estómago y el intestino. Finalmente, en la zona media correspondiente al *fundus* (zona de seccionamiento indicada con línea punteada en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.22**) fueron realizados los cortes transversales al eje del tubo. Estos segmentos fueron posteriormente lavados en *buffer* fosfato salino (PBS 1X), posfijados en solución acuosa de tetróxido de osmio

(OsO₄) 2%, durante 2 hs a temperatura ambiente y lavados cuatro veces con agua destilada. A continuación las muestras fueron deshidratadas en una serie acetónica (Cicarelli®, Bs. As., Argentina) de concentraciones crecientes (50%, 75%, durante 5 minutos cada uno; 90%, 10 minutos y 3 pasos de acetona 100%, durante 15 minutos cada uno). Los tejidos, fueron preincluidos en acetona/Araldita 6005 (Ladd Research Industries®, Williston, EEUU) (1:1) por 3 horas a temperatura ambiente seguidos de dos preinclusiones en resina pura, por 3 horas y durante toda la noche a 4 °C. La inclusión final fue realizada en resina recién preparada y los bloques fueron curados durante 24 horas a 60 °C. Los segmentos estomacales fueron seccionados en sentido transversal al eje del tubo, cada 0,5 µm de espesor con un ultramicrotomo Reichert Ultracut-S y montados sobre portaobjetos limpios. Las secciones semifinas fueron teñidas con azul de toluidina (Merk®, Darmstadt, Alemania) durante 1 minuto en platina calefaccionada y las imágenes fueron observadas con un microscopio directo Olympus BX-50 y registradas con una cámara CCD Apogee, modelo AM4 (sensor de 768x512 pixeles², con una resolución de 14 bits) usando un acople provisto de una lente 1X.

6.4.2. Estudios morfométricos ultraestructurales de las uniones intercelulares del epitelio gástrico

El análisis ultraestructural de la región fúndica del estómago fue realizado con el objetivo de comprender la dinámica de las UAs durante la metamorfosis inducida por T3. A partir de las secciones semifinas de ésta región (Ver sección 6.4.1), fueron seleccionadas las regiones en las que se observó el epitelio superficial cilíndrico simple y las restantes capas características del estómago. A partir de esas regiones fueron realizados los cortes ultrafinos (70 nm de espesor) transversales al eje de estómago, mediante un ultramicrotomo Reichert Ultracut-S y montados sobre grillas de cobre. Las secciones ultrafinas fueron teñidas con acetato de uranilo 2% durante 5 min a temperatura ambiente y luego con citrato de plomo 0,75% durante 30 segundos. Las imágenes fueron registradas con un microscopio electrónico de transmisión Philips EM300. Para el muestreo, las regiones apicales del epitelio del fundus fueron recorridas sistemáticamente, registrándose todas las zonas de unión intercelular, desde el lumen hasta los desmosomas. De cada región fúndica fueron obtenidas

secciones en dos regiones distintas. De cada una de ellas fueron adquiridas 10 micrografías digitales a una magnificación de 20.000X. De cada registro, fueron definidas la presencia y ubicación de los complejos de uniones intercelulares en la zona apical; esto es, las uniones estrechas seguidas de las uniones adherentes y por último los desmosomas. Las mediciones de las longitudes y distancias intermembrana de cada complejo, fueron realizadas mediante el *software* ImageJ 1.47 (Schneider y col., 2012). En el caso de las distancias intermembrana fueron realizados y promediados tres registros a distintos niveles de la unión.

6.5. Estudios Moleculares

6.5.1. Obtención de secuencias nucleotídicas de *Rhinella arenarum*

Dado que al momento de realizar esta tesis no existían datos de secuencias nucleotídicas o proteicas de las moléculas de interés en *R. arenarum*, se analizaron las secuencias conocidas de los genes de cadherina E y β -catenina en otras especies, con el objetivo de diseñar cebadores que permitan obtenerlas para los posteriores estudios de expresión génica.

Para esto, a partir de la base de datos del NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] fueron obtenidas las secuencias codificantes completas de ambas moléculas en 8 especies de vertebrados (*Homo sapiens*; *Mus musculus*; *Rattus norvegicus*; *Gallus gallus*; *Xenopus laevis*; *Xenopus tropicalis*; *Danio rerio* y *Bos taurus*). Éstas fueron sometidas a alineamiento múltiple utilizando el *software* T-coffee [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/t-coffee/index.html>]. Basados en las regiones de mayor conservación de las secuencias fue realizado el diseño manual de los cebadores, tomando como referencia las secuencias de *X. laevis* y cubriendo toda la región codificante. Los principales parámetros establecidos consistieron en longitudes óptimas de 20 a 22 bases, Tm óptimas entre 60 y 62 °C. Para evitar la dimerización y la formación de estructuras secundarias, todos los cebadores diseñados fueron analizados mediante el *software* OligoAnalyzer 3.1 [<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>]. Las características de cada uno de los pares de cebadores diseñados se resumen en la **Tabla 2**.

Los ARN totales fueron extraídos a partir de los tejidos larvales del estómago. Las muestras fueron trozadas y homogeneizadas con tijera y mini pilón de teflón estériles, con el agregado del reactivo TriZol® (Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) y de acuerdo a los procedimientos indicados por el proveedor. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en 50 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), libre de nucleasas.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en reacciones de amplificación de PCR

Especie	Primer	Secuencia 5'→3'	Producto (pb)
<i>Rhinela arenarum</i>	Cadherina E – Fo1	AGAGACTGGGTGATTCCACC	664
	Cadherina E – Rv1	CTGGAGGATTATCGTTAGTGTC	
	Cadherina E – Fo2	ATCGACAACAACCTGCTACAGC	685
	Cadherina E – Rv2	AGACAAGGGTCCAGTCCC	
	Cadherina E – Fo3	TAATCCTGGCTGCTGACAGTG	540
	Cadherina E – Rv3	CTTCTGGAGGTAGTAAAGGCTC	
	β -catenina – Fo1	GATCTAATGGAGCTGGACATGGC	584
	β -catenina – Rv1	CGAACTATAGCAGACACCATCTG	
	β -catenina – Fo2	TGCTTAATGACGAGGACCAGG	624
	β -catenina – Rv2	CTAAAGCTTGCATTCCACCAGC	
	β -catenina – Fo3	GAGAACTTCTGTGGACCAC	679
	β -catenina – Rv3	ACTGCTGTTGTGTTCCACC	
	β -catenina – Fo4	GTTCAAGTGTGTTGTTCCAGC	735
	β -catenina – Rv4	CAAGTCAGTGTCAAACCAGGC	
GAPDH – Fo	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	496	
GAPDH – Rv	GTCCACCACCTGTTGCTGTAG		
<i>Xenopus laevis</i>	rpl8 – Fo	CGTGGTCTCCTCTTGCCAAG	577
	rpl8 – Rv	GACGACCAGTACGACGAGCAG	
	RT β – Fo	GGACATTGGACAAGCTCCCA	197
	RT β – Rv	ACATGATCTCCATACAACAGCCTTT	
	FABP – Fo	CTTGGAACTTTCACCAGGAA	306
	FABP – Rv	TTGACATTCAGGAACCACA	
	Cadherina E – Fo	CGGATACACCTCCAGAAGGA	225
	Cadherina E – Rv	GCACAGAGCCTTCAAAGACC	
	β -catenina – Fo	AGATGCAGCAACTAAACAGGA	290
	β -catenina – Rv	GTAAGTGCATTTGAGCCATCT	
	α -catenina – Fo	CAGAGGATGACCAGCTTATTG	390
	α -catenina – Rv	GGCAGTACAAGGCAATTCT	
	p120 – Fo	CACTCGCTGATCACTTAACC	322
	p120 – Rv	GCAGCACGTATCTCTCTTTC	
	occludina – Fo	GTGTGTGGCTTCAACTCTAC	319
	occludina – Rv	GAAGACCAGGCCTCCTATAA	
	ZO1 – Fo	GGGAAACCTCTATTGTCATCTC	263
	ZO1 – Rv	AGGCACATCCTCCTCATAA	
RhoA – Fo	GACATGGCAAACCGTATCT	200	
RhoA – Rv	CCCAGAGGAGTATGGGAATA		
Rac1 – Fo	GTCCAACACTCCCATTATC	258	
Rac1 – Rv	GCCGACATCTTCTTTTCTC		
Rap1 – Fo	CTAGCCAGACAGTGGGAATAAC	394	

Rap1 – Rv	CAGGAAGCATTGACACAATATG	
cdc42 – Fo	CTATCCACAGACAGACGTGTT	359
cdc42 – Rv	GCAGCATACACTTGCGTTT	
ARHGEF18 – Fo	CCATTGTTCCGGTCCCTAAAT	293
ARHGEF18 – Rv	GAAGCCATCTGCGTCATAG	
TIAM – Fo	GGCGAAGACCACTCTTATTT	266
TIAM – Rv	GAGTTCAGCGTGGAGTTATT	
C3G – Fo	TGTCACCACTCACTACATACA	305
C3G – Rv	GTCGTCGCCTTCACATAAC	
FRG – Fo	TCAGCCCAAACCGAAATC	376
FRG – Rv	CCTGCTCACTACTCAAGAAAG	
p190RhoAGAP – Fo	CCGAAGGACCACTAAGAAAG	322
p190RhoAGAP – Rv	CGGTAGCTCAGAGAAGAAAC	
ARHGAP12 – Fo	CTTTGCCGTCTCGTTTCT	289
ARHGAP12 – Rv	GAGTGAGTAGAAGTCCGTTTG	
SPA1 – Fo	GCTCGTGACCATGTTACTAC	474
SPA1 – Rv	GTCTCACAACCACCAGATAC	
Rich – Fo	CCCAACATACAGAAGCAGAG	440
Rich – Rv	GTCTCCAGCAGCATCATTAC	
PGGT1 – Fo	GCAAACCTGGAGGAGGTATTT	310
PGGT1 – Rv	ATGCCAGGCTCTCTATAA	
Arp2 – Fo	GCAATACGGGAATAGGGAAG	253
Arp2 – Rv	GGGTTGGACACATGATACAG	

La concentración y pureza de los ARNs fueron establecidas determinando la absorbancia a 260 y 280 nm, utilizando una dilución 1:300 de la solución, en un espectrofotómetro de doble haz (Biochrom Libra S11; Biochrom Ltd, Cambridge-Reino Unido) y calculando la relación Abs260/280. Sólo fueron empleadas muestras de ARN total que presentaron una relación de Abs260/280 de 1,8 a 2,0. La concentración del ARN fue determinada, empleando la absorbancia a 260 nm y aplicando la regla de conversión convencional, donde cada unidad de absorbancia a dicha longitud de onda corresponde a una concentración de ARN de 40 µg/µL.

La verificación de la calidad del ARN extraído (y el descarte de aquellas preparaciones que presentaron degradación y contaminación con ADN genómico) fueron realizadas usando electroforesis en geles nativos de agarosa 1,5%. Las muestras fueron sembradas y la electroforesis fue realizada con solución de corrida TAE 1X a 60 volts, durante 40 minutos y posteriormente a 100 volts por 40 minutos adicionales.

El ADN copia (ADNc) fue sintetizado a partir de los ARNs presentes en las muestras de ARNs totales, mediante una transcriptasa reversa. Brevemente, en cada caso fueron retrotranscritos 5µg de ARNs totales utilizando cebadores oligo(dT) y el sistema comercial de transcripción reversa *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas,

Vilnius, Lituania), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El ADNc fue almacenado a -20°C hasta su uso. Con cada reacción fue realizado un control positivo de la transcriptasa reversa (RT+), para corroborar el correcto funcionamiento del sistema. Para ello, la reacción fue desarrollada con todos los reactivos utilizando como molde el ARNm de la GAPDH humana (1,3 Kb), provisto por el sistema comercial, el cual también provee los cebadores específicos para la PCR. También fue realizado un control negativo sin molde (CSM), con el objetivo de verificar que los reactivos no estuviesen contaminados. Finalizada la reacción, los productos fueron empleados directamente para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Por último, fueron realizadas las PCRs, para cada uno de los cebadores diseñados y los del gen constitutivo (GAPDH) utilizado como control interno de cada reacción. Dichas reacciones fueron realizadas a volúmenes finales de 25 μL . La mezcla consistió del *buffer* de reacción 10X (Tris-HCl 100mMpH 8,8; KCl 500mM y Nonidet P4008%), 0,8 mM de cada desoxirribonucleótido; 2 μM de cada cebador, 1,25 U de ADN polimerasa Taq (Fermentas, Vilnius, Lituania), MgCl_2 2 mM y 5 μL de ADNc. Los volúmenes finales fueron completados con agua tratada con DEPC. Una vez mezclados los componentes, los tubos fueron termociclados variando las temperaturas en función de las características de los cebadores y de los productos esperados. Las condiciones estándar de amplificación pueden resumirse en: un paso de desnaturalización inicial a 95°C , 5 min, seguido de un número variable de ciclos de desnaturalización (95°C , 30-60 seg), hibridación (T_m de cada cebador -2°C , por 30 seg) y elongación (72°C , 60 seg). El proceso finalizó con la elongación final (72°C , 10 min).

Para verificar la posible contaminación de los reactivos fueron realizados los controles negativos, incubando todos los componentes excepto el ADNc, que fue reemplazado por 1 μL de agua libre de ribonucleasa. La contaminación con ADNs genómicos fue controlada realizando PCRs en las que se utilizaron ARNs totales como molde.

La detección y cuantificación de los productos de PCR fue realizada en geles de agarosa al 2,5% en buffer TAE, colocando alícuotas de 5 μL de cada una de las reacciones de PCR con 1 μL de buffer de carga en cada pocillo. Para la determinación del tamaño de los fragmentos obtenidos, fueron usados marcadores de peso molecular comerciales (*Ladder* de 50pb de PB-L Productos BioLógicos, Buenos Aires, Argentina). La corrida

electroforética fue realizada a 50 volt por 90 minutos. Las bandas fueron visualizadas adicionando a la agarosa fundida, 0,8 μ L de BrEt 0,3 μ g/mL. Las observaciones fueron realizadas en el transiluminador UV (310 nm, SPECTROLINE TE-312S, Westbury, EEUU) y las imágenes capturadas con una cámara fotográfica (Cannon G12, Nakatsugawa, Japón) montada sobre el sistema de cámara oscura del transiluminador, para su posterior análisis.

Los fragmentos de ADNc (de los tamaños adecuados y sin contaminantes) fueron purificarlos a partir de 25 μ L de la reacción de PCR, utilizando el sistema comercial Wizard SV Gel y PCR Clean-up System (Promega, Madison, EEUU), procediendo según las indicaciones del fabricante. Los ADNc purificados fueron almacenados hasta su uso a -20°C.

Los fragmentos obtenidos y purificados por RT-PCR a partir del ARNt de *Rhinella arenarum* (correspondientes a β -catenina y GAPDH) fueron secuenciados en ambas direcciones utilizando el Analizador Genético 3130xl (Applied Biosystems, LifeTechnologies Corporation, CA, EE.UU.), utilizando los mismos cebadores que en la reacción de PCR.

6.5.2. Determinación de la expresión génica por RT-*sq*PCR a tiempo final

Los niveles de expresión de los genes a estudiar fueron determinados mediante la técnica de RT-*sq*PCR. Como gen de referencia fue utilizado el de la proteína ribosomal 8 (*rlp8*) (*X. laevis*). El ADNc fue obtenido por transcripción reversa de una muestra de ARN total y luego fue amplificado por PCR, utilizando los cebadores específicos de cada gen a estudiar. Para cada par de cebadores (Tabla 2), fueron optimizados la temperatura de hibridación, la concentración de los cebadores y el número de ciclos. Las condiciones de amplificación fueron seleccionadas de tal manera que ninguna de las muestras analizadas alcanzase la fase de meseta al finalizar el programa de la PCR. Los productos de amplificación obtenidos para cada uno de los pares de oligonucleótidos (incluyendo *rlp8* como gen constitutivo) fueron recogidos cada tres ciclos, a partir del ciclo 25 hasta el ciclo 34. Para el análisis de cada reacción fueron utilizadas las señales de amplificación obtenidas a partir de la fase exponencial. Los productos de las PCRs fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y fotografiados con una cámara Cannon G12 (Nakatsugawa, Japón)

montada sobre un sistema de cámara oscura sobre el transiluminador UV (310 nm, SPECTROLINE TE-312S, Westbury, EEUU), para su posterior análisis.

La extracción del ARN total de cada muestra fue realizada a partir de 9 tubos digestivos, cada uno de los cuales fue disecado bajo lupa en condiciones de esterilidad y mantenidos en nitrógeno líquido hasta completar las muestras requeridas. La metodología empleada para la extracción fue la misma que la detallada en la sección anterior. Los ARNs obtenidos fueron purificados mediante el equipo *GeneJET RNA purification* (Thermo Scientific®, Vilnius, Lituania), siguiendo las instrucciones del proveedor. Finalmente, los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en 50 µL de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC), libre de nucleasas.

La determinación de la calidad y concentración del ARN, RT-PCR y las electroforesis, la visualización y registro de los productos obtenidos en la PCR, fueron realizados como se detalló en la sección 6.5.1.

La cuantificación de las bandas de los geles fue realizada a partir de las imágenes digitalizadas mediante el *software* ImageJ 1.47. Cada banda a cuantificar fue enmarcada con un rectángulo de tamaño fijo. Posteriormente, en la opción del menú “*Analyze*”, fue seleccionado el submenú “*Measure*” y mediante esta herramienta fue obtenida la intensidad promedio de la banda, proceso que fue repetido con ambas bandas de cada calle. Los valores obtenidos de los genes en estudio fueron referenciados con los del control interno.

6.6. Estudios bioinformáticos

6.6.1. Análisis de las secuencias de *Rhinella arenarum*

Los archivos con las secuencias obtenidas en el proceso de secuenciación fueron cargados en el programa Applied Biosystems Secuencia escáner v1.0™ (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, EE.UU.), donde fueron ensamblados y editados. El marco abierto de lectura fue ubicado con el programa Chromas Pro 1.41 (Copyright © 2003-2004, Technelysium Pty. Ltd.).

Las secuencias de nucleótidos y las de aminoácidos fueron analizadas mediante los programas BLASTN 2.2.25 (Zhang y col., 2000) y BLASTp 2.2.25 (Altschul y col., 2005),

respectivamente. La presencia de motivos y dominios proteicos fue analizada utilizando el *software* InterProScan: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>.

6.6.2. Análisis *in silico* de los genes evaluados

Para profundizar el conocimiento del/los mecanismo/s molecular/es que intervendría/n en la regulación de la expresión génica mediada por T3, fue realizado un análisis *in silico* sobre las secuencias de los genes objeto de estudio. Si bien los datos de expresión génica permiten sugerir que los genes se encuentran regulados por T3, no es posible discriminar si tal regulación ocurre en *cis* o en *trans* (ya sea que T3 forme parte de un complejo de transcripción o que regule la expresión de otro factor de transcripción).

Dado que el abordaje experimental para dilucidar estos aspectos de la regulación génica resultan muy lentos y costosos, se han desarrollado diversas técnicas bioinformáticas para predecir la ocurrencia de sitios de unión de factores de transcripción (TFBS, *Transcription Factor Binding Sites*) en regiones regulatorias. Una de las estrategias más difundidas, consiste en generar modelos matemáticos que representen los patrones de variación de las secuencias TFBSs conocidos experimentalmente y empleados para predecir la ocurrencia de dichos sitios en secuencias regulatorias de los genes de interés. Así, en este trabajo fueron aplicadas representaciones de los TFBSs conocidas como Matrices de Peso por Posición (PWM, *Position Weight Matrices*), las cuales se construyen a partir del alineamiento de las secuencias de sitios determinados experimentalmente (Stormo y col., 1982). Estas matrices poseen una dimensión de $4 \times L$, donde L es la longitud del patrón de nucleótidos reconocido por el factor de transcripción y cada posición tiene asignado un puntaje para cada uno de los posibles nucleótidos (4) que pueden ubicarse en dicha posición. Dada una secuencia de ADN, estas matrices se alinean sobre cada posible subsecuencia de longitud " L " a las cuales se les asigna un puntaje total, de acuerdo a los individuales que les corresponden para cada posición de la matriz. El puntaje asignado por la PWM para una subsecuencia en particular, es dependiente de la longitud del motivo y del patrón de secuencia particular con valores máximos y mínimos dependientes de cada matriz. Los estudios teóricos basados en la termodinámica estadística y posteriormente corroborados por evidencias empíricas,

muestran que una PWM correctamente construida, asigna puntajes que correlacionan adecuadamente con la afinidad química entre el factor de transcripción y el sitio de unión (Berg y von Hippel, 1987; Stormo y Fields, 1998).

En la herramienta INSECT (Rohr y col., 2013), dada una PWM, el puntaje que se le asigna a una subsecuencia se normaliza de acuerdo a los valores mínimos y máximos acotados entre el intervalo [0-1]. En éste, el valor 1 corresponde a una subsecuencia de máxima afinidad por un factor de transcripción en particular, decreciendo a medida que el puntaje relativo tiende a 0.

En esta tesis fue utilizada la versión INSECT 2.0 (Parra y col., 2016), tanto para construir la matriz PWM (tomando como entrada los sitios experimentalmente determinados por Das y col. (2009), como para buscar los potenciales sitios de unión a T3 en los genes de interés. La matriz generada fue aplicada para buscar TFBSs, tanto en sentido directo como reverso complementario, fijando como valor de corte, que la afinidad relativa teórica de la PWM fuese mayor o igual a 0,8 (80% del valor máximo posible). Debido a que experimentalmente se ha observado que los sitios de unión de T3 en *Xenopus laevis* son sitios compuestos por dos submotivos separados por 4 pb para cada uno de éstos fueron generadas PWMs independientes. Para que ambos motivos fuesen válidos, fue fijada la restricción de que se encuentren a distancias menores o iguales a 4 pbs y en el mismo sentido relativo (es decir, ambos en sentido directo, o ambos en sentido reverso complementario). Para trabajar únicamente con aquellos sitios que se encuentran separados por exactamente 4 pbs, los sitios obtenidos fueron posteriormente filtrados mediante secuencias de comandos (*scripts*) en Perl.

Las secuencias genómicas de los genes de interés fueron descargadas de la base de datos de Xenbase y analizadas sólo aquellas correspondientes a la región génica propiamente dicha y las primeras 5 kpb corriente arriba.

6.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico fue utilizado el programa SPSS 19.0 (International Business Machines Corp. (IBM) Armonk, NY. EE.UU.) y Excel para *Windows 7* (Microsoft®, Redmond, Whashington, EE.UU.). Las variables fueron analizadas para normalidad con el test de *Shapiro-Wilks* y la homogeneidad de las diferencias entre los grupos fue

comprobadamediante el test de *Levene*. La media \pm SE de los valores para la evaluación de los parámetros anatómicos fue calculada a partir de datos de los animales utilizados para este propósito. Las diferencias entre los valores de los parámetros anatómicos de los animales control y aquellos tratados con la hormona durante 5 días, en caso de cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, fueron analizadas mediante la prueba *t-Student*; encaso contrario, fue aplicado el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las diferencias de $p \leq 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

Para el análisis estadístico de la expresión génica, se calcularon los cambios relativos de acuerdo a Gassmann y col., (2009) y Fay y Gerow, (2013).

En la presente tesis, los valores experimentales de los tratamientos fueron relacionados con los del control del experimento. Para analizar si los cambios relativos mostraban diferencias estadísticamente significativas, fue considerado que para cantidades relativas normalizadas, el error compuesto, debe reflejar la variación en las repeticiones de medición de la molécula de interés y los genes de referencia, tanto en el grupo tratado como en el control, así como la incertidumbre sobre la eficacia estimada de la PCR, junto con la propagación correcta de todos los valores de error (Hellemans y col., 2007). La significatividad estadística de los datos fue calculada en base a los intervalos de confianza de los cambios relativos de expresión, respecto del grupo control. Para ello, en primer lugar fueron calculados los promedios, desviaciones y errores estándar para cada grupo control (control inicial-NF53 y control final-NF66) y para cada grupo de tratamientos (T3x24 hs y T3x5d). Estos datos fueron luego normalizados mediante un estimador, que resulta de dividir el promedio de cada tratamiento, por el promedio del grupo control inicial-NF53 (ecuación 1). Para el cálculo de los intervalos de confianza del estimador, fue calculado previamente su error estándar mediante una fórmula desarrollada en Excel (Fay y Gerow, 2013) (ecuación 2). Por último, en base a los errores estándar obtenidos fueron calculados los intervalos de confianza de los estimadores (95%). Los histogramas con los valores de los estimadores de cada tratamiento y para el control final (NF66) fueron graficados mediante el *software* SigmaPlot 3.0 (Systat Software Inc. (SSI), San Jose, California, EE.UU.), las barras de error fueron definidas con los valores calculados para el

intervalo de confianza. En los casos en que el intervalo excluyó al valor 1, fueron consideradas como diferencias significativas.

$$Estimador = \frac{\text{nivel de ARNm en grupo tratado}}{\text{nivel de ARNm en grupo control inicial}} = \frac{num}{den} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$SE (estimador) = \left(\frac{num}{den}\right)^2 \sqrt{\left(\frac{SE(num)}{num}\right)^2 + \left(\frac{SE(den)}{den}\right)^2 - \frac{2cov(num,den)}{num \times den}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde, $cov(num, den) = corr(num, den) \times SE(num) \times SE(den)$

7. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se han dividido en dos secciones, la primera correspondiente a los obtenidos utilizando como modelo animal a *Rhinella arenarum* (Hensel) y la segunda, con los obtenidos utilizando la rana africana con garras (*African clawed frog*) *Xenopus laevis* (Daudin, 1802).

7.1. *Rhinella arenarum*

Para evaluar el rol de las moléculas de adhesión celular a nivel molecular durante el proceso de remodelación del tejido epitelial gástrico, se planteó analizar los posibles cambios en los niveles de expresión de cadherina E y β -catenina durante este proceso. Dicho objetivo presentó la dificultad de trabajar con un modelo experimental cuyo genoma es prácticamente desconocido. Al presente, sólo fueron registradas en bases de datos internacionales, 29 secuencias de esta especie, entre las cuales no se encuentran las moléculas objeto de estudio de esta tesis. Por lo tanto, para estudiar el efecto de T3 sobre sus niveles transcripcionales, primero se debían aislar y caracterizar (al menos parcialmente) sus genes.

7.1.1. Obtención y análisis de la secuencia de nucleótidos de los genes bajo estudio

Para obtener las secuencias de nucleótidos de los genes de *R. arenarum*, en primer lugar se realizó el análisis bioinformático de las regiones codificantes de los ARNm de ambas moléculas en diferentes especies de vertebrados y con distintos grados de relación filogenética (*Homo sapiens*, NM_001098209.1; *Mus musculus*, NM_007614.2; *Rattus norvegicus*, NM_053357.2; *Gallus gallus*, NM_205081.1; *Xenopus laevis*, NM_001090576.1; *Xenopus tropicalis*, C_scaffold_24000163; *Danio rerio*, NM_131059.2 y *Bos taurus*, NM_001076141.1). Con los datos obtenidos en estos estudios, se escogieron las regiones codificantes más conservadas entre las especies, las que fueron utilizadas para el diseño manual de un conjunto de cebadores sobre las secuencias de *X. laevis* cubriendo las regiones codificantes completas. Se diseñaron tres pares de cebadores para cadherina E y cuatro pares de cebadores para β -catenina. Para la puesta a punto de la técnica, se trabajó con fracciones de troncos completos de larvas de *R. arenarum* y se realizó la coamplificación del gen bajo estudio con un gen de control interno, en este caso, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

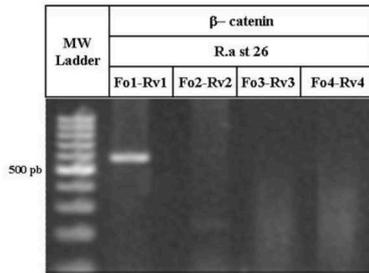
Luego de ensayar distintas condiciones de reacción y combinaciones de cebadores, se obtuvo un amplicón de 584 pb para β -catenina, a partir del par de cebadores indicados como Fo1-Rv1. En el caso de cadherina E, no se logró la amplificación con ninguno de los pares de cebadores empleados, en ninguna de las condiciones ensayadas. Los fragmentos de β -catenina y del control interno de GAPDH (490pb) se purificaron y secuenciaron (Figura 16B). El fragmento obtenido para la GAPDH de *R. arenarum*, se analizó tanto con BLASTn como conBLASTp. Esta secuencia de ADNc mostró un alto grado de conservación entre especies, como así también la secuencia de aminoácidos predicha a partir de ella (Tabla 3). El fragmento secuenciado codifica para la región que abarca los aminoácidos 161 a 323, la cual corresponde al dominio C-terminal clásico de las GAPDH (denominado Gp_dh_C - pfam02800).

Tabla 3. Análisis bioinformático de la secuencia obtenida de GAPDH de *R. arenarum*

Especie	% identidad en nucleotídos	% de identidad en AA
<i>H. sapiens</i>	99	100
<i>B. taurus</i>	91	96
<i>R. novergicus</i>	90	94
<i>M. musculus</i>	90	95
<i>X. laevis</i>	78	86
<i>X. tropicalis</i>	79	86

Para la β -catenina de *R. arenarum*, se obtuvo la secuencia de un fragmento de 539 pb, el análisis de esta secuencia exhibe un alto grado de similitud con la región codificante de β -catenina de *X. laevis* que comprende el segmento que va desde la posición 289pb a 825 pb. Los resultados de los alineamientos, local (BLASTn) y múltiple (T-Coffee), de la secuencia obtenida demostró que ésta codifica para un homólogo de β -catenina de vertebrados, exhibiendo 86% y 85% de identidad con las de *X. tropicalis* (BC135469.1) (no mostrado) y *X. laevis* (NM_001090576.1) respectivamente (Figura 16B y C). Los valores de identidad obtenidos entre la secuencia de *R. arenarum* y el resto de las secuencias de vertebrados analizadas, confirma la elevada conservación del fragmento de β -catenina obtenido (70% con *Gallus gallus*; 78% con *Danio rerio* y superior al 81% con *Bos taurus*, *Rattus novergicus* y *Mus musculus*).

A)



B)

Rhinella arenarum β -catenin (539 pb)

CAATGGAGCCGGATCGGAAAGCGGCCGTCACTGAGCAGCAGCTTATCTGGATTCTGGAATCACTCTGGAGCTACCACTGCCCA
TCTCTTAGTGGGAAGGAAATCCAGACGAGGAAGATGTGGATACATCCAAAGTACTGTATGAATGGGAACAGGGCTTCTCTCAGCCTTCACTCA
AGATCAAGTGGCAGATATTGATGGGCAGTTTGAATGACCAGAGCCCAGAGGGTGCAGCGGCCATGTTTCTGAAACACTAGATGAAGGCATG
CAAATCCCTCCACACAGTTGACTCTGCTCATCTACAATGTGCAGCGCTGGCCGAACCTTCACAGATGCTGAACATGCTGTGGTCAACTTG
ATAAACTACCAAGATGATGCTGAATTGGCTACTCGGGCTATTCTCTGAGCTAACAAAACCTTAATGATGAGGACAGGTTGTGGTTAACAAAGCT
CGGTTATGTTTCATCAGTTGTCAAAGAAGGAAGCTTCCCGCCATGCTATTATGCGTTCTCCA

Rhinella arenarum GAPdH (451 pb)

GTATCGTGGAAAGACTCATGACCAAGTCCATGCCATCCTGCTACTGCGCTGCCAAGGCTGTGGCAAGGTCATCCCTGAGCTAACGGGAAGCTCACTGGCATG
CGGGCTCTCCAGAACATCATCCTGCTCTACTGCGCTGCCAAGGCTGTGGCAAGGTCATCCCTGAGCTAACGGGAAGCTCACTGGCATG
GCCTCCGCTGCCCACTGCCAACGTGTGAGTGGTGCACCTGACCTGCCGTCTAGAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGA
GCAGCGCTCGGAGGGCCCTCAAGGGCATCTGGGCTACTGAGCACCAGGTGGTCTCTCTGACTTCAACAGCGACCCCACTCTCCACC
TTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCATTGTCAAGCTATTCTCTGATGACAACGAATTGG

C)

```
>ref|NM_001090576.1| UG Xenopus laevis catenin (cadherin-associated protein), beta 1,
88kDa (ctnnb1-b), mRNA
gb|BC082826.1| UG Xenopus laevis beta-catenin protein, mRNA (cDNA clone MGC:79992
IMAGE:6865915), complete cds
Length=3445

GENE ID: 399274 ctnnb1-b | catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
[Xenopus laevis] (Over 10 PubMed links)
Score = 603 bits (668), Expect = 4e-169
Identities = 456/537 (85%), Gaps = 0/537 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 3 ATGSAGCCGGATCGGAAAGCGGCCGTCACTGAGCAGCAGCTTATCTGGATTCT 62
Sbjct 289 ATGSAGCCAGACCGAAAGGCAGCAGTGAAGCCACTGSCAGCAGCAGTCTTACCTGSA 348

Query 63 GGAATTCACCTCTGAGCTACCACTGCCCCATCTCTTASTGSGAAGSAAATCCAGAC 122
Sbjct 349 GSGATTCATTTCTGAGCAACCCACAGCACCATCTTTGAGTGGCAAAGSAAACCCAGAG 408

Query 123 GAGSAAAGATGTGATACATCCCAAGTACTGTATGAATGSGAACAGSSCTTCTCTCAGCCT 182
Sbjct 409 GATGAAAGATGTGATACCAACCAAGTTTGTATGAGTGGGAGCAGSSCTTCTCTCAGTCC 468

Query 183 TTCCTCAAGATCAAGTGGCAGATATTGATGSSCAGTTTGCATGACCAGAGCCAGAGS 242
Sbjct 469 TTCCTCAAGATCAAGTGGCTGATATTGATGSSCAGTATGCCATGACAAGAGCCAGCGA 528

Query 243 GTGCGAGCGGCCATGTTTCTGAAACACTAGATGAAGGCATGCAAATTCCTCCACACAG 302
Sbjct 529 GTTCGTGCTGCAATGTTCCAGAAACCCCTTGATGAAGGCATGCAATTCATCCACACAA 588

Query 303 TTTGACTCTGCTCATCTACAAATGTGCAGCGCTTGGCCGAACTTTCACAGATGCTGAAA 362
Sbjct 589 TTTGACTCTGCACACCCAAACAAATGTGCAACGTTTAGCAGAGCCTTCCAGATGCTCAA 648

Query 363 CATGCTGTGCTCAACTTGATAAACTACCAAGATGATGCTGAAATGGCTACTCGSSCTATT 422
Sbjct 649 CACGCTGTGCTCAACTTGATCAATTACCAGGATGATGCTGAAATGGCCACTCGAGCAATC 708

Query 423 CCTGAGCTAACAAAACCTGCTTAAATGATGAGGACCAAGGTTGTGGTTAACAAAAGCTGCGSTT 482
Sbjct 709 CCCGAGCTGACGAAACTGCTTAAATGACGAGGACCAAGGTTGTAGTTAACAAAAGCTGCTGTA 768

Query 483 ATGSTTCATCAGTTGTCAAAGAAAGGCTTCCCGCCATGCTATTATGCGTTCTCCA 539
Sbjct 769 ATGSTTCACCGAGTGTCAAAGAAAGGCTTCCCGCCATGCTATTATGCGCTCACC 825
```

Figura 16. (A) Productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores diseñados. Se observa la amplificación de un fragmento de 584 pb de β -catenina de *R.arenarum*, a partir del par de cebadores. Gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Escala de PM: 100 pb (Fermentas). *R. arenarum* st. 26. **(B) Secuencias nucleotídicas parciales de los ARNm de β -catenina y GAPdH de *R. arenarum*.** **(C) Comparación con Blastn de las secuencia de β -catenina de *R. arenarum* y *X. laevis*.** El fragmento exhibe un alto grado de identidad (85%) entre las bases 289 y 825 de la región codificante de β -catenina.

Los análisis de la secuencia predicha de 171 aminoácidos que codificaría este

fragmento (Figura 17A) y su comparación con las correspondientes de *X. laevis*, *X. tropicalis*, *B. taurus*, *H. sapiens*, *M. musculus* y *R. norvegicus* muestran un 97% de identidad (Figura 17B). La secuencia incluye casi completamente la región N-terminal y la primera repetición armadillo de β -catenina (aminoácidos 9-185). Ambas regiones son esenciales para mediar las interacciones proteína-proteína, incluyendo el sitio de unión a α -catenina a través del residuo Tyr-142 conservado, los sitios de ubiquitinación/acetilación en las Lys-19 y Lys-49 y un motivo consenso de fosforilación para la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3b). Adicionalmente, se realizó una búsqueda en la base de datos de dominios y superfamilias de proteínas, utilizando el *software* InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>) (Figura 17C). Dicho análisis reveló que el fragmento obtenido presenta una repetición armadillo (según las bases de datos Pfam y Prosite) características típicas de β -catenina. Adicionalmente, cuando la secuencia del fragmento predicho se enfrenta a las bases de datos de superfamilias de proteínas, este es agrupado entre los miembros de la familia β -catenina.

7.1.2. Estudios de inducción

Para estudiar el efecto de la hormona T3 sobre el perfil de expresión de β -catenina, se utilizó un modelo de inducción a la metamorfosis. Renacuajos premetamórficos de *R. arenarum* (st 33) fueron tratados durante 24 horas (T3x24h) y 5 días (T3x5d) a 20 ± 2 °C con 5 nM de T3. Esta concentración se seleccionó como resultado de un preensayo en el que se evaluaron soluciones 1,25; 5 y 10 nM y se determinó que la mínima concentración de hormona T3 necesaria para inducir la metamorfosis, minimizando los efectos hipermetabólicos es 5 nM.

7.1.2.1. Evaluación del modelo de inducción hormonal a la metamorfosis de *R. arenarum*

Para la evaluación anatómica de los modelos de inducción, los tres parámetros utilizados en ésta tesis fueron: la reabsorción completa de órganos larvales, el desarrollo *de novo* de órganos propios del animal adulto y la remodelación parcial de los órganos existentes en los estadios larvales que sufren modificaciones para tornarse funcionales en el animal adulto.

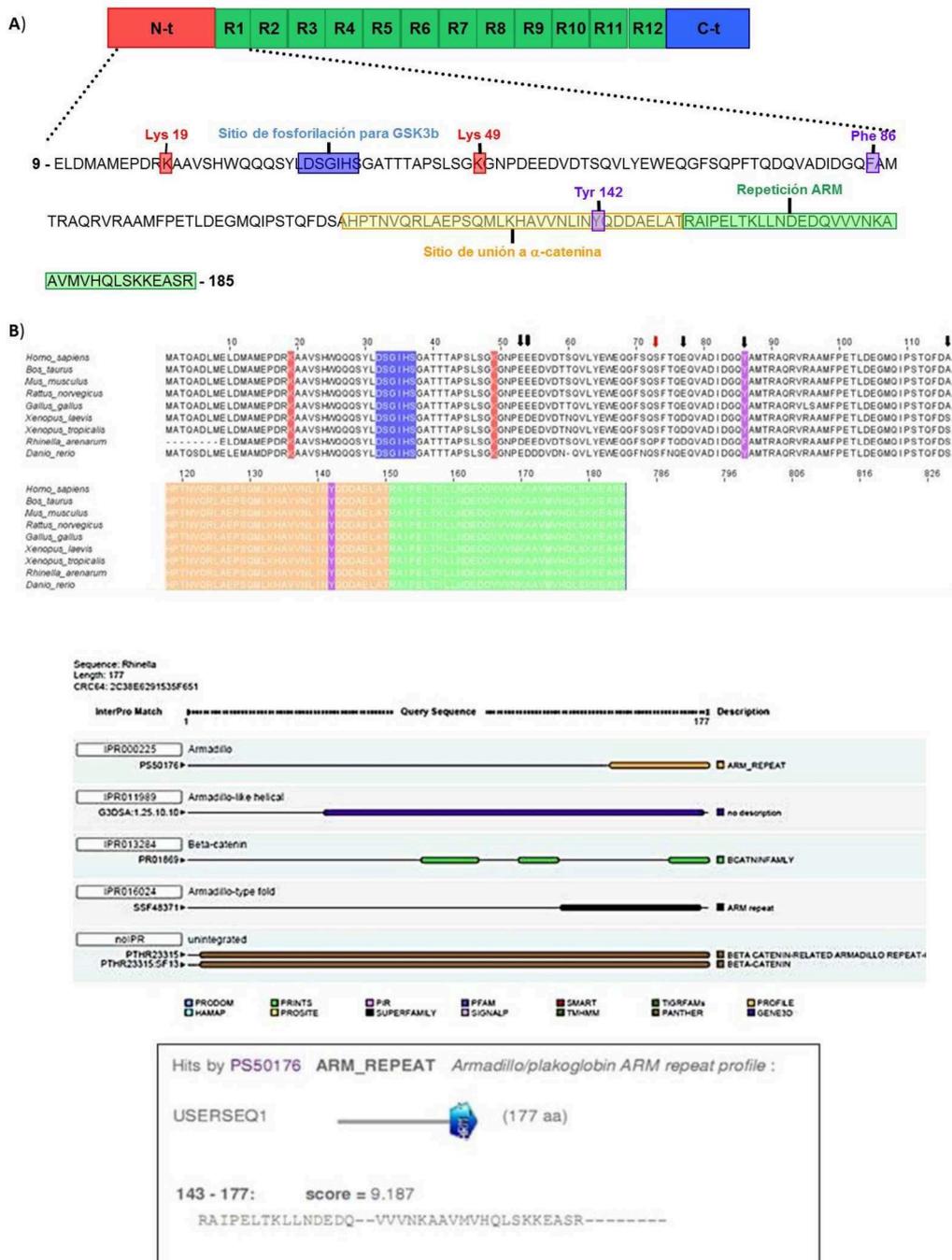


Figura 17. (A) Esquema de la secuencia de aminoácidos deducida a partir del fragmento de ADNc obtenido. La región amplificada corresponde a la secuencia desde el aminoácido 9 a 185, se muestran los residuos y sitios característicos. (B) Alineamiento múltiple entre secuencias proteicas de β -catenina de distintas especies, mostrando la conservación de los sitios característicos. (C) Dominios funcionales de la secuencia.

Para la valoración, de los dos primeros tipos de cambios descritos en el párrafo anterior, se evaluaron principalmente los cambios macroscópicos de las larvas. Cualitativamente mediante el análisis de la morfología mandibular y del grado de

desarrollo de las extremidades posteriores y cuantitativamente mediante la estimación morfométrica de los cambios.

Como puede observarse en la **Figura 18A**, los animales premetamórficos (st 33), exhiben una cabeza y tronco de forma ovoidal, ensanchado en la parte posterior de la región abdominal. El hocico es redondeado y con una leve depresión entre la zona dorsal y la mandíbula, las narinas están desplazadas en el eje antero-posterior desde el margen mandibular anterior hacia atrás.

El tratamiento hormonal provocó una importante remodelación corporal además del desarrollo de las extremidades (**Figura 18D y E**). Se observó una disminución

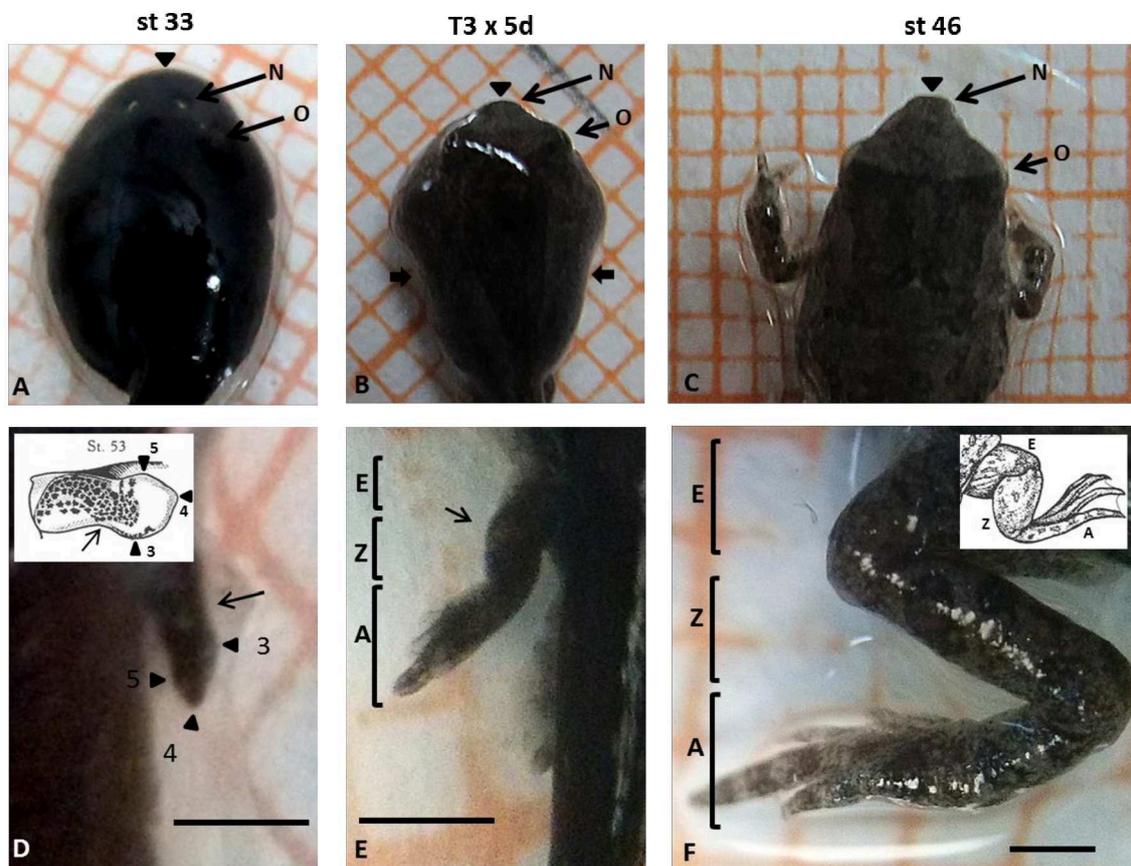


Figura 18. La hormona T3 induce metamorfosis prematura en larvas de *R. arenarum*. Los renacuajos de tipo salvaje fueron tratados en el estadio st. 33 con T3 5nM durante 5 días y se muestran los cambios de la anatomía corporal (A-C) y las extremidades posteriores (D-F). Se observa claramente la remodelación craneal y la protrusión de la mandíbula (cabeza de flecha). Las narinas (N) se ubican más anteriormente respecto del hocico y similar a su ubicación en el st 46 (C y F). Del mismo modo, el crecimiento y morfogénesis de las extremidades posteriores también fueron inducidos por el tratamiento con T3 (D y E). En D se muestran los primordios de los dígitos (3, 4 y 5) y la escotadura (flecha) que origina la división de la extremidad. En (E) se marca la nueva articulación (flecha) y las tres regiones definidas: autopodio (A), zeugopodio (Z) y estilopodio (E). En D y F se observan insertos de esquemas de los miembros en los estadios correspondientes según la tabla de Gosner (1960). Barra = 1 mm.

significativa ($p \leq 0,01$) de la longitud total (LT), de la región de cabeza y tronco (LCTr) y de la longitud de la cola (LCo) de los renacuajos (Tabla 4), siendo la relación LCo/LCTr menor a la calculada para los animales del st33 ($p \leq 0,05$). Si bien el tratamiento no provocó una reabsorción total de la cola, como sucede durante la metamorfosis espontánea, se produjo un acortamiento significativo.

Tabla 4. Medidas morfométricas de *R. arenarum*

	Medidas (mm)					
	LT	LCTr	LCo	LCo/LCTr	LMP	LMP/ LCTr
St33	18 ± 1	7,8 ± 0,5	10,6 ± 0,8	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,10 ± 0,03
T3x5d	15 ± 1**	6,2 ± 0,4**	9 ± 1**	1,5 ± 0,2*	1,6 ± 0,3**	0,26 ± 0,04**

(*) y (**) Indican diferencias significativas respecto al grupo control (NF 52-54), con $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$ respectivamente.

La comparación de las Figura 18A y B, permite observar claramente la remodelación craneal y corporal inducida por T3.

La cabeza adquiere una forma triangular, donde las narinas y los ojos toman una disposición espacial muy similar a la encontrada al final de la metamorfosis (Figura 18A, B y C), respecto del st 33, las narinas se desplazan hacia adelante en el eje antero-posterior; el cuerpo no sólo se acorta, sino que se vuelve más estrecho presentando acotaduras laterales que comienzan a delimitar la cabeza del resto del cuerpo(marcadas con cabezas de flechas en la Figura 18B).

En larvas premetamórficas (st 33), las extremidades posteriores son estructuras cilíndricas de aproximadamente 1 mm de longitud (Figura 18D) que emergen paralelas al eje de la cola. Éstas se originan a partir de la elongación de primordios esferoidales que aparecen alrededor del estadio st28. En la parte más distal de dichas estructuras, se puede observar una región más aplanada en la que se diferencian tres zonas de gemación, correspondientes a los precursores de los dígitos 3, 4 y 5. Por otro lado, se distingue una escotadura (indicada con una flecha en la Figura 18D) que lleva a la diferenciación entre el autopodio y el resto del miembro. Luego de los 5 días de tratamiento hormonal, se observó un aumento muy significativo ($p \leq 0,01$) en la longitud total de las extremidades posteriores, siendo más del doble que la longitud en

el st33. Este tratamiento fue asimismo efectivo en promover el alargamiento y la diferenciación de los 5 dígitos (Figura 18E y F). Adicionalmente, se verificó la correcta formación de la nueva articulación que permite identificar las tres regiones de las extremidades características de vertebrados: autopodio, zeugopodio y estilopodio. Concomitantemente, los miembros cambiaron su disposición paralela al eje de la cola, tomando un ángulo característico de aproximadamente 45°. Los valores relativos de LMP/LCTr de las larvas tratadas con T3 aumentan significativamente, lo que constituye una característica del proceso de metamorfosis, en la que se produce el desarrollo de los miembros, mientras que el tronco se acorta.

Con el objetivo de analizar el efecto de inducción de la hormona sobre la remodelación de los órganos internos, se seleccionó el tubo digestivo y se evaluaron sus cambios anatómicos. Como se puede observar en la Figura 19A, el tubo digestivo larval (st33)

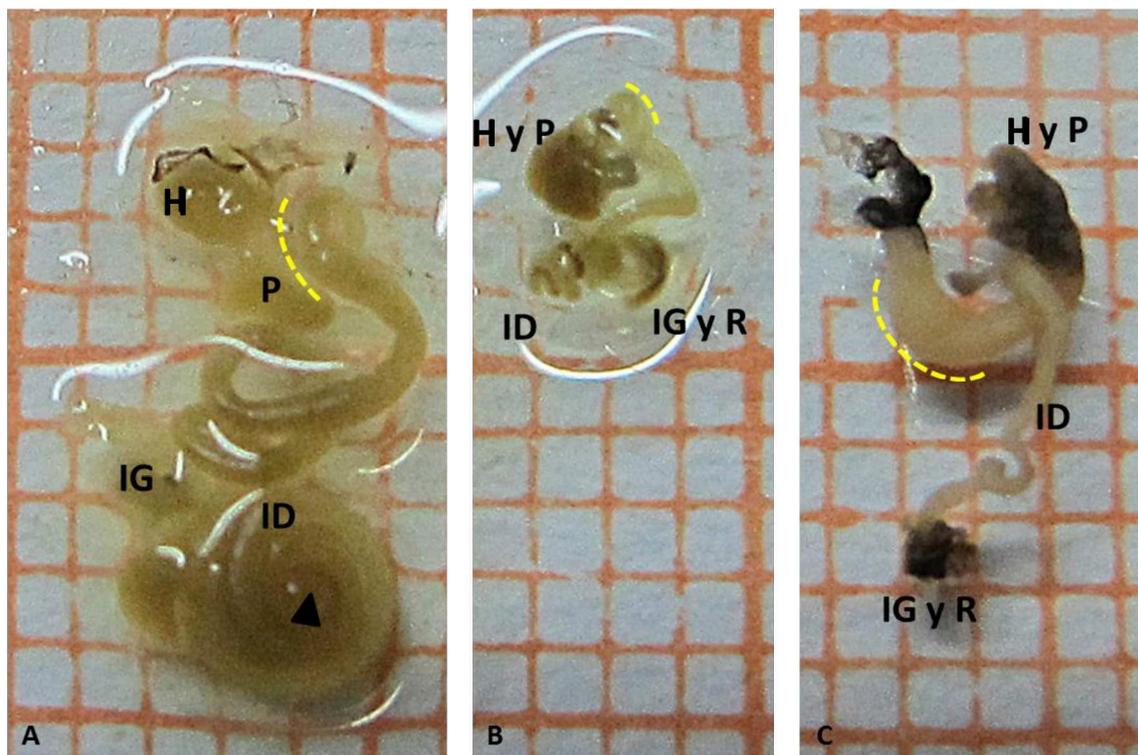


Figura 19. La hormona T3 induce remodelación en el tubo digestivo de *R. arenarum*. En el tubo digestivo se distinguen el esófago, el estómago (marcado con línea amarilla de puntos), el intestino delgado (ID), el intestino grueso (IG), el recto (R), hígado y páncreas. La zona anterior del intestino delgado forma un espiral externo su de dirección invertida a partir del punto de zigzag (punta de flecha), respecto al segundo espiral de la zona media. (A) Tubo digestivo extirpado de un renacuajo premetamórfico (st 33). (B) Tubo digestivo de animal tratado con T3 por 5 días, donde se evidencia una reducción importante de sus dimensiones. (C) Al final de la metamorfosis (st 46), el tubo digestivo se redujo notablemente y el estómago adquirió su tamaño y morfología característica.

posee una estructura tubular uniforme, en cuya zona anterior es muy difícil distinguir el esófago y el estómago, dado a la uniformidad que presenta el tubo. A la zona anterior del tubo, le sigue el intestino pequeño (equivalente al delgado) de forma espiralada, cuya región anterior externa tiene una dirección descendente, invirtiéndose en un punto de zigzag (indicado con la cabeza de flecha en la **Figura 19A**), para formar un espiral interno ascendente y rematando en el intestino grueso y el recto. Esta estructura espiralada desaparece totalmente al finalizar la metamorfosis espontánea (**Figura 19C**), concomitantemente con la drástica reducción de la longitud del intestino. En los animales tratados durante 5 días con hormona T3 (**Figura 19B**), las dimensiones del tubo se reducen notablemente, tanto en diámetro como en largo, si bien no llega a los niveles de disminución observados en animales cuya metamorfosis se produce espontáneamente. A su vez, se distingue en la zona más anterior una región levemente ensanchada correspondiente al estómago larval.

7.1.2.2. Evaluación de la expresión génica de β -catenina en tubo digestivo de *R.arenarum*

Luego de analizar el efecto del tratamiento hormonal sobre la morfología externa de los animales y la anatomía del tubo digestivo, se procedió a evaluar el modelo de inducción a nivel molecular, en particular su efecto sobre los niveles de ARNm de β -catenina. Para ello, renacuajos de *R. arenarum* st 33 fueron tratados con una solución de 5 nM de T3 durante 24 hs y 5 días. Luego se realizó la extracción de ARN total de los tubos digestivos, el cual fue sometido a RT-*sq*PCR para la cuantificación de los transcritos en estudio. En primer lugar se determinó el nivel de expresión de β -catenina respecto al gen de control interno *rlp8* en el estadio inicial del estudio (st 33), registrándose niveles de $0,44 \pm 0,38$ y presentando una gran variabilidad entre muestras, la cual disminuye con la progresión del tratamiento con T3. Luego de 24 hs de tratamiento, la expresión génica aumenta 0,8 veces respecto al grupo control (St 33), indicando una respuesta positiva a la hormona (**Figura 20**). Dicho aumento se mantiene invariable a los 5 días de tratamiento

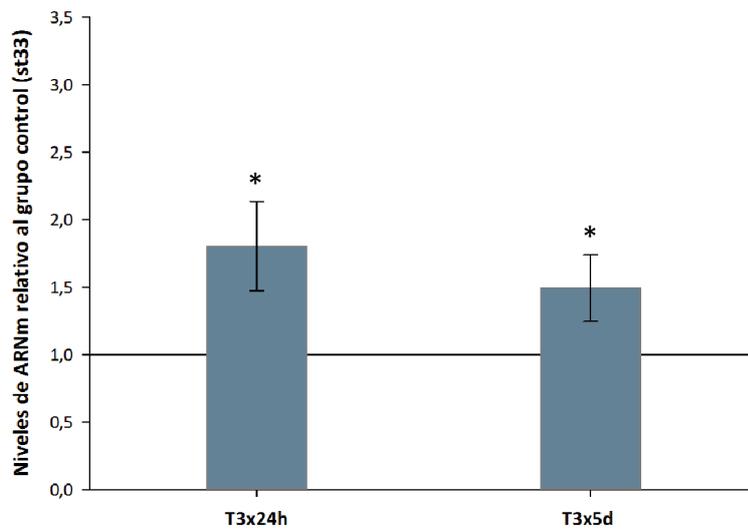


Figura 20. Niveles de expresión génica de β -catenina de *Rhinella arenarum* inducida por T3 exógena relativos al grupo control. Los niveles de ARNm de tubos digestivos completos de larvas de *R. arenarum* tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d). Las determinaciones se realizaron por *sqRT-PCR* y para las normalizaciones se usaron los niveles del grupo control (st 33). El análisis estadístico se realizó calculando el intervalo de confianza del 95% del dato normalizado (barra de error), basado en Fay y Gerow (2013). Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control ($p \leq 0,05$). Rlp8 fue empleado como gen de control interno de cada reacción.

7.2. *Xenopus laevis*

En función de las dificultades para trabajar con *R. arenarum* en el análisis de las distintas moléculas de adhesión descritas previamente, se decidió continuar los estudios sobre los posibles efectos de la hormona T3 en la cascada regulatoria durante la remodelación epitelial y, en particular, conocer el perfil de expresión de todas las moléculas del complejo adhesivo cadherina E/ β -catenina, utilizando el modelo de metamorfosis inducida en *X. laevis*.

Para ello, renacuajos premetamórficos (NF53) fueron tratados durante 24 horas (T3x24h) y 5 días (T3x5d) a 20 ± 2 °C con 7,5 nM de T3, una concentración muy cercana al pico plasmático que se produce durante el clímax metamórfico (Shi y Brown, 1993; *op. cit.* Leloup y Buscaglia, 1977).

7.2.1. Evaluación del modelo de inducción hormonal a la metamorfosis de *X. laevis*

7.2.1.1. Evaluación de los cambios de los parámetros anatómicos e histológicos provocados por T3

Para la valoración de los cambios producidos en este modelo de inducción, se evaluaron en primer lugar los cambios macroscópicos de las larvas. La evaluación cualitativa se realizó mediante el análisis de la estructura mandibular y del grado de desarrollo de las extremidades posteriores, mientras que cuantitativamente se realizó la estimación morfométrica de: LT, LCTr, LCo, LMP y los valores relativos de LMP/LCTr. Además, como indicadores de la remodelación craneal se midieron las distancias interoculares (Dist. IO) y entre las narinas y el bulbo olfatorio (Dist. N/BO). Como puede observarse en la Figura 21A, en animales premetamórficos (NF53) la cabeza es abultada, con la mandíbula en forma de arco característica (recta en su zona media, curvándose levemente en los extremos). Esta forma se debe a que, en este estadio larval, la mandíbula inferior está formada por el cartílago infrarrostral, una estructura pequeña ubicada medialmente y el cartílago de Meckel, más largo y ligeramente arqueado. El tratamiento con T3 provocó cambios anatómicos bien definidos, incluyendo remodelación craneal y reabsorción de las branquias (que provocan la reducción del tamaño cefálico) (ver zona marcada con corchetes en las Figura 21A y B) e inducción del desarrollo de las extremidades (Figura 21D y E). Como se muestra en la **Tabla 5**, se observó una disminución significativa de la longitud total (LT) y de la región de cabeza y tronco (LCTr) de los renacuajos. En contraste, la longitud de la cola (LCo) no exhibió modificaciones significativas, indicando que el tratamiento no provocó la reabsorción de la misma, como sucede naturalmente hacia el final de la metamorfosis espontánea. En función de estos resultados, se deduce que el acortamiento total de los animales se produjo a expensas de una disminución de la longitud troncal. En las **Figura 21 A y B**, se puede verificar claramente el estrechamiento de la cabeza, que se torna más compactada y de forma triangular. En las mediciones morfométricas (**Tabla 5**) se observa la disminución de la distancia interocular (Dist. IO) y una reducción promedio de aproximadamente 40% de la distancia entre las narinas y el bulbo olfatorio (Dist. N/BO). Como se indicó previamente esto se debe en parte, a la fusión de los dos cartílagos que forman la mandíbula inferior, produciendo una curvatura más

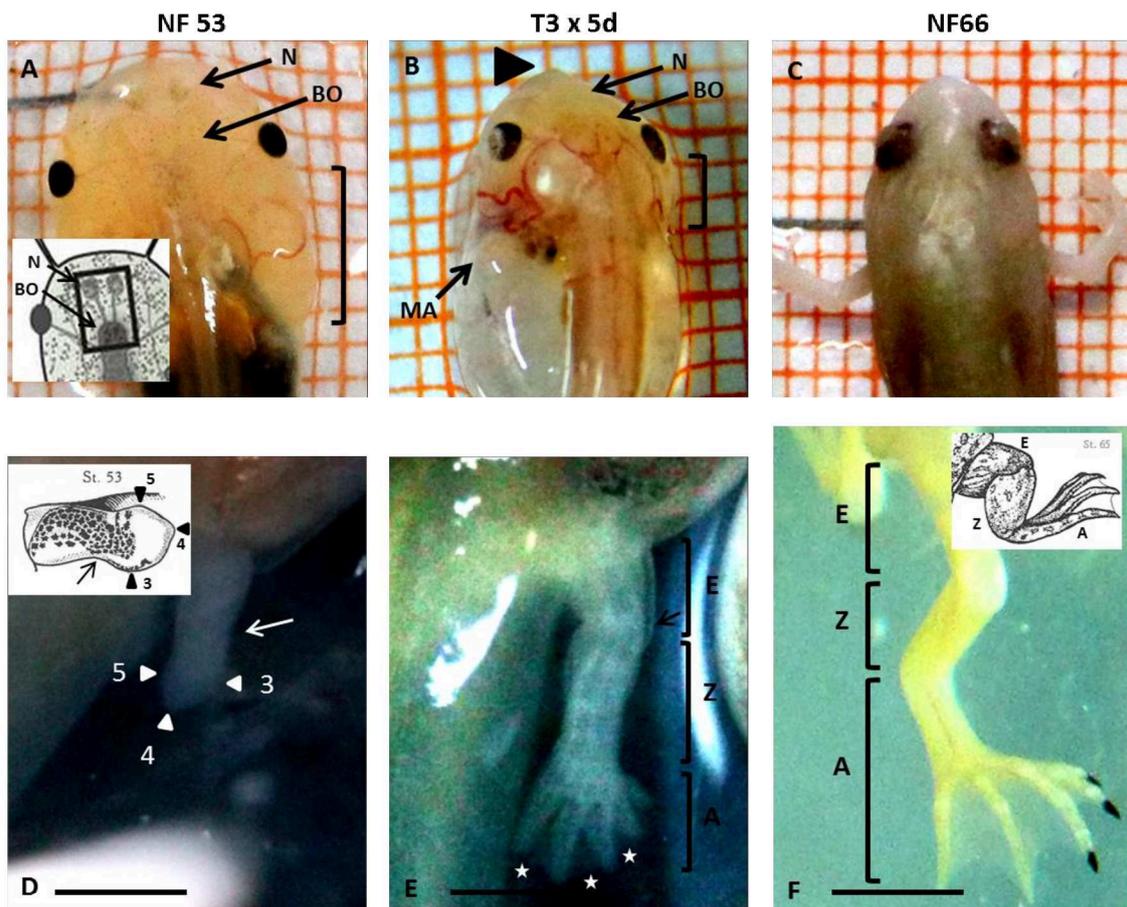


Figura 21. La hormona T3 exógena induce metamorfosis prematura en larvas de *X. laevis*. Renacuajos de tipo salvaje fueron tratados en el estadio NF53 con T3 7,5 nM durante 5 días y los cambios examinados en la anatomía corporal (A-C) y las extremidades posteriores (D-F). Los cambios observados fueron la reabsorción branquial (señaladas con corchetes en A y B), desarrollo del cartilago de Meckel que conduce a la protrusión de la mandíbula (cabeza de flecha en B). Además, el extremo anterior del bulbo olfatorio (BO) se dispone más cerca de las narinas (N) en animales tratados con T3 en comparación con el grupo no tratado y el espacio interocular disminuye. Del mismo modo, el crecimiento y morfogénesis de las extremidades posteriores también fueron inducidos por el tratamiento con T3 (D y E). En D se muestran los primordios de los dígitos (3, 4 y 5) y la escotadura (flecha) que origina la división de la extremidad. En (E) se marca la nueva articulación (flecha) y las tres regiones definidas: autopodio (A), zeugopodio (Z) y estilopodio (E) y con asteriscos las membranas interdigitales, también se puede observar la emergencia de uno de los miembros anteriores (MA). En D y F se observan insertos de esquemas de los miembros en los estadios correspondientes según la tabla de Nieuwkoop y Faber (1994). Barra = 1 mm.

pronunciada, que conduce a la protrusión de la mandíbula prefigurando la cabeza del animal adulto.

En el estadio NF53, al igual que en el st33 de *R. arenarum*, las extremidades posteriores son una estructura cilíndrica de aproximadamente 1mm de longitud (Figura 21D), en cuyo extremo distal se pueden distinguir los precursores de los dígitos 3, 4 y 5 y una escotadura, indicada con una flecha en la Figura 21, que lleva a la diferenciación entre el autopodio y el resto del miembro. Los animales tratados durante 5 días con T3, exhibieron un aumento significativo en la longitud total de las

extremidades posteriores, duplicando la longitud de las del NF53. Este tratamiento fue asimismo efectivo en promover el alargamiento y la diferenciación de los 5 dígitos (Figura 21E y F). Por otro lado, se pudieron distinguir las tres regiones características de las extremidades de vertebrados: autopodio, zeugopodio y estilopodio. Al igual que en *R. arenarum*, los miembros cambiaron su disposición respecto de la cola, quedando en un ángulo característico de aproximadamente 45°. Los valores relativos de LMP/LCTr aumentaron significativamente, confirmando el desarrollo metamórfico de los animales.

Tabla 5. Medidas morfométricas

	Medidas (mm)						
	LT	LTr	LCo	LMP	LMP/ LCTr	Dist. IO	Dist. N/BO
NF 53	27.2 ± 3.7	12,3 ± 2,4	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,5	0,10 ± 0,03	6,7 ± 0,6	1,9 ± 0,3
T3x5d	23.6 ± 2.5*	10,4 ± 0,9*	1,3 ± 0,1	2,4 ± 0,4*	0,23 ± 0,04*	5,9 ± 0,5*	1,1 ± 0,2*

(*) Indica diferencias significativas respecto al grupo control (NF 53), $p < 0,05$

Con el objetivo de analizar el efecto de la hormona sobre la remodelación de los órganos internos, se seleccionó el tubo digestivo. Adicionalmente, el epitelio de este sistema de órganos fue seleccionado para estudiar la dinámica del complejo de proteínas de unión adhesiva, cadherina E/ β -catenina a nivel ultraestructural y molecular.

En primer lugar se evaluaron los cambios anatómicos del tubo digestivo completo y luego los cambios histológicos del estómago. Como se puede observar en la Figura 22A, el tubo digestivo larval (NF53) posee una estructura tubular en cuya zona anterior se pueden distinguir el esófago y el estómago. Este último se distingue macroscópicamente como una región ensanchada del tubo. Al estómago le sigue el intestino espiralado, cuya zona anterior externa tiene una dirección descendente, invirtiéndose en un punto de zigzag (indicado con la cabeza de flecha en la Figura 22A), para formar un espiral interno ascendente y rematando en el intestino grueso y el recto. Esta estructura espiralada desaparece totalmente al finalizar la metamorfosis (Figura 22C), concomitantemente con la drástica reducción de la longitud del intestino. En el límite del estómago con el intestino se puede distinguir claramente el

esfínter pilórico, debajo del cual desemboca el conducto biliar. En los animales tratados durante 5 días con hormona T3 exógena (Figura 22B), la longitud del intestino se reduce notablemente, aunque sin alcanzar el acortamiento producido en la metamorfosis espontánea.

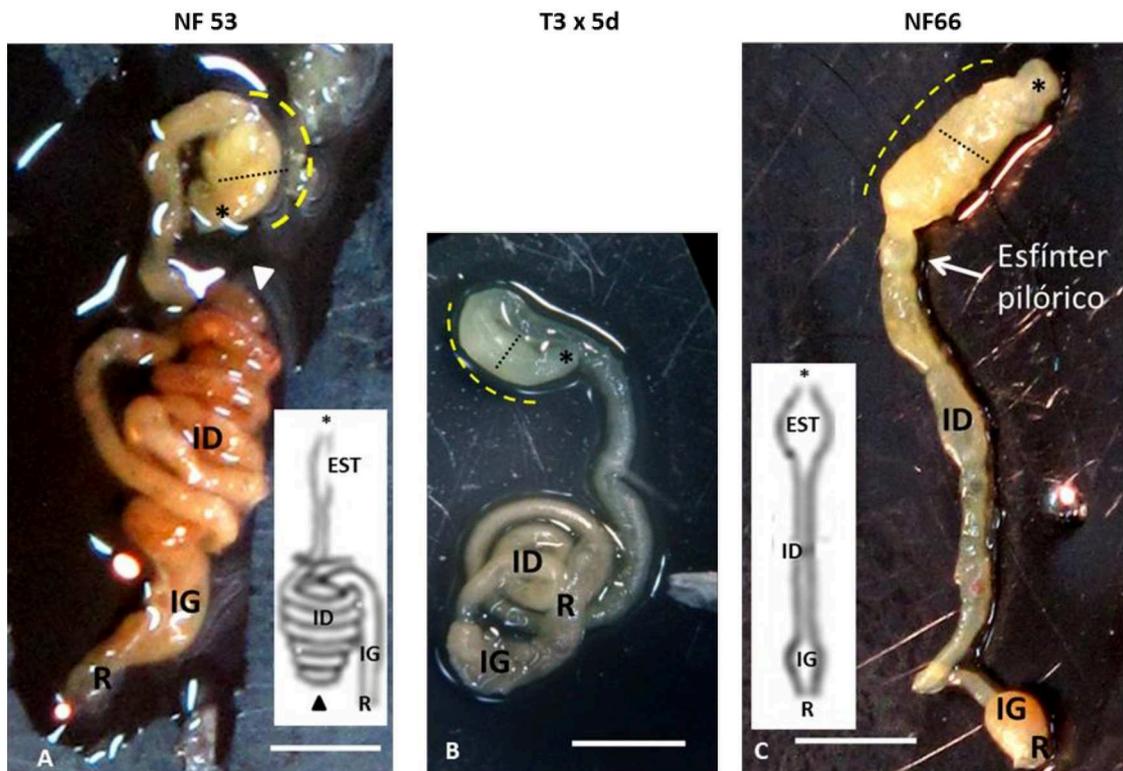


Figura 22. La hormona T3 exógena induce remodelación en el tubo digestivo de *X. laevis*. El tubo digestivo se organiza en esófago (asterisco), estómago (marcado con línea amarilla), intestino delgado (ID); intestino grueso (IG) y recto (R). La zona anterior del intestino delgado forma un espiral externo el cual invierte la dirección en el punto de zigzag (punta de flecha), formando un espiral en la parte interna. (A) El tubo digestivo de un renacuajo premetamórfico (NF53) se muestra tanto *in situ* (inserto superior) como extirpado. Nótese que el intestino se encuentra girado 180° respecto a su posición *in vivo*. (C) Al final de la metamorfosis espontánea (NF 66), el tubo digestivo se ha acortado notablemente. En A y C se muestran insertos con los tubos digestivos en los estadios correspondientes. Barra = 2 mm

A continuación, se realizó el examen histológico comparativo de la región fúndica del estómago de animales premetamórficos no tratados (NF53) (I), tratados con T3 por 24 hs (T324h) (II) y 5 días (T35d) (III), así como posmetamórficos que sufrieron metamorfosis espontánea (NF66) (IV).

Para realizar el análisis se seleccionó el *fundus* debido a que las modificaciones morfohistológicas y funcionales que sufre el tracto anterior del tubo digestivo de vertebrados para configurar el estómago, son claves para los cambios alimentarios de estos organismos que pasan de una dieta herbívora a carnívora (Ishizuya-Oka y col.,

1998). Los individuos NF53 y NF66 representan los puntos experimentales de control de inicio y fin del ensayo de inducción de metamorfosis mediado por T3 exógena.

A continuación, se realizó el examen histológico comparativo de la región fúndica del estómago de animales premetamórficos no tratados (NF53) (I), tratados con T3 por 24 hs (T324h) (II) y 5 días (T35d) (III), así como posmetamórficos que sufrieron metamorfosis espontánea (NF66) (IV).

Para realizar el análisis se seleccionó el *fundus* debido a que las modificaciones morfohistológicas y funcionales que sufre el tracto anterior del tubo digestivo de vertebrados para configurar el estómago, son claves para los cambios alimentarios de estos organismos que pasan de una dieta herbívora a carnívora (Ishizuya-Oka y col., 1998). Los individuos NF53 y NF66 representan los puntos experimentales de control de inicio y fin del ensayo de inducción de metamorfosis mediado por T3 exógena.

El análisis por microscopia óptica de secciones semifinas del *fundus*, muestra que las larvas NF53 (Figura 23a-d) presentan una mucosa fúndica constituida por un epitelio superficial columnar seudoestratificado regionalmente ciliado, con espesor de 70 a 100 μm y un epitelio con apariencia glandular de espesor similar, rodeado de tejido conectivo. Debajo de la mucosa, se ubican una delgada capa de tejido muscular y finalmente, una capa serosa de aproximadamente 10 μm de espesor entre ambas (Figura 23d). Entre las glándulas en formación, puede visualizarse tejido conectivo; sin que se logre distinguir la submucosa, ni la muscular interna de la mucosa. Adicionalmente al patrón ciliado de las células superficiales, existen otros fenotipos superficiales que presentan microvellosidades (Figura 23b). De manera singular, las células ciliadas presentan una superficie apical plana y el citoplasma exhibe mayor afinidad por el azul de toluidina. Las células ricas en microvellosidades poseen una superficie apical abovedada o piriforme, con grandes núcleos escotados y nucléolos prominentes. Ambos tipos celulares son ricos en gotas lipídicas y placas vitelinas, característicos de estadios tempranos del desarrollo.

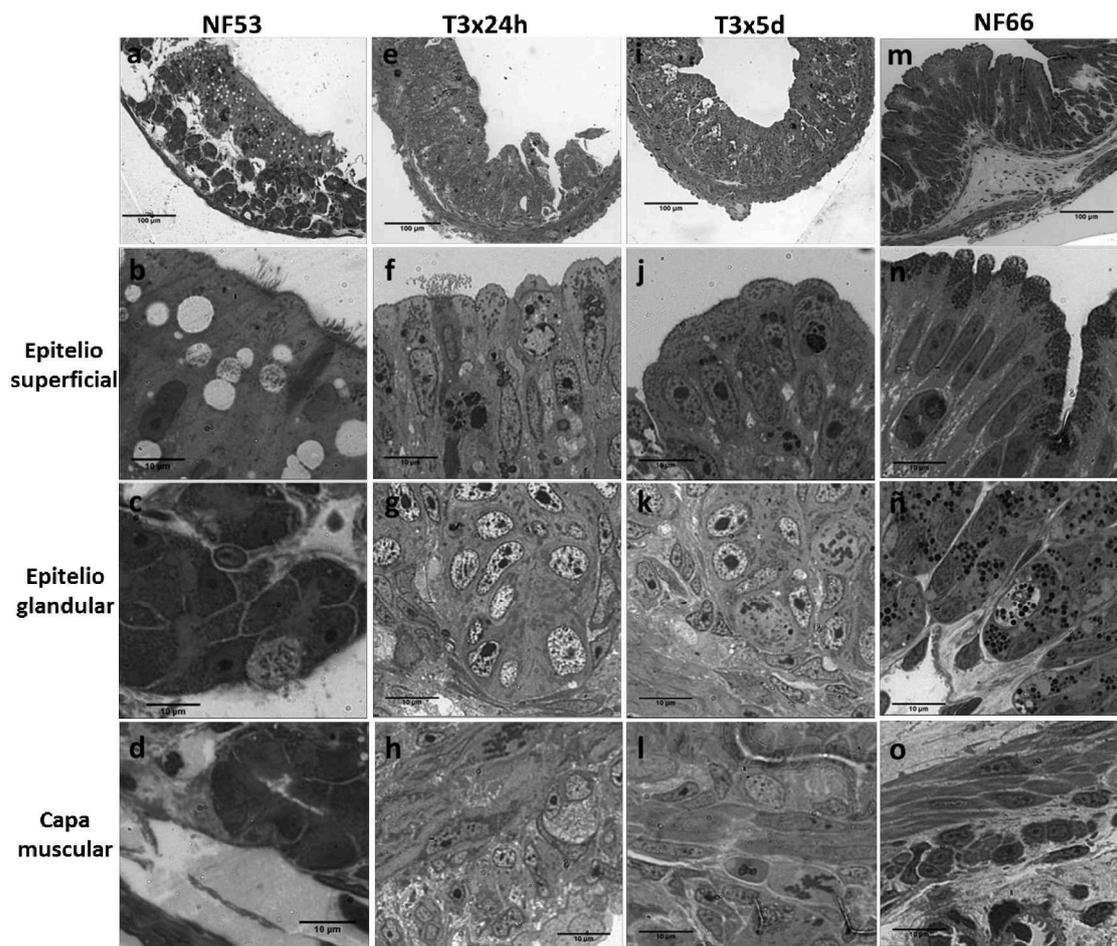


Figura 23. Morfología de la región fúndica del estómago de *X. laevis*. Secciones sagitales del tubo digestivo de 0,5 μm de espesor teñidos con azul de toluidina, de larvas premetamórficas (NF53 a-d, control inicial), postmetamórficas (NF66 m-o, control final) y tratadas con T3 durante 24h (e-h) y 5 días (T35d i-l).

En secciones transversales, el epitelio glandular putativo, presenta apariencia de adenómeros serosos con células piramidales, de citoplasmas granulares intensamente teñidos con azul de toluidina y grandes espacios intercelulares. Rodeando los adenómeros se observan células de tipo mioepitelial, abundante tejido conectivo interglandular (Figura 23c) y numerosos vasos sanguíneos (no mostrado). En los adenómeros son frecuentes las figuras mitóticas (Figura 23c). Al finalizar la metamorfosis espontánea y luego de un profundo remodelamiento del tubo digestivo, la mucosa gástrica de los individuos de estadio NF66 (Figura 23m-o) presenta un epitelio superficial de ~50μm de espesor y otro glandular, de espesor variable debido a la presencia de numerosos plegamientos (60 a 120 μm). En este estadio se distingue claramente la submucosa aglandular muy desarrollada, separada de la mucosa glandular por la capa muscular de la mucosa. Las capas subyacentes también alcanzan

un mayor grado de desarrollo, pudiendo distinguirse dos capas musculares: la longitudinal y la circunferencial de $\sim 20 \mu\text{m}$ y por debajo la capa serosa de $\sim 30 \mu\text{m}$ de espesor (Figura 23o). El epitelio superficial simple sufre invaginaciones formando numerosas criptas y presenta ahora una morfología celular más homogénea, con células columnares de mayor altura, núcleos bien alargados, que se ubican en posición basal a la misma altura y paralelos al eje mayor de la célula. En su cara apical, estas células presentan una forma abovedada, con gran concentración de gránulos esféricos intensamente teñidos. Las células ciliadas prácticamente han desaparecido (Figura 23n). Las glándulas son tubulares simples, están rodeadas de células mioides y presentan la morfología característica del tejido adulto. El fenotipo de las células glandulares ha sufrido modificaciones, exhibiendo en este estadio una morfología cúbica, citoplasmas con numerosos gránulos, con núcleos de cromatina laxa y nucléolos menos prominentes. Con la tinción de azul de toluidina, se distinguen dos tipos de gránulos: serosos esféricos, muy abundantes, de tamaño variable e intensamente teñidos y mucosos menos numerosos, de mayor tamaño y escasamente teñidos (Figura 23ñ).

La histología del *fundus* de los animales tratados por 24 hs con T3 (Figura 23e-h), exhibe una mucosa en la cual resulta más difícil distinguir la regionalización de los epitelios superficial y glandular, aunque pueden advertirse indicios de su plegamiento. Se distingue claramente el engrosamiento de las paredes muscular y serosa, alcanzando entre ambas espesores de aproximadamente $25\mu\text{m}$. La mucosa muestra la coexistencia de dos tipos de células superficiales, una con núcleos grandes, escotados, de nucléolos prominentes y ubicados a diferentes alturas. El segundo fenotipo, presenta núcleos basales alargados que siguen el eje celular mayor. Muchas células presentan alteraciones estructurales con núcleos picnóticos, del tipo apoptótico (Figura 23f). Se distinguen numerosos macrófagos con cuerpos apoptóticos dentro de fagosomas (Figura 24). Las imágenes histológicas de este punto experimental muestran que es un estadio de transición entre los epitelios que se observan en los individuos control (NF53 y NF66) (Figura 23b,f y n). Las células ciliadas características de NF53 aún están presentes, pero contrastando con lo observado en el estadio NF53, el *fundus* de los animales T324h exhibe células superficiales abovedadas, pero de

morfología variable y se incrementa el material granular, el cual a su vez es muy irregular en tamaño y forma, se tiñe intensamente y se ubica por encima del núcleo (Figura 23f). A nivel glandular, las células se observan en estrecho contacto, su cromatina es más laxa y los nucléolos se tornan muy prominentes. Aún se observan

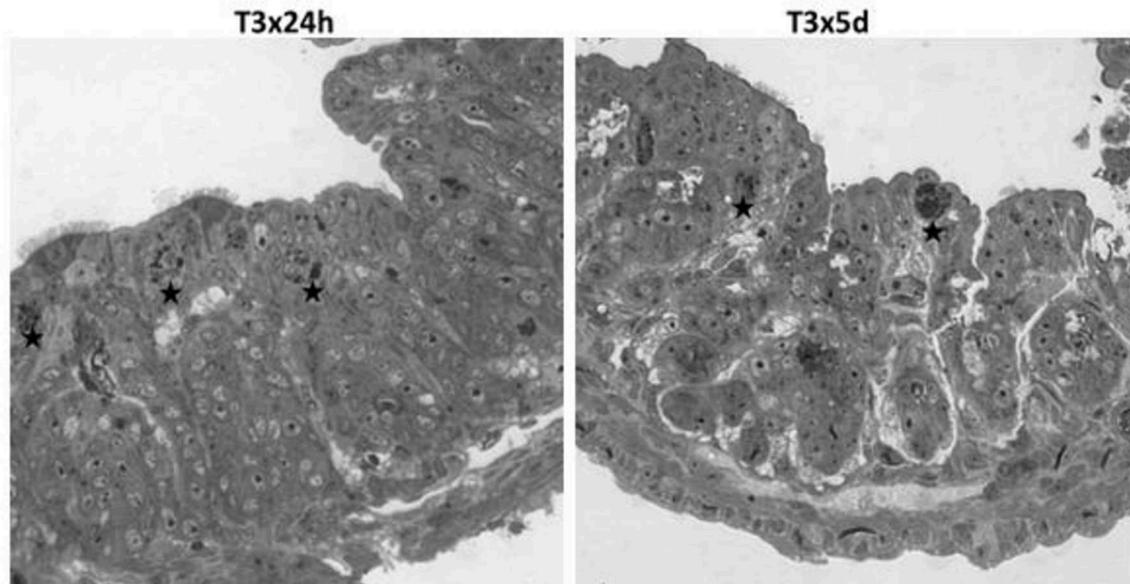


Figura 24. Región fúndica del estómago de *Xenopus laevis*. Cortes semifinos transversales al eje longitudinal del tubo digestivo teñidos con azul de toluidina. Se pueden observar los macrófagos con cuerpos apoptóticos en fagosomas (indicados con una estrella en ambos cortes), en el tejido de animales tratados con la hormona T3.

células piramidales con numerosos gránulos del tipo seroso, coexistiendo con células en división y en apoptosis (Figura 23f). En la capa muscular se incrementa el número de células mitóticas (Figura 23h).

Luego de 5 días de tratamiento con T3 (Figura 23i-l), se acentúan los cambios iniciados a las 24 hs. La mucosa exhibe un espesor de aproximadamente 120 μm y si bien el epitelio superficial comienza a diferenciarse del glandular, aún no se distingue la muscular de la mucosa. Las capas muscular y serosa están muy desarrolladas y en conjunto alcanzan un espesor de unos 30 μm (Figura 23i). Las células superficiales se vuelven más regulares en tamaño y de morfología columnar, pero sus núcleos continúan exhibiendo morfología irregular, con nucléolos prominentes y cromatina con distintos grados de compactación. La región supranuclear posee mayor número de gránulos, los cuales se observan más homogéneos en forma y se tiñen más intensamente (Figura 23j). El número de figuras apoptóticas continúa siendo elevado y

aún se observan algunas células ciliadas, distribuidas muy espaciadamente. Se hace más pronunciado el alargamiento de las glándulas tubulares, mostrando en la región basal numerosas figuras mitóticas. Las características del epitelio glandular en diferenciación son similares a las observadas en el tratamiento T324h (Figura 23k). A pesar de los numerosos cambios registrados, el desarrollo de la submucosa y de la muscular de la mucosa es escaso, diferenciándose en este punto, del desarrollo alcanzado en la metamorfosis espontánea (NF66) (Figura 23d, l y o).

7.2.1.2. Estudio ultraestructural de las uniones intercelulares en células del epitelio gástrico de *X. laevis*

Los resultados obtenidos mediante los estudios histológicos muestran claramente que el tratamiento con T3 provoca la remodelación del epitelio estomacal de *X. laevis*. Para evaluar a nivel ultraestructural el posible impacto del tratamiento sobre la estructura y localización de los complejos de unión intercelulares del epitelio estomacal y de ésta manera, analizar si el mismo afecta la polaridad celular, se realizó un análisis morfométrico de dichos complejos por microscopía electrónica de transmisión (MET).

En el estadio NF53 se observa un epitelio superficial compuesto por células ciliadas y mucosas. Como la mayoría de las células epiteliales, éstas se encuentran unidas por complejos de unión, específicamente UEs, UAs y Dms, ubicados secuencialmente en sentido ápico-basal (Figura 25). En este estadio, todas las zonas intercelulares analizadas presentan UEs (Figura 26A), los que como se indicó precedentemente, constituyen el primer elemento del complejo tripartito de unión apical, situado inmediatamente por debajo

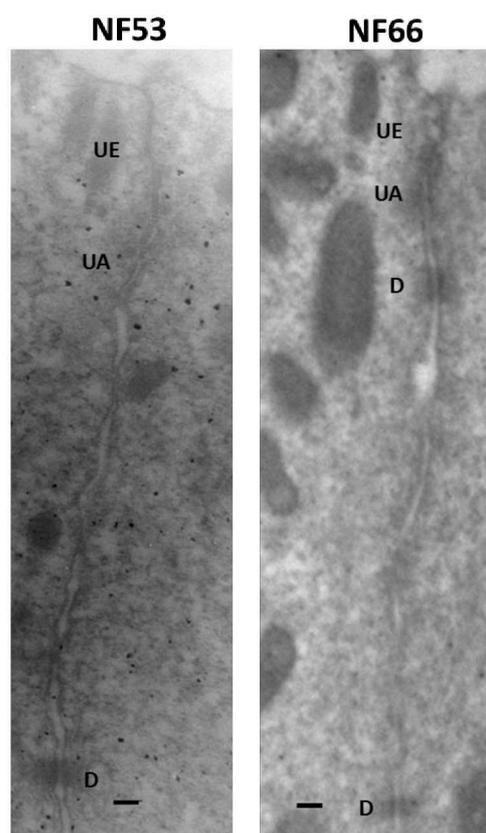


Figura 25. Distribución de los complejos de unión intercelular. Se muestran las uniones estrechas (UEs), adherentes (UAs) y desmosomas (Dms) en estadio larval (NF53) y al finalizar la metamorfosis (NF66). Barra: 100nm.

del lumen. Esta estructura se visualiza como una región relativamente extensa, en la que las membranas de las células adyacentes se acercan estrechamente, sin que se logre discernir el espacio intermembrana. En algunos casos se observan los característicos puntos de contacto intermembrana (Figura 27). Por debajo se observan las UAs, las cuales pudieron distinguirse en el 77% de las zonas estudiadas. Las mismas presentan un espacio intermembrana promedio de 19 nm y en algunos casos, su extensión a lo largo de la membrana lateral se torna difícil de visualizar (Figura 26 y Figura 27). En el 54% de las zonas analizadas, también pudieron observarse desmosomas. Éstos exhiben un espaciado intercelular característico de 24 nm y en su mayoría, se localizan alejados de las UEs y UAs apicales (Figura 25 y Figura 26).

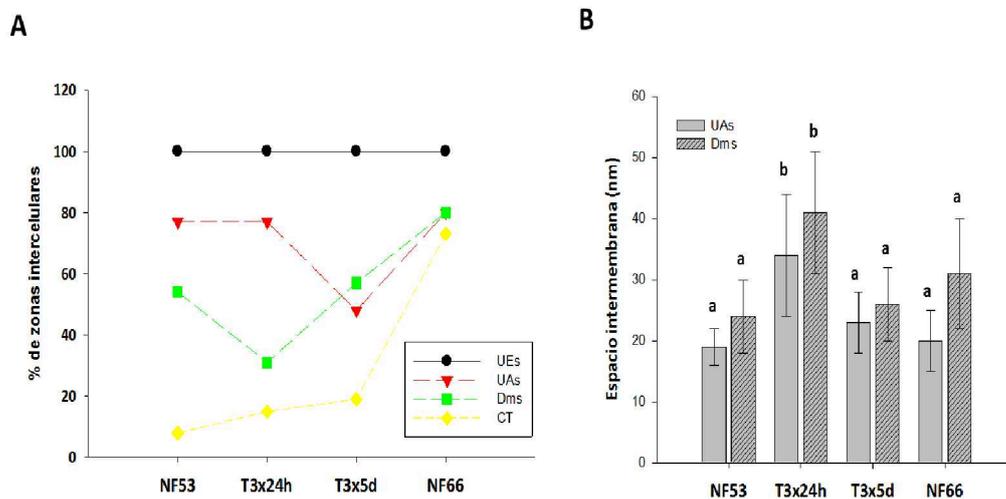


Figura 26. A. Análisis de la ocurrencia de los distintos tipos de uniones intercelulares del epitelio gástrico de *X. laevis*, durante el desarrollo espontáneo e inducido por T3 exógena. B. Valores de espacios intermembranas de UAs y Dms en los modelos estudiados. En cada tipo de unión, letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Luego de la metamorfosis espontánea (NF66), la mayoría de las zonas de unión (77%) presentó el complejo tripartito apical característico de los epitelios maduros (Figura 25). Las UEs presentes en el 100% de las zonas analizadas, exhiben su morfología característica. Las UAs muestran uniformidad y su extensión se encuentra bien definida. Las membranas se disponen paralelamente, delimitando espacios intercelulares de aproximadamente 20 nm, sin exhibir diferencias estructurales significativas con lo que se observa en el estadio NF53 (Figura 26 y Figura 27). Por su parte los desmosomas se encuentran tanto formando parte del complejo tripartito en la zona apical, como en las zonas basales. En ambos casos el espacio intermembrana es

de aproximadamente 30 nm, sin que se verifiquen diferencias significativas con las mediciones realizadas en el estadio NF53 (Figura 26 y Figura 27).

En el análisis de los espitelios estomacales de animales tratados con la hormona durante 24 hs, se observa que, si bien el porcentaje de zonas intercelulares con UEs y UAs se mantiene (Figura 25) se verifica una distensión significativa del espacio intermembrana de éstas últimas, que alcanzan valores promedio de 34 nm (Figura 26 y Figura 27).

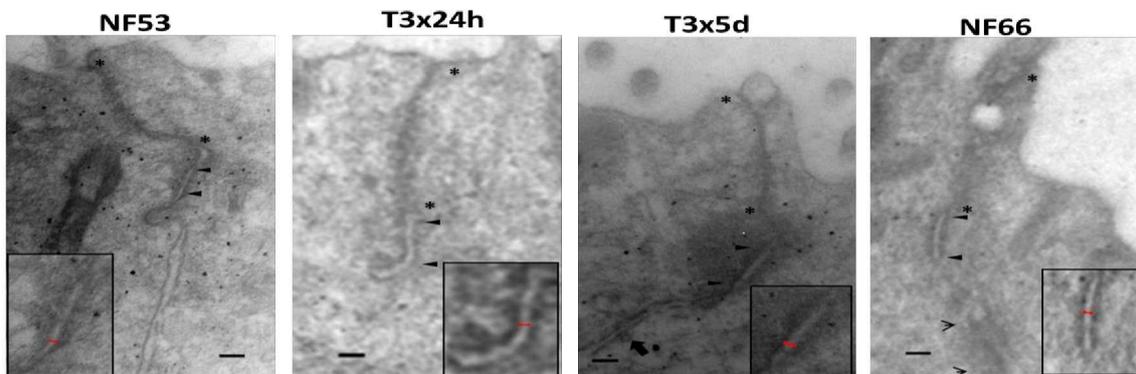


Figura 27. Ultraestructura de los complejos de unión en el epitelio estomacal de *X. laevis*, durante la metamorfosis espontánea (NF53 y NF66) e inducida por T3 exógena (T324h y T35d). Se muestra la morfología de las UEs delimitadas por asteriscos y la de las UAs delimitada por cabezas de flecha. Se observa claramente una ampliación del espacio intermembrana de las UAs (línea roja). En NF66 también se muestra un Dm delimitado por flechas. Luego de 5 días de tratamiento con T3 se observan numerosas vesículas endocíticas (flecha gruesa). Barra: 100 nm.

En los epitelios de los animales tratados por 24 h con T3 se verificó una disminución en el número de zonas con Dms (Figura 26), como así también un aumento significativo de la separación intermembrana de dichos complejos. Se encontró que el tratamiento provoca un incremento notable de vesículas, de diversas características, ubicación y tamaño (140 a 230 nm de diámetro), algunas muy próximas a la membrana plasmática (Figura 28). Esta última presentó pequeñas invaginaciones, características de procesos endocíticos. A su vez, en algunas células se distinguieron autofagosomas, en cuyo interior se observan materiales con índices de electrodensidad variable (Figura 28).

En los animales sometidos a 5 días de tratamiento con T3, se observó que mientras se mantiene el número y estructura de UEs, se verifica una disminución notable del número de UAs (Figura 26). A su vez, el análisis de estas UAs muestra que los espacios intermembrana sufren en promedio, una disminución significativa respecto al punto

experimental de 24 hs, alcanzando valores cercanos a los de los estadios control inicial y final (23 nm) (Figura 26 y Figura 27).

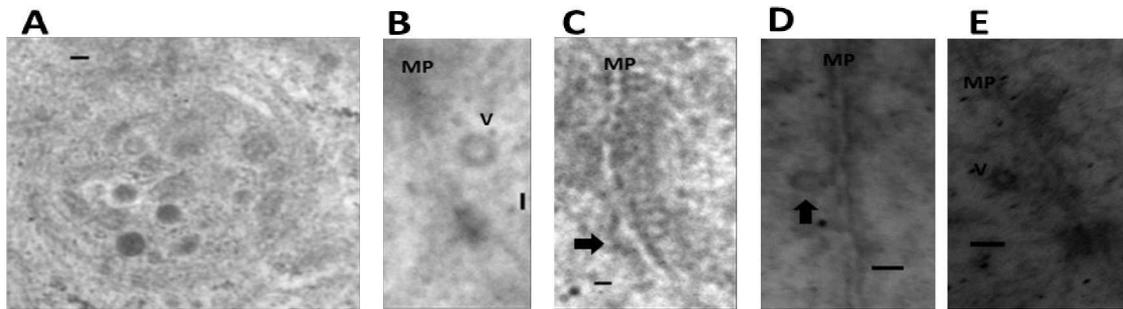


Figura 28. Reciclaje de complejos de unión por acción de T3 exógena, en animales tratados por 24 h (A-C) y 5 días (D-E). A. Autofagosoma con numerosos cuerpos electrodensos. B-E. Diferentes etapas de endocitosis-exocitosis de posibles complejos de unión. MP: membrana plasmática; V: vesícula. Barra: 100nm.

Por el contrario, se verificó un incremento de las zonas desmosomales respecto de lo observado a las 24 hs, cuya estructura es similar a la observada en los epitelios de los animales control. Coincidiendo con lo observado en los epitelios de los animales tratados con T3 por 24 hs, también se observan vesículas próximas a la membrana plasmática y zonas exhibiendo invaginaciones (Figura 28).

7.2.1.3. Evaluación de los cambios en la expresión génica provocados por T3

Luego de analizar los efectos provocados por el tratamiento hormonal sobre la morfología externa de los animales, la anatomía del tubo digestivo y la histología estomacal, se analizó el modelo de inducción a nivel molecular, en particular, el efecto sobre el proceso de transcripción de dos genes claves y característicos para evaluar la adecuada respuesta de las larvas a T3: el receptor beta de hormona T3 (RT β) y la proteína intestinal de unión a los ácidos grasos (I-FABP del inglés: *Intestinal-type fatty acid-binding protein*). El primero es conocido por ser un gen de respuesta directa a T3 en los tejidos intestinales de *X. laevis* (Ranjan y col., 1994; Shie Ishizuya-Oka, 1997; Buchholz y col., 2007). En los tejidos del estadio NF53 no se detectó la presencia de transcritos de este receptor. El análisis realizado en animales tratados por 24 hs con T3 aumentaron 0,6 veces los niveles de RT β -ARNm respecto al grupo control, alcanzando valores superiores a 0,7 veces a los 5 días de tratamiento con T3 (Figura 29). Estos valores resultaron superiores a los observados al finalizar la metamorfosis espontánea (NF66), donde los niveles de RT β -ARNm son significativamente mayores

(0,4 veces) a los verificados en el estadio NF53. En relación con el gen de I-FABP también se ha caracterizado como sensible a T3, pero a diferencia de lo que ocurre con

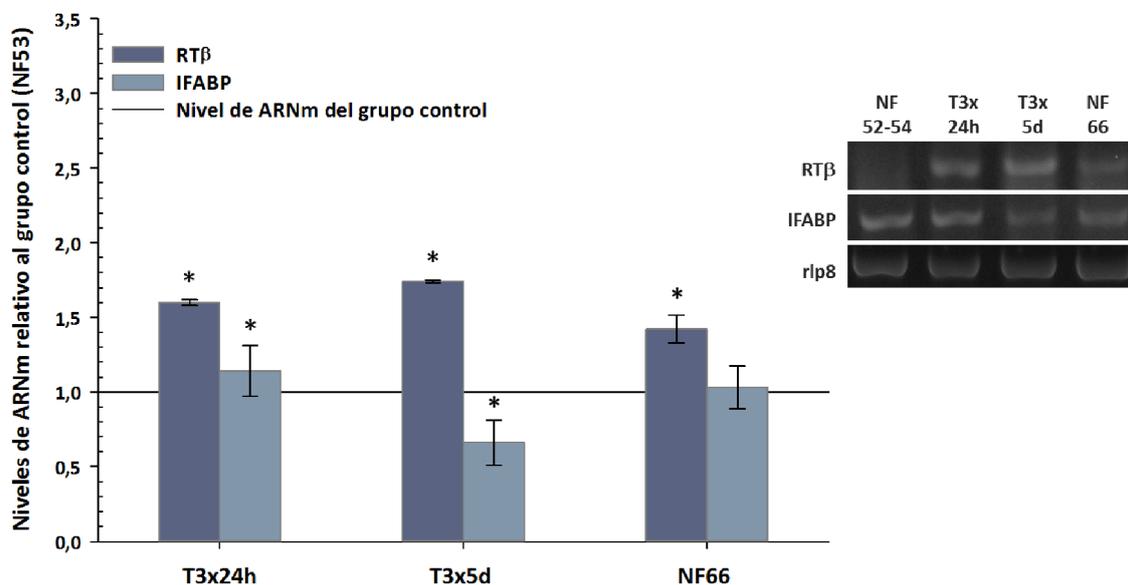


Figura 29 Niveles de expresión génica de RTβ e I-FABP relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de *X. laevis* tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66). Los niveles de ARNm se determinaron por *sqRT-PCR* y se normalizaron en relación a los niveles del grupo control (NF53). El análisis estadístico se realizó calculando el intervalo de confianza del 95% del dato normalizado (barra de error) basado en Fay y Gerow (2013). Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control (NF53) ($p \leq 0,05$). El gen constitutivo *rlp8* fue empleado como control interno y normalizador de cada reacción de *sqRT-PCR*.

RTβ, su transcripción en el epitelio intestinal de *X. laevis* es regulada negativamente por la hormona, aunque esto ocurre después de las 24 hs del tratamiento (Shi y Hayes, 1994). En este trabajo se verificó una disminución significativa del 40% en los niveles de I-FABP-ARNm en el grupo T3x5d. En contraste, no se detectaron diferencias significativas respecto al grupo control a las 24 hs de tratamiento con T3 exógena, en los animales en los cuales su metamorfosis ocurre espontáneamente (NF66).

7.2.2. Expresión génica de las moléculas de los complejos de adhesión en el tubo digestivo de *X. laevis* inducidos con T3

A continuación, se evaluó el impacto del tratamiento hormonal sobre los transcritos de las principales moléculas involucradas en los complejos de unión presentes en células epiteliales del tubo digestivo, fundamentalmente se evaluó la respuesta en las moléculas de las UAs. Por ello, se determinaron los niveles de transcripción del receptor transmembrana cadherina E y el de las moléculas de anclaje al citoesqueleto:

β -catenina, α -catenina y p120. Adicionalmente, dado que es sabido que los distintos complejos de unión intercelulares están dinámicamente interrelacionados, se evaluaron los niveles de expresión de la proteína transmembrana de UEs: ocludina y su par citoplasmático ZO1 (del inglés: Zonula Occludens 1 Protein).

En primera instancia se determinaron los niveles de expresión génica basales de cada molécula, en tubos digestivos de animales no tratados de los estadios NF53 y NF66, puntos considerados inicial y final del modelo de inducción. Como se indicó en la sección de M&M, las cuantificaciones de cada grupo de tubos digestivos para analizar los niveles de transcritos, se calcularon en relación a los niveles de expresión del gen constitutivo rlp8.

Los tubos digestivos de las larvas premetamórficas NF53, excepto los niveles promedio de expresión de p120 y ocludina, los restantes exhibieron desviaciones estándar muy elevadas. Así, se verificó que cadherina E exhibe niveles superiores de aproximadamente un 38% respecto de los hallados para el gen de referencia. En relación con β -catenina, esos valores resultaron de aproximadamente un 36% y los de α -catenina del 26%. En un análisis más detallado, se verifica que estos valores incluyen desvíos de órdenes de magnitud que en algunos casos son próximos a los valores promedio. Finalmente, en el caso de p120, los promedios en relación con los del gen de control interno rlp8, alcanzaron niveles del 67%. Las dos moléculas que se utilizaron para caracterizar los perfiles de expresión génica de las UEs (occludina y ZO-1), exhibieron niveles de 44% y 54% respectivamente. Por el contrario, los valores promedio de los niveles de expresión génica respecto del gen constitutivo en los tubos digestivos de los animales control del estadio NF66 exhibieron un alto grado de homogeneidad, tanto para las moléculas características de las UAs como para las de UEs. En relación con las primeras, cadherina E exhibió niveles del 80%, β -catenina del 75%; α -catenina del 40% y p120 del 65%. Ocludina y ZO1 mostraron niveles de expresión de 70% y 65% respectivamente.

El segundo paso consistió en evaluar el efecto del tratamiento con T3 sobre la transcripción de las moléculas de UAs y UEs, previamente indicadas. Para ello, se determinaron los cambios en los niveles de ARNm respecto de los detectados en el grupo control (NF53), a las 24hs y 5 días de tratamiento. El análisis a las 24hs se realizó

para determinar si estas son moléculas de respuesta temprana a T3; es decir, si sus niveles de ARNm varían significativamente dentro de las 24hs de tratamiento hormonal.

Como se observa en la **Figura 30**, las moléculas que forman el complejo de uniones adhesivas dependientes de cadherina E, mostraron un incremento significativo en los niveles del ARNm de cadherina E, β - y α -catenina, y p120 dentro de las 24hs de inducción, respecto de los observados en el estadio NF53.

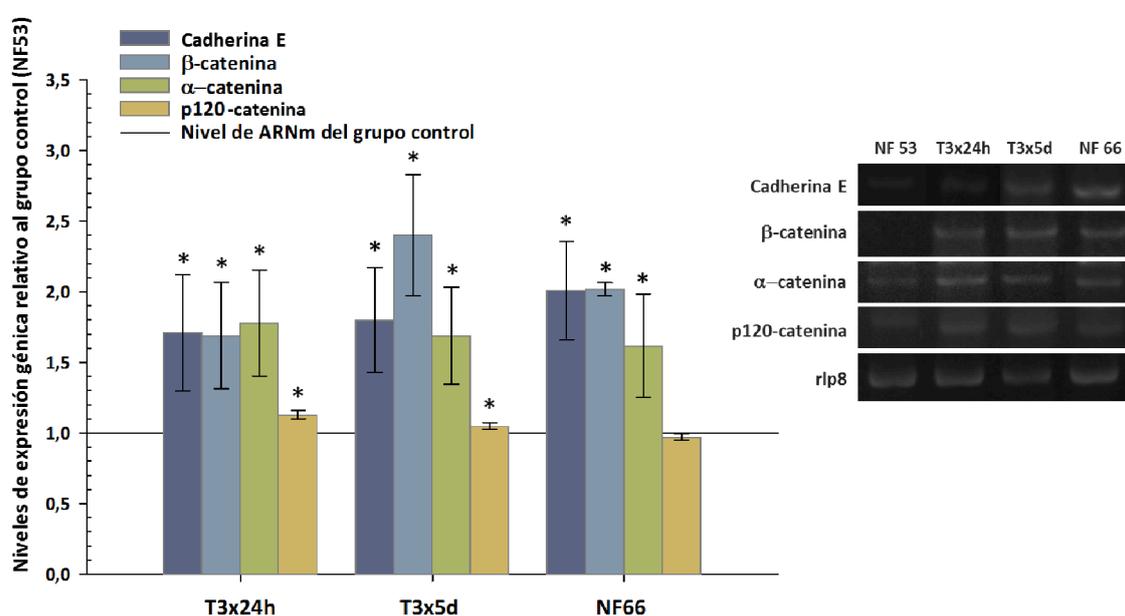


Figura 30. Niveles de expresión génica de cadherina E, β -catenina, α -catenina y p120, relativos al grupo control inicial (NF53) en tubos digestivos completos de larvas de *X. laevis* tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h), 5 días (T3x5d) y control final (NF66). Los niveles de ARNm se determinaron por *sqRT-PCR* y se normalizaron en relación con los niveles del grupo control (NF53). El análisis estadístico se realizó calculando el intervalo de confianza del 95% del dato normalizado (barra de error) basado en Fay y Gerow (2013). Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control (NF53) ($p \leq 0,05$). El gen constitutivo *rlp8* fue empleado como control interno y normalizador de cada reacción de *sqRT-PCR*

Los valores de expresión génica de cadherina E muestran incrementos significativos de 0,7 veces y se mantienen prácticamente inalterados luego de 5 días de tratamiento (0,8 veces). Estos niveles alcanzan 1 vez de incremento al finalizar la metamorfosis espontánea (NF66).

Los niveles de expresión de β -catenina a las 24hs de tratamiento hormonal exhibieron incrementos significativos del orden de 0,7 veces respecto del grupo inicial. Esta molécula alcanza valores de expresión de 1,4 veces a los 5 días de tratamiento,

mientras que en los animales que completaron la metamorfosis espontáneamente (NF66), los niveles de expresión se incrementaron 1 vez, respecto de los del estadio NF53.

En relación con α -catenina, los niveles de expresión génica a las 24 hs se incrementaron significativamente 0,8 veces respecto de los animales en estadio NF53. A los 5 días de tratamiento, esos niveles se mantienen prácticamente inalterados (0,7 veces respecto de los animales del estadio NF53). Dichos niveles de expresión son similares a los de animales que alcanzan la metamorfosis espontáneamente (0,7 veces respecto de los obtenidos en el estadio NF53).

Para p120 también se verifica un incremento de alrededor del 10% respecto de los valores verificados en el estadio NF53. Dicha tendencia se mantiene a los 5 días de tratamiento. Sin embargo, en los animales del estadio NF66 los niveles de expresión génica no muestran cambios significativos respecto al grupo control.

A continuación se evaluó el efecto de T3 sobre la selección de moléculas que participan en las UEs, ocludina y ZO1. Estas moléculas exhibieron una respuesta diferencial al tratamiento hormonal (Figura 31).

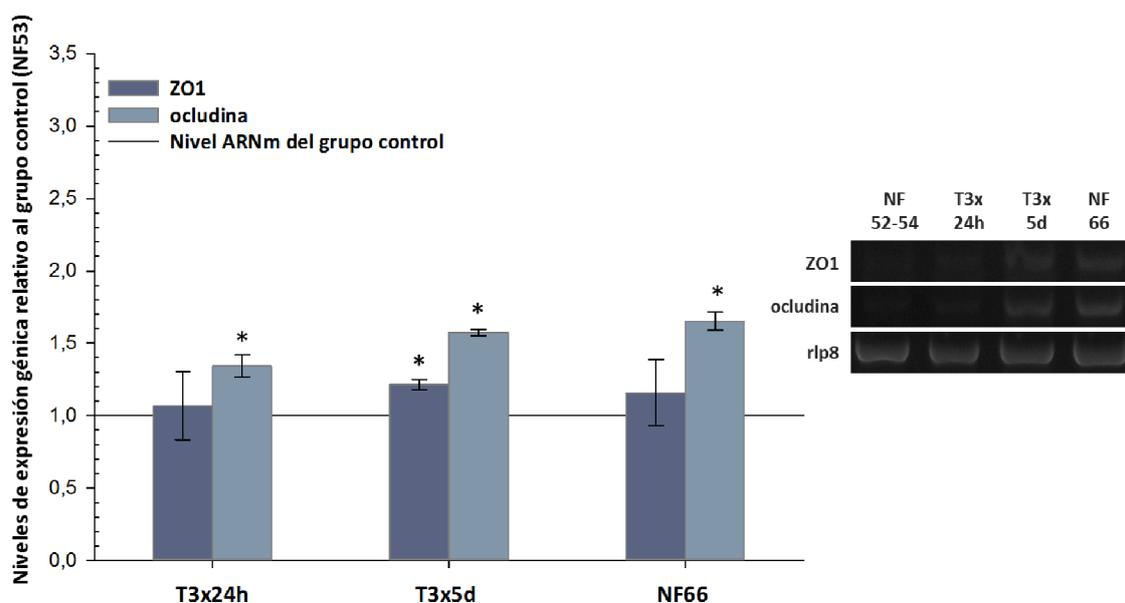


Figura 31. Niveles de expresión génica de ocludina y ZO1 relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de *X. laevis* tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66). Los niveles de ARNm se determinaron por *sqRT*-PCR y se normalizaron en relación con los niveles del grupo control (NF53). El análisis estadístico se realizó calculando el intervalo de confianza del 95% del dato normalizado (barra de error) basado en Fay y Gerow (2013). Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control (NF53) ($p \leq 0,05$). El gen constitutivo *rlp8* se empleó como control interno y normalizador de cada reacción de *sqRT*-PCR.

A las 24 hs, los niveles de expresión de ocludina aumentan significativamente 0,3 veces respecto al control. Luego de 5 días de tratamiento se incrementa 0,6 veces; semejante a los niveles alcanzados en animales que han completado su metamorfosis naturalmente (NF66).

Con respecto a ZO1, sus niveles de expresión no presentan diferencias significativas a las 24 hs respecto al grupo control inicial (NF53), mientras que los animales tratados con T3 luego de transcurridos los 5 días, exhiben incrementos significativos del orden de 0,2 veces respecto al mismo grupo control. En animales que han sufrido metamorfosis espontánea (NF66) los niveles de expresión tampoco presentan diferencias significativas con las observadas en las larvas control del NF53.

7.2.3. Expresión génica de moléculas que participan en la cascada de señalización intracelular

Como se mencionó precedentemente, otro de los objetivos de esta tesis, consistió en analizar el efecto de T3 sobre la expresión de GTPasas pequeñas, las cuales han sido involucradas en el control dinámico del establecimiento y mantenimiento de las UAs epiteliales. Para ello, se seleccionaron cuatro de las principales moléculas implicadas en estos mecanismos: RhoA, Rac1, Cdc42 y Rap1.

Tal como se describió en la introducción, la formación, mantenimiento y remodelación de las uniones y por lo tanto, de la morfogénesis y diferenciación epitelial, requieren un mecanismo altamente orquestado de activación/desactivación témporo-espacial de estas GTPasas, en el cual están involucrados los GEFs y GAPs. En función de estos antecedentes y que cada uno de los GEFs y los GAPs tienen una cierta especificidad por los miembros de la familia de proteínas G, se seleccionaron un GEF y un GAP regulador de cada GTPasa pequeña analizada. La elección se realizó dada la evidencia sobre la localización y las potenciales funciones de estas proteínas en las uniones bajo estudio. El objetivo se centró en evaluar el efecto del tratamiento sobre sus niveles de ARNm y por ende, determinar si son reguladas a nivel transcripcional y de qué modo, durante la metamorfosis dependiente de T3.

En el caso de RhoA se estudiaron el GEF18 y el GAP p190; para Rac1 el TIAM (GEF) y el GAP12; para Rap1 C3G (GEF) y SPA1 (GAP) y para Cdc42 FRG (GEF) y Rich (GAP).

En primer lugar, se determinaron los niveles basales de ARNm de estas proteínas en tubos digestivos completos de larvas premetamórficas (NF53) y animales que han completado su metamorfosis naturalmente (NF66). Los niveles de expresión de las GTPasas pequeñas en larvas premetamórficas, al igual que la mayoría de las moléculas de adhesión celular, exhibieron desviaciones estándar muy elevadas. RhoA exhibió niveles de aproximadamente un 74% respecto de los correspondientes al gen de referencia. Para Rac1 los niveles de expresión resultaron cercanos al 23%. En relación a Rap1, esos valores resultaron de aproximadamente un 31% de los hallados para el gen de referencia y para Cdc42 del 41%. En las muestras de estadio premetamórfico, no se detectaron ninguno de los GEFs estudiados por *sqRT-PCR* y en el caso de los GAPs, de los cuatro analizados sólo se detectaron p190 y GAP12, cuyos niveles relativos al gen de referencia fueron del 60 y 11% respectivamente.

En las muestras de los animales control del estadio NF66, los valores promedio de los niveles de expresión génica de las GTPasas pequeñas respecto del gen constitutivo, también exhibieron un alto grado de homogeneidad, al igual que las moléculas de los complejos de unión intercelular. En relación a RhoA, esta exhibió niveles del 58%, mientras que para Rac1 fueron del 37%; para Rap1 del 70% y Cdc42 alcanzó valores del 52%, en relación con *rlp8*. Respecto a los GEFs, conforme avanza el proceso de metamorfosis, se verificaron incrementos en la expresión génica de los activadores de RhoA, Rac1 y Rap2, mientras que el GEF que regula Cdc42 tampoco pudo ser detectado en este punto. Los niveles de expresión de GEF18 resultaron del 30% respecto al gen de referencia, mientras TIAM presentó niveles de aproximadamente 45% y C3G del 18%. En relación a los GAPs al final de la metamorfosis (NF66), mientras p190 exhibió niveles de expresión de 67% respecto al gen *rlp8*, GAP12 alcanzó un 40% y Rich es detectado en este punto en niveles cercanos al 46%. En contraste, SPA1 tampoco pudo detectarse hacia el final de la metamorfosis.

Una vez establecidos los niveles de expresión de estas moléculas en animales sin tratamiento, el siguiente paso consistió en analizar el efecto de T3 sobre los niveles de ARNm de este conjunto de GTPasas pequeñas y sus moléculas reguladoras en animales tratados, tanto durante 24 hs, como 5 días. Los resultados del efecto de T3 sobre la expresión de las GTPasas pequeñas se resumen en la **Figura 32**. Se verifica que las

distintas GTPasas pequeñas estudiadas exhiben un comportamiento de expresión diferencial.

Los niveles de expresión de RhoA a las 24 hs de tratamiento hormonal no exhibieron cambios respecto del grupo inicial. Sin embargo, a los 5 días de tratamiento, se verificó una disminución significativa respecto al grupo control, lo que se repite en los animales que completaron la metamorfosis espontáneamente (NF66).

Los valores de expresión génica para Rac1 obtenidos a las 24 hs con T3 muestran incrementos significativos de 1,2 veces respecto a los observados en el estadio NF53. Dichos niveles disminuyen luego de 5 días de tratamiento (0,5 veces respecto de los niveles hallados en el estadio NF53), aunque aún muestran diferencias significativas respecto al control inicial. De particular interés resultó este comportamiento de Rac1 el cual es muy semejante al que exhiben los animales del estadio NF66, en los que el incremento alcanzó 0,6 veces respecto a los verificados en el estadio NF53.

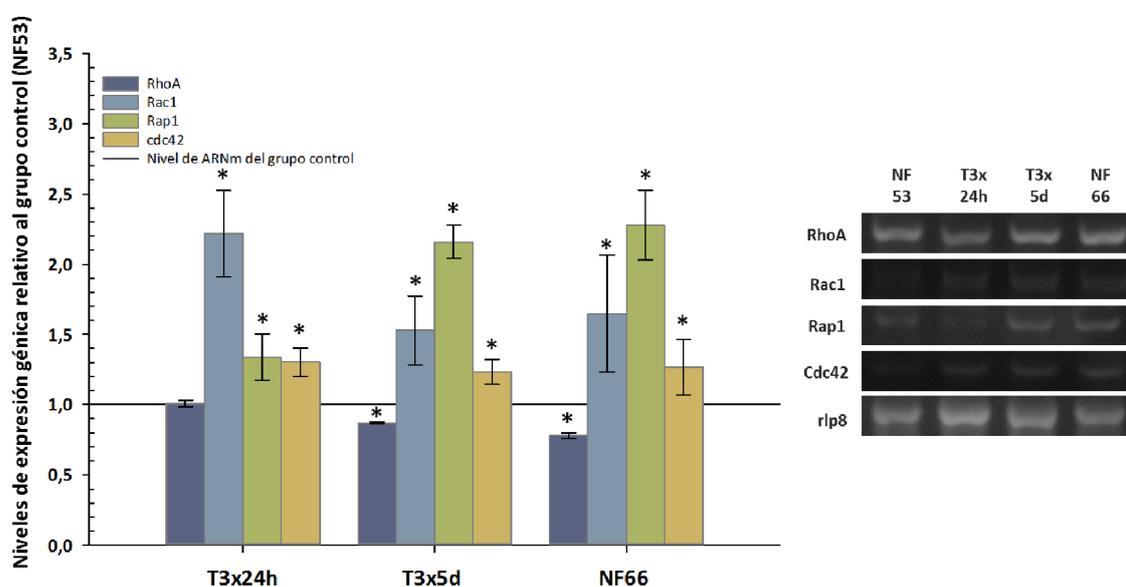


Figura 32. Niveles de expresión génica de las pequeñas GTPasas relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de *X. laevis* tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66). Los niveles de ARNm se determinaron por *sqRT-PCR* y se normalizaron en relación con los niveles del grupo control (NF53). El análisis estadístico se realizó calculando el intervalo de confianza del 95% del dato normalizado (barra de error) basado en Fay y Gerow (2013). Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control (NF53) ($p \leq 0,05$). El gen constitutivo *rlp8* se empleó como control interno y normalizador de cada reacción de *sqRT-PCR*.

En relación con Rap1, luego de 24 hs de tratamiento sus niveles de expresión resultaron 0,34 veces más altos y estadísticamente significativos respecto al estadio NF53. Dicha tendencia incremental se mantuvo a lo largo del tratamiento, alcanzando niveles significativos de 1,1 veces respecto al nivel de expresión del grupo inicial. Estos valores resultaron similares a los verificados en los animales que alcanzaron la metamorfosis naturalmente.

Los niveles de expresión de Cdc42 en los animales tratados con T3 durante 24 hs, muestran aumentos significativos de 0,3 veces respecto al grupo control, el cual se mantiene sin variaciones en los animales tratados con T3 durante 5 días y resultaron similares a los exhibidos en los animales del estadio NF66.

Adicionalmente se evaluó la respuesta de sendos GEFs y GAPs al tratamiento hormonal (Figura 33). Como se reportó para los animales control, tanto el GEF de Cdc42 (FRG) como el GAP de Rap1 (SPA1), no se detectaron en los tubos digestivos de animales tratados con T3, situación que se repitió en los animales que llegaron al final de la metamorfosis naturalmente y por lo tanto, no se representan en los histogramas correspondientes.

En relación a GEF18, luego de 24 hs de tratamiento, sus niveles de expresión mostraron un incremento significativo de 0,2 veces respecto al estadio NF53, mientras que en los animales tratados durante 5 días con T3 se incrementaron 0,5 veces. En los animales de estadio NF66 los niveles de este GEF exhibieron aumentos de 0,3 veces respecto al control inicial.

Los valores de expresión génica obtenidos para TIAM muestran incrementos de 0,14 veces respecto de los observados en el estadio NF53. Para esta molécula, dichos niveles de expresión en animales sometidos a 5 días de tratamiento con T3 se incrementaron 0,6 veces respecto de los niveles hallados en el estadio NF53. La expresión de TIAM en el estadio NF66, alcanza incrementos de prácticamente 0,5 veces respecto a los verificados en el estadio NF53.

Los niveles de expresión de C3G, al igual que en los animales control inicial, tampoco se detectaron en animales tratados por 24 hs con T3. Sin embargo, luego de 5 días de tratamiento, se verificaron incrementos de 0,33 veces respecto al grupo control. En los

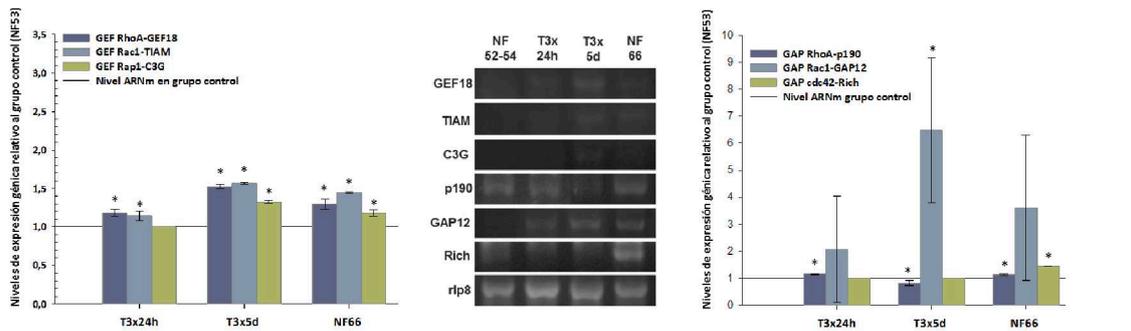


Figura 33. Niveles de expresión génica de los GEFs y GAPs relativos al grupo control (NF53) en tubos digestivos completos de larvas de *X. laevis* tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66). Los niveles de ARNm se determinaron por *sqRT*-PCR y fueron normalizados en relación con los niveles del grupo control (NF53). El análisis estadístico se realizó calculando el intervalo de confianza del 95% del dato normalizado (barra de error) basados en Fay y Gerow, (2013), los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control (NF53) ($p \leq 0,05$). El gen constitutivo *rlp8* fue usado como control interno y normalizador de cada reacción de *sqRT*-PCR.

animales que alcanzaron la metamorfosis naturalmente estos incrementos fueron levemente inferiores (0,2 veces).

Al analizar el efecto de T3 sobre los niveles de expresión de los GAPs, se observó que p190 exhibe incrementos significativos de 0,15 veces respecto a los animales de estadio NF53, mientras que caen en los animales tratados durante 5 días, mostrando decrementos de su expresión del orden de 0,17 veces. Al final de la metamorfosis, estos niveles son 0,13 veces mayores que los de los animales del estadio NF53.

En el caso de GAP12, luego de las 24 hs no se verificaron aumentos significativos en los niveles de expresión, mientras que luego de 5 días con T3 éstos alcanzaron 5,5 veces los del grupo control. En tubos digestivos de animales de estadio NF66 estos niveles no mostraron diferencias significativas con el grupo de estadio NF53.

No se detectó expresión génica de Rich1 en los animales tratados con T3, mientras que en los tubos digestivos de los animales que alcanzaron el final de la metamorfosis espontáneamente se detectó con niveles de aproximadamente 0,5 veces respecto a los animales de estadio NF53.

Como se indicó en la introducción, adicionalmente a la regulación de las GTPasas pequeñas por GEFs y GAPs, se suma la que depende de las modificaciones postraduccionales, tales como prenilación por adición de grupos farnesilo y geranilgeranilo. Éstos actúan como anclas lipídicas de estas proteínas a la membrana,

determinando su localización submembranosa en las zonas de unión. La enzima encargada de esta modificación es la transferasa geranil-geranilo (PGGT), miembro de la familia de las transferasas de grupos prenilo.

Debido a la función de la PGGT así como el rol de la organización del citoesqueleto en el establecimiento y mantenimiento de las UAs, para complementar el análisis, se determinó el efecto de la hormona T3, sobre los niveles de transcripción de la enzima responsable de las modificaciones de los extremos carboxilo de las GTPAsas pequeñas. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de expresión de ARP2, que codifica una de las proteínas integrantes del complejo Arp2/3. Tal como se indicó en la introducción, es ampliamente aceptado que este complejo está estrechamente relacionado con los procesos de ramificación de la actina-f cortical, crucial en el establecimiento de las UAs.

En primer lugar se determinaron los niveles de expresión basal de ambas moléculas. Los niveles de expresión de PGGT en tubos digestivos completos de animales del estadio NF53, fueron relativamente bajos, del orden de 8% respecto al gen rlp8; incrementándose a niveles del 36% respecto del gen control al finalizar la metamorfosis. En contraste, Arp2 en animales de estadio NF53 presentó niveles de expresión de casi un 80% respecto a los de rlp8, los cuales se mantienen prácticamente sin cambios en los animales de estadio NF66.

A continuación, se evaluó la respuesta a nivel transcripcional de estas moléculas ante el tratamiento con T3, por 24 hs y 5 días. Como puede observarse en la [Figura 34](#), la expresión génica de la enzima PGGT no mostró cambios significativos a las 24 hs con T3, mientras que a los 5 días de tratamiento se verificaron incrementos estadísticamente significativos que alcanzan valores hasta 6 veces superiores a los niveles del grupo control; los cuales, son similares a los detectados en los animales al final de la metamorfosis (NF66). Por otro lado, el gen ARP2 no respondió al tratamiento hormonal aplicado, manteniéndose sin cambios respecto al grupo control durante todo el tratamiento.

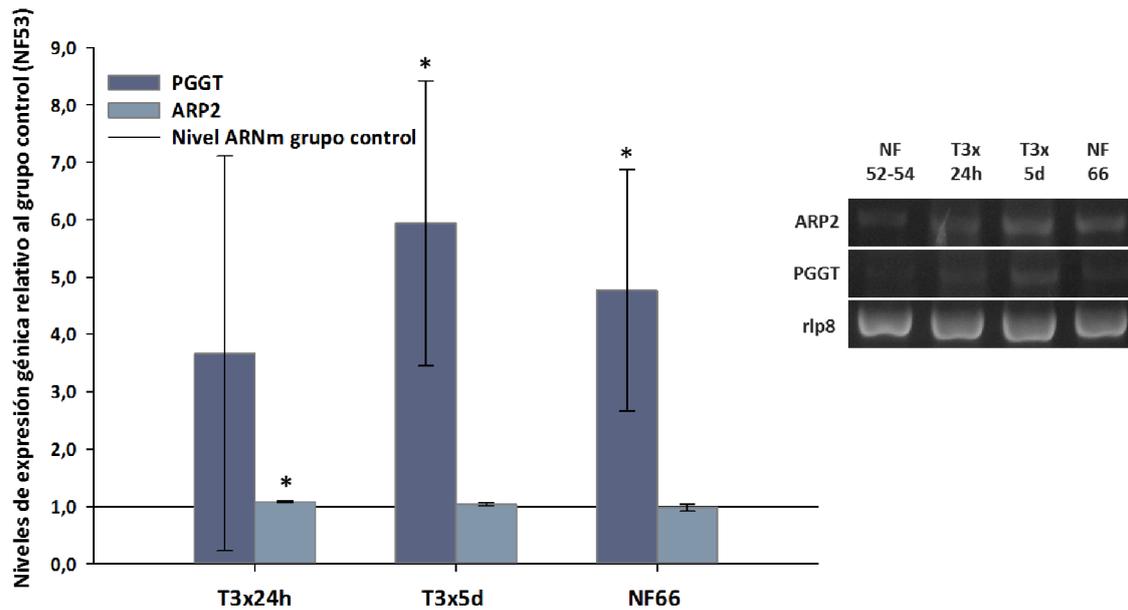


Figura 34. Niveles de expresión génica de PGGT y ARP2 relativos al grupo control (NF53), en tubos digestivos completos de larvas de *X. laevis* tratadas con T3 por 24 hs (T3x24h) y 5 días (T3x5d) y de animales metamorfoseados espontáneamente (NF66). Los niveles de ARNm se determinaron por *sqRT-PCR*, se normalizaron con los niveles del grupo control (NF53) y luego se analizaron estadísticamente mediante el cálculo del intervalo de confianza del 95% del dato normalizado (barra de error) basado en Fay y Gerow (2013). Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo control (NF53) ($p \leq 0.05$). Se empleó Rlp8 como gen de control interno y normalizador de cada reacción de *sqRT-PCR*.

7.2.4. Búsqueda de secuencias consenso de los ERTs en los genes estudiados a nivel transcripcional en *Xenopus*

Como se ha detallado en las secciones precedentes, se determinó que la transcripción de algunos de los genes estudiados en esta tesis, es regulada por T3. En algunos casos, dicha inducción se produce dentro de las 24 hs del tratamiento con T3 mientras que en otros la respuesta se da en los animales tratados durante 5 días. Los receptores de T3 son factores de transcripción que actúan sobre secuencias específicas denominadas elementos de respuesta directa a T3 (ERT), presentes en los genes que responden a esta hormona. Por este motivo y para corroborar la acción regulatoria de T3 sobre los genes estudiados, se rastreó la presencia de secuencias ERT en los mismos. Para ello, se realizó una búsqueda *in silico* basada en una PWM construida a partir de secuencias de ERTs conocidos en *Xenopus* (Das y col., 2009) (Figura 35). Si bien en la actualidad el genoma de *Xenopus laevis* está secuenciado completamente, ni los inicios de transcripción ni las regiones promotoras de los genes analizados en esta sección han

sido definidos. Por ello, tomando como referencia el inicio de la secuencia publicada en la Xenbase, se realizó la búsqueda de los ERTs putativos en la secuencia genómica, desde 5 kb corriente arriba a 10 kb corriente abajo de ese punto de referencia. Las secuencias génicas publicadas de las moléculas estudiadas, cuentan con fragmentos del 5' y 3'UTR y la región codificante completa, excepto la de cadherina E que sólo incluye las regiones codificantes (Figura 36).

De los genes de las moléculas que conforman las UAs y que ante el tratamiento con T3, exhiben cambios significativos en sus niveles de expresión génica, cadherina E, β -y α -

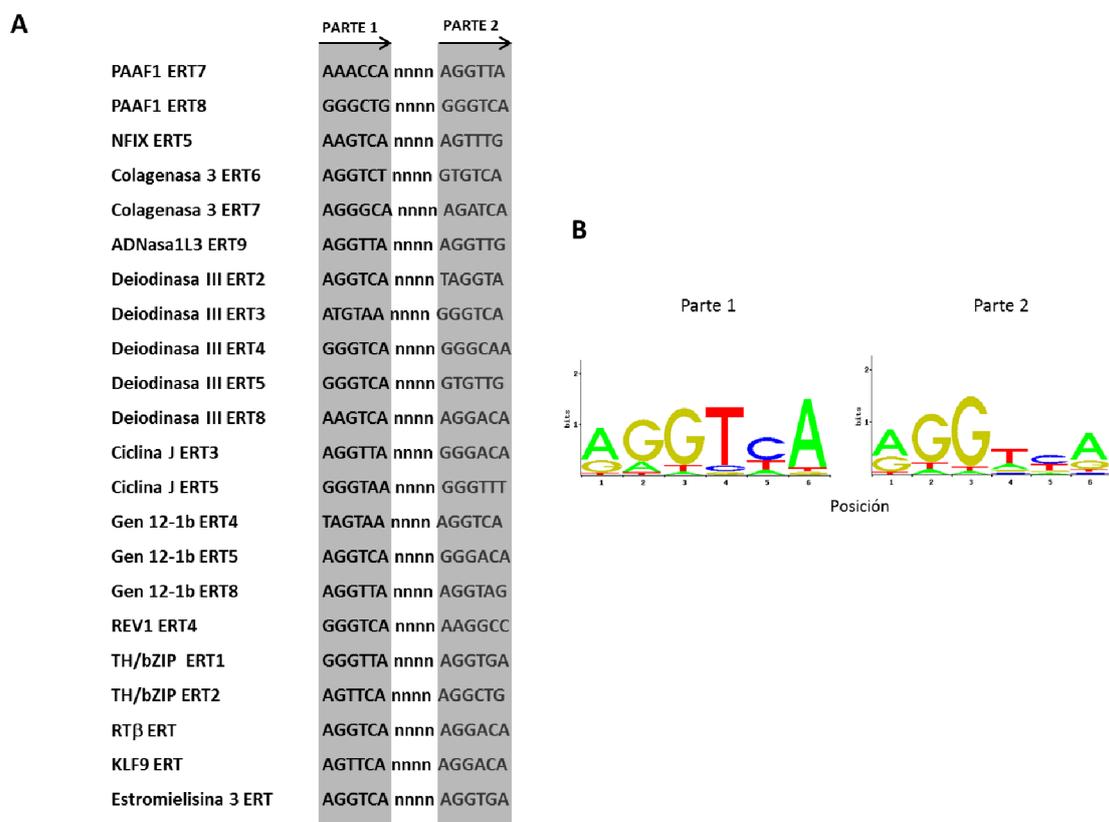


Figura 35. Secuencias consenso de los ERTs en genes de respuesta a T3 en *Xenopus*. **A.** Secuencias de 17 ERTs identificados experimentalmente en *X. tropicalis* y 5 en *X. laevis* (últimos 5 de la lista). **B.** Representación gráfica de la PWM generada a partir de las secuencias de A y utilizando el software INSECT. Las posiciones de los residuos en cada ERT se muestran en el eje horizontal y las frecuencias relativas de las 4 bases en cada posición, como bits de color en el eje vertical.

catenina presentan ERTs putativos (Ver Tabla 6 y Figura 36). En el caso de las moléculas de UEs, sólo ocludina presenta ERTs putativos. En contraste, la mayoría de las GTPasas pequeñas y las moléculas reguladoras estudiadas presentan ERTs putativos, a excepción del GEF de RhoA (GEF18) y el GAP de Cdc42 (Rich). Finalmente, no se identificaron ERTs putativos en los genes ARP2 y PGGT.

Tabla 6. Resumen de los resultados de la predicción de elementos de respuesta a T3

Molécula	Comportamiento respecto a T3*	ERTs putativos	Comparación con secuencia consenso <u>AGGTCAnnnnAGGTCA</u>	Ubicación	
UAs	Cadherina E	↑24h [⊗]	ERT	<u>TGAATInnnnTACCCT</u>	5'-UTR
	β-catenina	↑24h [⊗]	ERT	<u>ITACTInnnnCTACCT</u>	Intrón 1
	α-catenina	↑24h [⊗]	ERT1	<u>AGTITAnnnnAGGAGA</u>	5'-UTR
			ERT2	<u>AGTITAnnnnAGGATA</u>	Intrón 1
ERT3			<u>TGGTAAAnnnnGGGGTA</u>	Intrón 1	
p120	↑24h	No encontrado	-	-	
UEs	occludina	↑24h	ERT	<u>AAGCCAnnnnGGGGTA</u>	Intrón 1
	ZO1	↑5d	No encontrado	-	-
RhoA	RhoA	↓5d	ERT	<u>TGACTAnnnnTAGCCC</u>	5'-UTR
	GEF-GEF18	↑24h	No encontrado	-	-
	GAP-p190	↑24h	ERT	<u>TAAACTInnnnTAACAT</u>	5'-UTR
Rac1	Rac1	↑24h [⊗]	ERT	<u>TGAATInnnnAGACCC</u>	Intrón 1
	GEF-TIAM	↑24h	ERT1	<u>AGTITAnnnnAGGTGA</u>	5'-UTR
			ERT2	<u>AGTITAnnnnGGGCCA</u>	Intrón 2
	GAP-GAP12	↑5d	ERT1	<u>IAATCTInnnnITTCCT</u>	Intrón 1
ERT2			<u>ITAACTInnnnITACCC</u>	Intrón 1	
Rap1	Rap1	↑24h	ERT	<u>IAACTCnnnnCTACCT</u>	5'-UTR
	GEF-C3G	↑5d	ERT1	<u>GGTICAnnnnAGGGTA</u>	Intrón 1
			ERT2	<u>TGGCTInnnnTGTCCCT</u>	Intrón 1
GAP-SPA1	n/d	ERT	<u>AGGCAAnnnnAAGTTA</u>	Intrón 1	
Cdc42	Cdc42	↑24h	ERT	<u>ITACTInnnnGGACCT</u>	Intrón 1
	GEF-FRG	n/d	ERT	<u>GGTICAnnnnAGGAAA</u>	Intrón 2
	GAP-Rich	n/d	No encontrado	-	-
Otras	ARP2	↑24h	No encontrado	-	-
	PGGT	↑5d	No encontrado	-	-

*Se consideraron aquellos genes que mostraron cambios estadísticamente significativos respecto del control (NF53) ($p \leq 0,05$). Las diferencias significativas no necesariamente implican que cumplen con el umbral establecido para ser considerados genes de respuesta temprana ([⊗], ver discusión).

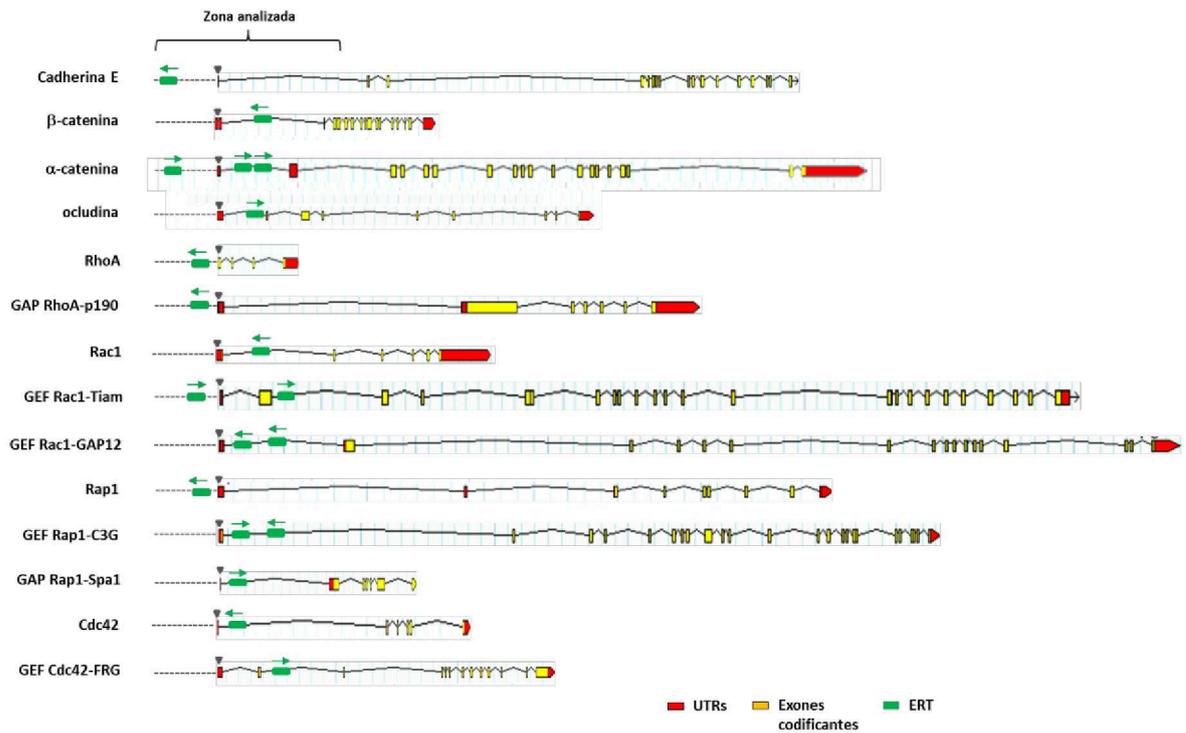


Figura 36. Resultados del análisis *in silico* del rastreo de secuencias génicas ERT. Representación esquemática de las secuencias publicadas en Xenbase de los genes en estudio, tomando como punto de referencia al primer nucleótido publicado (cabeza de flecha). Los ERTs encontrados se muestran como rectángulos verdes con una flecha superior indicando su orientación.

8. DISCUSIÓN

Las investigaciones de esta tesis de doctorado se desarrollaron con el objetivo de profundizar los hallazgos de nuestro grupo, en relación con los procesos de adhesión celular mediados por cadherina E, las moléculas que conforman el complejo de anclaje al citoesqueleto y algunas de las implicadas en la regulación de dichos complejos, durante el desarrollo metamórfico de anfibios anuros. En una primera etapa, los estudios se focalizaron en el intento de analizar el comportamiento de estas moléculas en una especie autóctona de anfibios, el sapo *Rhinella arenarum*. En particular, se intentaron corroborar mediante análisis de expresión génica, los estudios morfométricos desarrollados por Izaguirre (2003), los cuales mostraron las modificaciones en los patrones de expresión de cadherina E, β - y α -catenina en el epitelio del estómago de *R. arenarum*, tanto en condiciones normales como bajo tratamiento con HT.

Como objetivo general se planteó la demostración del rol fundamental que tiene el reclutamiento de cadherina E inducido por la HT, para el establecimiento de la polarización y diferenciación epitelial del tracto digestivo. En particular, resultó de interés determinar si cadherina E, β -, α -catenina y p120 son genes de respuesta temprana al estímulo desencadenado por la hormona T3, así como la incidencia de esta hormona sobre las UAs, la polarización y la diferenciación epitelial del tracto digestivo. Adicionalmente, para avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares de dichos procesos, se analizaron las vías de activación transcripcional diferencial de un grupo de GTPasas pequeñas, moduladoras del citoesqueleto celular asociado.

Debido a las dificultades encontradas en los estudios planificados originalmente con *R. arenarum*, la mayor parte de los estudios se completaron en *X. laevis*, una especie ampliamente utilizada en las investigaciones de biología del desarrollo.

Un organismo multicelular no es meramente una colección de tipos celulares aleatoriamente distribuidos. El desarrollo involucra no sólo la diferenciación celular, sino también su morfogénesis en arreglos multicelulares, tales como tejidos y órganos.

Cuando se observa la anatomía detallada de un tejido, claramente se distingue una organización intrincada y precisa de numerosos tipos celulares.

En los embriones de vertebrados hay esencialmente dos grupos de células: las epiteliales, las cuales están estrechamente conectadas entre sí formando láminas o tubos y las mesenquimatosas, que carecen de conexiones mutuas y operan como unidades individuales (Gilbert, 2000). La morfogénesis se produce a través de un repertorio limitado de procesos en estos tipos celulares: (1) número y dirección de las divisiones celulares; (2) cambios en la forma celular; (3) movimiento celular; (4) crecimiento celular; (5) muerte celular y (6) cambios en la composición de la membrana y la matriz extracelular.

Serían al menos dos las principales vías por las cuales las células se comunican entre sí para desencadenar la morfogénesis. La primera se da a través de sustancias difusibles, que son producidas por un tipo de células que actúan sobre otras. Estas sustancias incluyen hormonas, factores de crecimiento y morfógenos. La segunda, involucra el contacto entre las superficies de células adyacentes. Durante el período de organogénesis, tanto células individuales, como agrupadas, cambian sus posiciones relativas y se asocian con otros tipos celulares. Así, la formación de tejidos y órganos implica la interacción selectiva de células vecinas para crear los arreglos necesarios de los diferentes tipos celulares.

Los eventos moleculares que median el reconocimiento selectivo de las células y su formación en tejidos y órganos ocurren a nivel de la superficie celular. Mientras que el paradigma dominante de la genética del desarrollo es la expresión diferencial de los genes, el de la morfogénesis involucra la afinidad diferencial de las células. Estas afinidades pueden ser por la superficie de otras células o por las moléculas de la matriz extracelular.

Un epitelio simple es un rasgo conservado de todos los metazoos y es un tejido esencial para la multicelularidad organizada. Comprende una monocapa, que a menudo toma forma tubular, de células polarizadas que rodean un espacio luminal, separando el interior del organismo de su ambiente circundante. El citoesqueleto, las organelas citoplasmáticas y los dominios de la membrana plasmática están organizados asimétricamente, con la membrana plasmática apical limitando el lumen y

las membranas basolaterales que contactan con la matriz extracelular y las células vecinas (Gumbiner, 2005; Bryant y Mostov, 2008; Nelson y col., 2013). Los complejos de adhesión célula-célula mantienen juntas a las células epiteliales y una MEC rodea los tubos epiteliales. La ruptura de la polaridad epitelial y de la adhesión célula-célula causa defectos del desarrollo y diversas patologías en tejidos adultos (Watabe y col., 1994; Larue y col., 1994, 1996; Kane y col., 1996; Bullions y col., 1997; Torres y col., 1997; Benjamin y Nelson, 2008; Stepniak y col., 2009; Marchiando y col., 2010).

Los epitelios simples anteceden el origen de los metazoos y se cree constituyeron los primeros tejidos organizados en la evolución de los seres vivos. Al presente se postula la existencia de dos linajes diferentes de unicontes responsables del desarrollo independiente de la multicelularidad: los amoebozoos (eucariotas, tal como el moho del fango *Dictyostelium*) y los opistocontes (eucariotas, tales como metazoos, coanoflagelados y hongos). Entre los representantes actuales del primer linaje se ubica a *Dictyostelium discoideum*, un organismo que ante condiciones ambientales adversas desarrolla una punta de epitelio polarizado para formar un cuerpo fructífero, a partir del agregado de amebas (Dickinson y col., 2011). En el segundo linaje, el representante clave es el epitelio simple que constituye el tejido central de todos los metazoos. La cámara alimentaria de los poríferos (esponjas) está tapizada con un epitelio (coanodermo) conformado por coanocitos polarizados que direccionalmente absorbe nutrientes del agua (Leys y Hill, 2012) y los placozoos como *Trichoplax adhaerens* consistente de varios miles de células arregladas en una bicapa epitelial, de las cuales la lámina ventral es requerida para la absorción de nutrientes (Srivastava y col., 2008; Schierwater y col., 2009). En animales morfológicamente complejos como los mamíferos, los epitelios definen la arquitectura tisular y regulan funcionalmente diversos órganos tales como pulmón, estómago, intestino y riñones. Así, la formación de un epitelio polarizado simple es un requerimiento clave para la evolución de la multicelularidad organizada y la diversificación funcional de los tejidos (Cereijido y col., 2004).

Dado el rol evolutivo y funcional de los epitelios, el conocimiento de los mecanismos que rigen su estructura y su función son claves en la biología de los metazoos. Las células epiteliales se caracterizan por fuertes interacciones adhesivas célula-célula

mediadas por uniones, sitios adhesivos especializados en los cuales una variedad de glicoproteínas transmembrana establecen una interfaz con el citoesqueleto. Si bien cada tipo de unión tiene su propio mecanismo de formación, regulación y función, existe una amplia comunicación entre ellas, influenciándose mutuamente en su dinámica y propiedades de señalización. Entre los complejos de unión se encuentran las UAs dependientes de cadherinas, las cuales son cruciales para la organización general, dinámica y fuerza de los contactos intercelulares (Gumbiner y col., 1988; Perez-Moreno y Fuchs, 2006; Takai y col., 2008; Franke, 2009). En particular, cadherina E tiene un rol fundamental en la biogénesis epitelial, regulando específicamente la señalización celular y la formación de otras uniones. En vertebrados, la formación y mantenimiento de las UAs son reguladas por diversos factores, entre ellos las hormonas tiroideas (Izaguirre, 2003).

La hormona tiroidea T3, juega un papel muy importante en la diferenciación, desarrollo y metabolismo de la mayoría de los tejidos de los vertebrados. Actúa sobre las células diana a través de receptores nucleares, que son factores de transcripción dependientes de ligando, pertenecientes a la superfamilia de los receptores nucleares. Por lo tanto, T3 regula de forma directa la expresión de un número limitado de genes específicos.

Como se indicó precedentemente, la morfogénesis epitelial es un proceso que ha sido extensamente estudiado, desde diversas perspectivas y desde hace muchos años. Por un lado, la dinámica en la formación y el mantenimiento de las UAs es blanco de numerosos estudios, así como su interrelación con otros complejos de unión y con diversas vías de señalización intracelular involucradas en la determinación del fenotipo epitelial. Por otro lado, el rol que desempeña la hormona T3 en la diferenciación celular durante la morfogénesis de vertebrados también es el tema de trabajo de numerosos investigadores. En esta tesis se obtuvieron resultados en un sistema *in vivo*, que se cree ayudarán a la comprensión del complejo entramado de moléculas y vías de señalización que intervienen de manera sincronizada para la determinación del fenotipo epitelial durante la organogénesis.

8.1. Secuencia nucleotídica de β -catenina de *Rhinella arenarum*

Rhinella arenarum ha sido utilizado en Argentina en diversos campos de investigación (fisiología, histología, embriología, ecotoxicología, etc.) a partir de la década del 40', desde el primer premio Nobel argentino Bernardo Houssay (Houssay y col., 1942) hasta prestigiosos grupos de la actualidad (Ferrari y col., 2009; Rosenbaum y col., 2012; Toranzo y col., 2014, Jungblut y col., 2012). Desde hace varios años, esta especie ha sido seleccionada por nuestro grupo como uno de los modelos experimentales de estudio de los procesos de adhesión celular ya que, entre otras características, posee desarrollo embrionario y larval externo, así como un tamaño adecuado para realizar estudios del desarrollo y morfométricos. Desde el comienzo de este trabajo de tesis, uno de los principales obstáculos emergentes consistió en la carencia de datos genómicos de la especie. Sin embargo, a pesar de esta dificultad, se decidió continuar trabajando con ella, no solo para avanzar con los estudios, sino también porque a nivel mundial existe consenso que es necesario realizar estudios sistemáticos utilizando modelos de organismos alternativos, morfológicamente divergentes, ya que el uso de un pequeño número de modelos animales tradicionales resulta insuficiente para la comprensión de la evolución de la diversidad morfológica y genética de los seres vivos (Carroll y col, 2001; Xavier-Neto y Behringer, 2005; Behringer y col, 2006; Rojas-Cartagena y col., 2007; Philipp y Kimble, 2009; Sun y col, 2011). La posibilidad de aportar datos de esta especie, es importante para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a las diferencias morfológicas entre especies.

Para intentar obtener las secuencias, o parte de ellas, de los ARNms de las moléculas que forman los complejos de adhesión célula-célula, se elaboró una estrategia bioinformática de diseño de cebadores para dos moléculas claves: cadherina E y β -catenina. Dicho procedimiento se basó principalmente en la secuencia de *Xenopus laevis*, especie filogenéticamente cercana a *R. arenarum*. De los intentos realizados con estas dos moléculas, sólo se obtuvo un fragmento del ADNc de β -catenina.

El producto obtenido por PCR, fue secuenciado y comparado con los homólogos de ocho vertebrados, mostrando un alto nivel de identidad (Galetto y col., 2012). La comparación de los ARNms de β -catenina con los de varias especies, muestra que el tamaño de la región codificante exhibe un alto grado de similitud entre ellas, aunque

difieren los tamaños de los extremos 5' y 3' no codificantes. El ADNc de β -catenina de *Xenopus laevis* tiene 3.445 pb de los que, 249 pb corresponden al UTR-5', 850 pb al UTR-3' mientras que la secuencia codificante está comprendida entre las bases 250 y 2.595, codificando una proteína de 781 residuos de aminoácidos (McCrea y col., 1991).

La secuencia de β -catenina resultó altamente conservada, con una región N-terminal de aproximadamente 130 residuos de aminoácidos, una región central de 550 con 12 repeticiones armadillo (ARM), y una región C-terminal de 100 residuos de aminoácidos (Huber y col., 1997; Xing y col., 2008). La secuencia de *Rhinella arenarum* obtenida (aminoácidos 9 al 185), incluye casi completamente la región N-terminal y la primera repetición armadillo de β -catenina. Ambos segmentos son cruciales para mediar las interacciones proteína-proteína e incluyen el sitio de unión a α -catenina, a través del residuo Tyr-142; los sitios de ubiquitinación/acetilación de Lys-19 y Lys-49 y un motivo de fosforilación consenso de la glucógeno sintetasa quinasa 3 β (GSK3). Esta región de β -catenina habilita su función de andamio para interacciones multiproteicas (Aberle y col., 1994; Hulsken y col., 1994; Pai y col., 1996; Fukata y col., 1999; Huber y Weis, 2001). La secuencia entre la región N-terminal y la primera repetición armadillo (aminoácidos 118 a 146) es el sitio de unión a α -catenina (Aberle y col., 1994, 1996.), que según los resultados bioinformáticos obtenidos en esta tesis, exhiben un 100% de conservación entre las diferentes especies analizadas. En esta secuencia se encuentra el residuo Tyr-142, esencial tanto para la interacción con α -catenina (Aberle y col., 1996; Piedra y col., 2003), como para la estabilización del complejo de β -catenina/ α -catenina. Asimismo, se determinó que su fosforilación mediada por las tirosinas quinasas Fer o Fyn, impide la formación del complejo entre dichas cateninas (Pokutta y Weis, 2000; Piedra y col., 2003). Se sabe además, que los sitios de ubiquitinación/acetilación Lys-19 y Lys-49 y el motivo de fosforilación consenso de GSK3 están altamente conservados e implicados en la degradación de β -catenina por la vía de la ubiquitina-proteasoma, la cual a su vez estaría involucrada en la regulación de la vía canónica de señalización Wnt (Aberle y col., 1997; Wolf y col., 2002; Winer y col., 2006; Ge y col., 2009). Adicionalmente al residuo de Tyr-142, la región N-terminal de vertebrados posee el residuo Tyr-86, que en la secuencia obtenida para *R. arenarum* es reemplazado por un residuo fenilalanina (Phe). Este hallazgo resultó de especial

interés ya que Roura y col. (1999) demostraron que el cambio de dicho aminoácido no modifica la unión entre β -catenina y cadherina E, al emplear estudios *in vitro* con mutantes puntuales Tyr-86→Phe. Si bien Tyr-86 es un buen sustrato para pp60c-src, su cambio por fenilalanina no modifica significativamente la interacción con cadherina E, mostrando constantes de asociación y afinidad similares a las de tipo salvaje. Posteriormente, Hu y col. (2001) sugirieron que la fosforilación de Tyr-86 en la proximidad del sitio de unión a α -catenina, disminuiría la afinidad entre ambas cateninas, aunque esta hipótesis no pudo ser corroborada (Piedra y col., 2003).

Adicionalmente, en la secuencia de *R. arenarum*, se observaron otros cambios de aminoácidos respecto a la secuencia consenso de vertebrados, tales como Glu-53→Asp y Glu-77→Asp, los cuales podrían no tener efectos sobre la función de β -catenina, debido a que ambos aminoácidos presentan propiedades similares. A diferencia de los cambios anteriores, la sustitución de Ser-73→Pro también detectada debería ser estudiada más profundamente. Sin embargo, a pesar que su implicancia deberá ser analizada, se puede hipotetizar que dicho cambio no tendría efectos sobre la estructura y funcionabilidad de la proteína ya que, si bien la pérdida de un residuo serina podría tener efectos por ser un potencial blanco de quinasas, no hay reportes que indiquen que Ser-73 sea uno de ellos. Por el contrario, los residuos Ser-33, 37, 45 y Thr-41, son sitios de fosforilación de la GSK-3 y se encuentran conservados desde *Drosophila* a humanos (Peifer y col., 1994; Liu y col., 2002), incluyendo a *R. arenarum*. La mutación que resultó en la sustitución del residuo Ser-73 por Pro, posee una muy alta probabilidad de ocurrencia ya que podría ser el fruto de una mutación puntual, esto es, la sustitución de una única base en el codón de Ser, que pudo resultar en la producción de uno para Pro. Esto es así ya que cualquiera de los cuatro codones para Ser (UCU, UCC, UCA, UCG) puede mutar a codones para Pro (CCU, CCC, CCA, CCG), por una única mutación de transición.

La obtención de esta secuencia de β -catenina de *R. arenarum* permitió avanzar con el estudio de sus niveles transcripcionales, tanto en condiciones de metamorfosis espontánea como inducida por hormona T3 exógena.

β -Catenina es una molécula muy importante en diversos procesos celulares, cualquier alteración en su estructura, funcionalidad o localización intracelular tiene la

potencialidad de desencadenar numerosas malformaciones durante la embriogénesis, como alteraciones en el mantenimiento normal de los tejidos y carcinogénesis, entre otras patologías (McCrea y col., 1993, Izaguirre y col., 2001; Varallo y col., 2003; Bowley y col., 2007; Jamieson y col., 2012).

Debido a estas razones, β -catenina es considerada como una molécula central de numerosos estudios estructurales y funcionales, cuyos objetivos están focalizados en desentrañar la cascada de eventos que regulan la morfología y funcionamiento normal de los tejidos animales. En este contexto, la secuencia de β -catenina obtenida en esta tesis constituye un aporte sustancial que confirma algunas de las hipótesis sobre la actividad de esta molécula y al mismo tiempo, abre el escenario futuro de líneas de análisis aún no exploradas.

En los últimos años y con el advenimiento de numerosas herramientas bioinformáticas, se dió especial importancia al estudio del origen evolutivo de β -catenina. Si bien dentro de los metazoos esta molécula exhibe un alto grado de conservación, experimentó cambios en algunos linajes, particularmente por duplicación génica. Así, se postula que en vertebrados y a partir de un ancestro común con el resto de metazoos no vertebrados, γ -catenina se habría originado por duplicación del gen de β -catenina. Se hipotetiza que γ -catenina podría tener roles diferentes a β -catenina, tanto en la señalización de la vía Wnt (Maeda y col., 2004) como en su función adhesiva, ya que en los Dms frecuentemente se encuentra vinculando desmogleínas y desmocolinas al citoesqueleto y sólo en algunos sistemas tisulares en las UAs junto a β -catenina (Witcher y col., 1996; Williams y col., 2000; Schneider y col., 2003). Por otro lado, en los nematodos *Caenorhabditis elegans* y *C. briggsae* se detectó una duplicación génica que se postula habría originado tres ortólogos de β -catenina, denominados BAR-1, WRM-1 y HMP-2. Cada una de estas moléculas habría retenido una única función de las presentes en las β -cateninas ancestrales. BAR-1 y WRM-1 cumplirían funciones en la vía Wnt, mientras que HMP-2 retendría su rol en la integración de los complejos adhesivos (Korswagen y col., 2000; Natarajan y col., 2001; Zhao y col., 2011).

A partir de estos hallazgos, algunos autores sugieren que un único gen de β -catenina en el último ancestro común de los metazoos, cerca de 700 millones de años atrás,

habría cumplido funciones tanto en los procesos de adhesión célula-célula, como en los de señalización, postulándose que en ciertas especies, sus duplicaciones habrían facilitado su evolución, dotándola de nuevas funciones no caracterizadas completamente (Schneider y col., 2003).

Hasta el año 2000, numerosos estudios estructurales y funcionales realizados sobre β -catenina sugerían que esta proteína es exclusiva de los metazoos. En la actualidad, estudios realizados en protistas unicelulares como *Dictyostelium discoideum* aportan nuevas evidencias que sugieren su presencia predatando la aparición de las cadherinas y sugiriendo una función primitiva implicada en la adquisición temporal de uniones entre organismos unicelulares. Como se indicó previamente, *Dictyostelium* es capaz de formar cuerpos fructíferos en condiciones limitantes, a partir de procesos morfogénicos que llevan a la formación de un epitelio polarizado, para el cual α - y β -catenina serían esenciales. En este organismo no se detectaron cadherinas clásicas ni proteínas de polaridad o de la vía de señalización Wnt (Grimson y col., 2000; Coates y col., 2002; Dickinson y col., 2011). Estos antecedentes permiten ubicar a β -catenina como una molécula clave para dilucidar la transición hacia la pluricelularidad de los metazoos. Además de las β -cateninas de metazoos, se encontraron potenciales homólogos en otros organismos, tales como las proteínas Arabidillo-1 y -2 de *Arabidopsis thaliana* (Coates, 2003) y Volcadraf-41528 del alga verde *Volvox carteri* (Prochnik y col., 2010). Ambas moléculas pertenecientes al Reino Vegetal y la proteína vac8p de *Saccharomyces cerevisiae* del Reino Fungi (Wang y col., 1998), sugiriendo que β -catenina pudo haber existido en el último ancestro común que dio origen a algas verdes, plantas, hongos y animales.

8.2. Evaluación del modelo de inducción en anfibios

Para evaluar el efecto de la hormona T3 sobre los complejos de UAs del epitelio estomacal, se aplicó un modelo de inducción a la metamorfosis, sometiendo a la acción de la hormona T3 exógena, a larvas premetamórficas de dos especies de anfibios, *Rhinella arenarum* y *Xenopus laevis*.

Los resultados demuestran claramente que la metamorfosis de estos anuros es dependiente de esta hormona. El tratamiento con T3 durante 5 días produjo una

profunda remodelación craneal, el desarrollo de los miembros posteriores y una extensa remodelación y acortamiento del tubo digestivo. Se obtuvo una disminución significativa de las longitudes total, de la región cabeza y tronco así como de la cola de los renacuajos, aunque la reabsorción completa de esta última no se produjo, con la magnitud observada en la metamorfosis espontánea. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos previamente (Tata, 1968; Dodd y Dodd, 1976; Shi y Hayes, 1994; Izaguirre, 2003; Ishizuya Oka y col., 2003; Buchholz y col., 2003 y 2007; Das y col., 2006; Fu y col., 2007). Adicionalmente, las larvas exhibieron importantes cambios morfológicos en sus extremidades posteriores, pasando de una estructura sin divisiones a un miembro articulado como el de los ejemplares adultos, con sus cinco dígitos completamente diferenciados.

La reabsorción de la cola, es el último de los cambios experimentados por los renacuajos en el clímax metamórfico, donde los niveles de hormona alcanzan los picos máximos. En los modelos de inducción aplicados en esta tesis, las larvas no reabsorbieron completamente su cola, probablemente por la concentración de hormona empleada y/o el tiempo de tratamiento aplicado. Este comportamiento refleja claramente que el efecto de la T3 es dependiente del órgano, así como del estadio del desarrollo y crecimiento (Shi, 2000). Según Smith y Tata (1976), la reabsorción inducida por T3 en renacuajos premetamórficos requiere un período de aproximadamente dos días, en presencia de 50 a 500 nM de hormona, es decir concentraciones superiores a las utilizadas en este trabajo de tesis.

Se verificó a su vez, que las dimensiones del tubo digestivo se reducen notablemente, tanto en diámetro como en longitud. Si bien dicha disminución no alcanzó los niveles producidos durante la metamorfosis espontánea, los cambios respecto al control son notables y significativos. El acortamiento abrupto del intestino de anuros durante la metamorfosis se ha documentado previamente. Dicha reducción varía según las especies, con rangos que van desde 58% para *Rana temporaria* (Janes, 1934) hasta valores máximos de 85% en *Rhinella arenarum* (Izaguirre, 2003) y 90% en *Alytes obstetricans* (Dauca y Hourdry, 1985). Para *Xenopus laevis* los valores reportados son del 58% y 76% a los 5 y 7 días de tratamiento con T3 10 nm respectivamente, siendo el segundo valor del orden de la reducción encontrada en la metamorfosis espontánea

(Schreiber y col., 2005). Ambas variables resultan superiores a las utilizadas en esta tesis. Además de la reducción de la longitud del tubo digestivo, el diámetro también decrece, lo cual se corresponde con el acortamiento de las fibras musculares individuales (Schreiber y col., 2005) y expresan respuestas comparables a las obtenidas por Izaguirre (2003) en *Rhinella arenarum* y por Schreiber y col. (2005) en *Xenopus laevis*.

Estos resultados permitieron comprobar la efectividad del tratamiento. Aún cuando las condiciones ensayadas no llevaron a una metamorfosis completa, no quedan dudas que indujeron la iniciación precoz del proceso, promoviendo profundos cambios tanto en órganos externos como internos.

Como se expresó previamente, la remodelación del tubo digestivo durante la metamorfosis es un excelente modelo para analizar el control diferencial sobre los procesos moleculares que llevan a la transición de un epitelio larval a uno adulto. Dicha remodelación implica procesos biológicos bien establecidos como proliferación y diferenciación celular, como así también la remoción de una fracción de los tejidos larvales por muerte celular programada (Shi e Ishizuya-Oka, 1996; Ishizuya-Oka y Ueda, 1996; Tata, 1994; Ishizuya-Oka y col., 1998; Shi, 2000).

El análisis histológico del tejido estomacal de *Xenopus laevis* correspondiente a los controles sin tratamiento, mostró las características típicas de cada estadio. Así, en larvas de estadio NF53 se observó un epitelio superficial pseudoestratificado regionalmente ciliado, debajo del cual se ubican el epitelio glandular, una delgada capa de tejido muscular y una túnica serosa. En este estadio no se indentifican la submucosa ni la muscular de la mucosa. Contrastando con esta histología, en el estómago de las larvas que se encuentran finalizando la metamorfosis espontánea (NF66) se distinguen cambios drásticos, tales como numerosos plegamientos epiteliales con desarrollo de una mucosa, con las características de un epitelio gástrico adulto (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 2003). Estos resultados son concordantes con descripciones reportadas previamente para esta especie (Fox y col., 1972; Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1989; Chalmers y col., 1998; Ishizuya-Oka y col., 1998; Smith y col., 2000; Lametschwandtner y col., 2012). Los cambios histológicos se acompañan de cambios funcionales, tales como la síntesis de pepsinógeno activo en el

epitelio glandular y gránulos de mucígeno en las células superficiales hacia el final de la metamorfosis (Ishizuya-Oka y Shimosawa, 1990; Onimuna y col., 1991; Ishizuya-Oka y col., 1998).

Los cambios morfológicos del epitelio estomacal en el punto experimental de 24hs incluyen regiones con células sufriendo procesos de muerte celular programada y concomitantemente, células en división. Asimismo, se verificó un engrosamiento de las capas muscular y serosa. En los animales sometidos a 5 días de tratamiento, aún pueden observarse células apoptóticas así como procesos proliferativos en los tejidos glándular, muscular y conectivo. Aun cuando todas las capas muestran un engrosamiento, no se observa un desarrollo completo de la capa submucosa, ni de la muscular de la mucosa. Esta progresión temporal del proceso de remodelación inducido por T3, se corresponde con el observado por Ishizuya-Oka y col. (1998) durante la metamorfosis espontánea, principalmente en estadios cercanos al climax metamórfico (~NF60).

Si se considera el desarrollo de la capa muscular de la mucosa, se observa que el tejido a los 5 días adquiere características de un tejido gástrico de estadios cercanos al NF63. De estudios ultraestructurales se conoce que esta capa comienza a desarrollarse recién en ese punto de la metamorfosis, a partir del cual se observa una diferenciación tipológica y morfológica de las células de la lámina propia y de la submucosa (Ishizuya-Oka y Shimosawa, 1989). En función de estas observaciones, se hipotetiza que el desarrollo de la muscular de la mucosa influenciaría la diferenciación del tejido conectivo subyacente.

A su vez, en concordancia con los resultados obtenidos en esta tesis, los ensayos de inducción con T3 realizados sobre cultivos de explantes de estómago, mostraron una remodelación gradual a partir de los 7 días. Se requirió un período de tratamiento mayor para observar la sustitución total de las células epiteliales larvales por las juveniles y la disminución de las células apoptóticas (Ishizuya-Oka y col., 1998).

Estos antecedentes indicarían que para provocar una remodelación completa del tracto digestivo de anuros, se requiere extender los tiempos de tratamiento. Sin embargo, si bien el tratamiento durante 5 días con T3 no promueve la remodelación completa de los tejidos gástricos, claramente se verifica una tendencia que lleva hacia

su consecución, induciendo una importante remodelación, semejante a la observada durante la metamorfosis espontánea.

No menos importante, es el hecho que los cambios observados en el tratamiento aplicado son concordantes con el interesante y altamente aceptado modelo actual, sobre los mecanismos y fenotipos celulares que intervienen en la remodelación del tejido epitelial del tubo digestivo (Hasebe y col., 2013).

Como ya se ha expresado, los mecanismos moleculares y los genes involucrados en la metamorfosis dependiente de T3 sólo han sido extensivamente estudiados a nivel intestinal. El intestino larval de *Xenopus* es una estructura tubular sencilla, compuesto por una monocapa de células epiteliales larvales con escaso desarrollo de los tejidos conjuntivo y muscular, excepto en la zona que presenta un único pliegue, el tiflosol, donde el tejido conectivo es abundante (McAvoy y Dixon, 1977; Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1987; Shi e Ishizuya-Oka, 1996) (Figura 37A).

Hasta hace relativamente poco tiempo, la secuencia de eventos y los tipos celulares que intervienen en el reemplazo del epitelio larval por el adulto ha sido fuente de controversias. Mientras que Schreiber y col. (2005) postularon que las células progenitoras del epitelio adulto derivan de un grupo de células epiteliales larvales, Ishizuya-Oka y Shi (2005) propusieron que este tejido deriva de una subpoblación de células madres adultas localizadas entre el epitelio larval y el tejido conectivo. En la actualidad, el grupo de Shi propone una teoría integradora y que explica mejor la coexistencia de eventos altamente antagónicos. Dicha teoría sostiene que algunas células epiteliales larvales escapan de la muerte celular y bajo la acción de T3, se desdiferencian adoptando las características de las células madres adultas, las que por proliferación y diferenciación posterior originan un epitelio con múltiples pliegues, rodeado de una capa de tejido conectivo y una muscular prominentes (Figura 37B) (Ishizuya-Oka y col., 2009; Hasebe y col., 2013). Dicho proceso guarda grandes similitudes con el que sucede en el intestino postembrionario murino, durante su maduración dependiente de HT (Ishizuya-Oka y Shi, 2011; Shi y col., 2011). Como se observa en el tejido gástrico, también a nivel intestinal se incrementa el grosor de los tejidos conectivo y muscular (McAvoy y Dixon, 1977; Shi y Ishizuya-Oka, 1996; Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1987).

Los mecanismos por los cuales T3 induce estos cambios a nivel intestinal, se discuten desde fines de los años 90' en varios trabajos. En éstos, se sostiene que las transformaciones son dependientes de las interacciones de los tejidos involucrados, especialmente los que se dan en la interfaz de los tejidos epitelial y conectivo (Ishizuya-Oka y Simozawa, 1992; 1994) y entre el tejido epitelial y la matriz extracelular (Vulkicevic y col., 1992; Brown y Yamada, 1995; Werb y col., 1996).

A nivel molecular, los eventos que llevan a la remodelación intestinal pueden clarificarse evaluando las funciones de los genes intestinales de respuesta a HT. Dadas

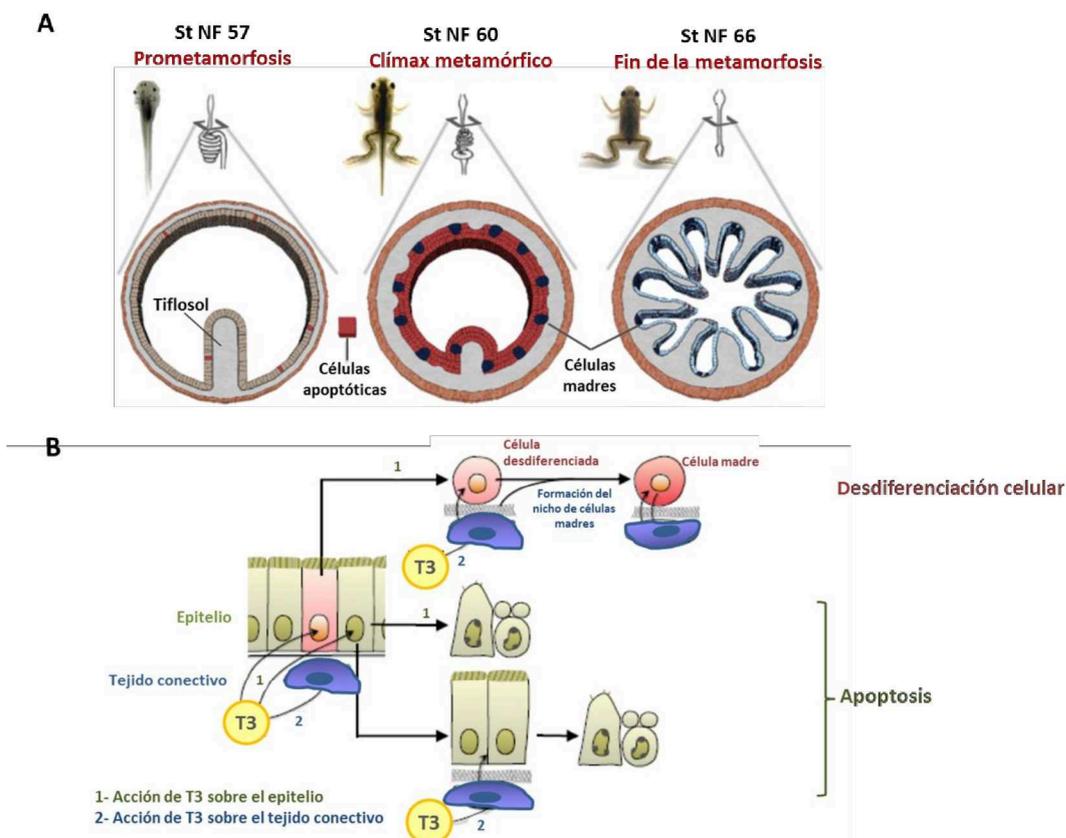


Figura 37. A. La ilustración muestra los cambios del intestino de las larvas de *X. laevis* durante la metamorfosis. Las capas de tejido conectivo y muscular (marrón) se engrosan durante la remodelación, mientras que las células epiteliales larvales sufren apoptosis o desdiferenciación a células progenitoras adultas (azul oscuro), las cuales rápidamente proliferan para formar el epitelio superficial adulto. Durante la prometamorfosis (NF57) el intestino se compone principalmente de una monocapa de células epiteliales larvales con escaso tejido conjuntivo y muscular, excepto en el tifosol. En el inicio del clímax (NF 60), la mayor parte de las células epiteliales larvales mueren por apoptosis. Al final de la metamorfosis (NF 66), se forma el epitelio adulto con múltiples pliegues. **B. Modelo propuesto sobre el rol de T3 durante la remodelación del intestino de *Xenopus laevis*.** Durante la metamorfosis, T3 actúa directamente (1) en el epitelio de las larvas así como (2) en el resto de los tejidos intestinales, induciendo muerte celular programada. Un pequeño número de células dentro del epitelio se desdiferencian al recibir la señal de T3 para producir células progenitoras proliferantes. Adicionalmente, T3 induce la remodelación de la matriz extracelular, promoviendo interacciones célula-célula y célula-matriz, que promueven la formación de los nichos de células madre que originarán las células epiteliales adultas. Adaptada de Hasebe y col., 2013.

las similitudes antes mencionadas entre la remodelación los epitelios intestinal y gástrico de *X. laevis*, es evidente que podrían estar regidos por mecanismos semejantes.

En el intestino de *X. laevis* se aislaron varios genes de respuesta a HT (Shi y Brown 1993; Amano y col., 1998; Shimizu y col., 2002; Bulcholz y col., 2007). La acción de T3 se demostró tanto sobre el epitelio, como sobre el resto de los tejidos intestinales, principalmente sobre el tejido conectivo subyacente y también para la formación de células madre adultas. A partir de los estudios de Ishizuya-Oka y Shimosawa (1992), se postuló la existencia de interrelaciones entre células epiteliales y conectivas durante el desarrollo inducido por T3. Dicha suposición se basó en el gran desarrollo del retículo endoplásmico de los fibroblastos presentes en primordios epiteliales adultos proliferantes, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos hallazgos llevaron a considerar la posibilidad de que los fibroblastos secretasen algún(os) factor(es) clave(s) para el desarrollo del epitelio adulto. El análisis por inmunohistoquímica de los genes inducidos por T3, mostró posteriormente que los perfiles de expresión de la proteína morfogenética ósea (BMP-4) se correlaciona estrechamente tanto espacial como temporalmente, con la presencia de los fibroblastos (Ishizuya-Oka y col., 2001a). Se observaron máximos niveles de expresión génica de BMP-4 cuando los primordios proliferan activamente, disminuyendo conforme avanza la diferenciación. Los estudios preliminares de los efectos de BMP-4 en células en cultivo, sugieren que desempeña un papel importante en la diferenciación de primordios epiteliales adultos en el epitelio intestinal. A su vez, estudios empleando intestino embrionario de aves demostraron que la proteína *sonic hedgehog* (Shh) secretada por el endodermo induce la expresión mesenquimática de BMP-4 (Roberts y col., 1995, 1998; Sukegawa y col., 2000). En *X. laevis* la expresión postembrionaria de BMP-4 no estaría regulada positivamente directamente por HT, sino a través de un(os) factor(es) epitelial(es) no determinado(s) (Ishizuya-Oka et al., 2001b). En contarste, se encontró que en *Xenopus* la expresión de Shh se encuentra bajo la regulación directa de HT en el epitelio adulto (Shi y Brown, 1993; Stelow y Shi, 1995) y exhibe elevados niveles de expresión en los primordios epiteliales adultos (Ishizuya-Oka y col., 2001b). Evaluados en conjunto estos hechos, se deduce que la HT regula positivamente la expresión de Shh, el cual a

su vez induce la expresión de BMP-4 en los fibroblastos subepiteliales, los cuales secretarían factor(es) clave(s) para el desarrollo del epitelio adulto. Como soporte a esta secuencia de eventos, se demostró que la adición de Shh exógeno al medio de cultivo celular de *X. laevis*, promueve la proliferación celular epitelial y del tejido conectivo (Ishizuya-Oka y col., 2001b). Por lo tanto, la vía de señalización Shh/BMP juega un papel clave en las interacciones de los tejidos epitelial y conectivo, esenciales para el desarrollo del epitelio adulto durante la remodelación intestinal.

Ishizuya-Oka y col. (2003) analizaron en el intestino *X. laevis*, la expresión de Musashi-1 (Msi-1), un marcador de células madre epiteliales de mamíferos y demostraron que su expresión está regulada positivamente por HT. Así, mientras su expresión es débil en el epitelio de las larvas aumenta significativamente en células progenitoras del epitelio adulto (Ishizuya-Oka y col., 2003; Schreiber y col., 2005). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que, las células madres progenitoras del epitelio adulto de anfibios son análogas a las presentes en el intestino de mamíferos, sugiriendo que la regulación del desarrollo de estas células madres intestinales se encuentra altamente conservada. Adicionalmente, los autores sostienen que los bajos niveles de ARNm-Msi-1 en el epitelio larval premetamórfico, son consistentes con el hecho de que estas células parcialmente diferenciadas podrían tornarse proliferativas por desdiferenciación y finalmente originar las células progenitoras adultas.

Diversos estudios demostraron a su vez, que en el inicio de la remodelación metamórfica intestinal, se produce un aumento de permeabilidad de la lámina basal y de la degradación de la matriz extracelular circundante, debido a la participación de metaloproteinasas de matriz (MPM), tales como colagenasas, gelatinasas y estromelisinias (Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1987; Woessner, 1991; Matrisian, 1992;. Birkedal-Hansen y col., 1993; Barret y col., 2004; McCawley y Matrisian, 2001; Fu y col., 2007). Como consecuencia, aumentan los contactos celulares entre los primordios epiteliales adultos y el tejido conectivo (Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1987) y progresa la remodelación del órgano.

De los genes de MMPs identificados previamente como de respuesta a HT, la estromelisinina-3 (ST3 o MMP-11) es el único cuya expresión se correlaciona estrechamente tanto espacial, como temporalmente con el inicio de la remodelación

epitelial y la modificación de la lámina basal (Patterton y col., 1995; Stolow y col., 1996; Damjanovski y col., 1999). Experimentos *in vivo e in vitro* demostraron que ST3 interviene en la remodelación epitelial, aunque sus efectos sobre el epitelio aún no se determinaron. Recientemente, se identificó que una proteína receptora de laminina (67 kDa) presente en la lámina basal es un sustrato de la ST3 (Amano y col., 2005a, b). De acuerdo a estos resultados, un posible escenario sería que la HT induzca la expresión específica de ST3 en el tejido conectivo, que a su vez alteraría las interacciones epiteliales: célula-MEC por escisión del receptor de laminina, provocando la transducción de señales que conduce a cambios celulares en los epitelios larvales.

Si bien los mecanismos de remodelación del tubo digestivo durante la metamorfosis se estudiaron extensivamente (Duesberg, 1906; Bowenrs, 1909; Swingle, 1918; Kuntz, 1924; Lambertini, 1929; Blacher y col., 1931; Janes, 1934; Barrington, 1946; Griffiths, 1961; Shi, 2000; Ishizuya-Oka y Shi, 2005; Ishizuya-Oka y col., 2009; Heimeier y col., 2010; Sirakov y Plateroti, 2011), el análisis de las interacciones celulares mediadas por moléculas adhesivas ha sido escasamente abordado. Estas interacciones resultan críticas para llevar a cabo movimientos morfogenéticos de intercalación, ingresión, egresión y migración celular, que en conjunto conducen a la remodelación del epitelio gástrico.

Por este motivo, se hipotetizó que dichos procesos dependen de manera crítica del ensamble y desensamble del sistema de adhesión célula-célula mediado por cadherinas (Schock y Perrimon, 2002; Izaguirre, 2003). En función de este postulado, y para profundizar el estudio, se propuso analizar el efecto del tratamiento con T3 sobre la ultraestructura de los complejos de unión intercelular. En los epitelios polarizados, la presencia del complejo tripartito apical (UE, UA y Dm), descrito originalmente por Farquhar y Palade (1963), es una característica de su madurez funcional, ya que no sólo garantizan la adhesión entre células sino que se erigen como barrera epitelial y determinante de la polaridad y funcionalidad (Knust y col., 2002).

Si bien la morfología ultraestructural de las UAs son similares entre diferentes especies animales (Harris y Tepass, 2010), existen escasos estudios *in vivo* que analicen la

remodelación de las UAs ultraestructuralmente. En particular, no se encontraron reportes que las estudien a este nivel durante la metamorfosis de anuros.

En los estadios control (NF53 y NF66) se observó la presencia de los tres tipos de unión, con características morfológicas y morfométricas similares a las reportadas en la bibliografía. En las micrografías electrónicas de transmisión, las UEs se observan como una serie de contactos puntuales, descritos en la bibliografía como "besos" (Cereijido y col., 1993; Fujimoto, 1995). Dicha morfología se condice con la hallada al analizar la estructura intramembrana mediante la técnica de microscopía electrónica de congelación y fractura, donde los contactos célula-célula coinciden con filas de partículas que forman fibrillas ramificadas alrededor de cada célula. Además, la microscopía inmunoelectrónica reveló agregados lineales de la proteína transmembrana ocludina dentro de las fibrillas, las cuales parecen asociarse entre las células y sellar el espacio paracelular (Fujimoto, 1995). Cada contacto o barrera lineal, es probable que contribuya a la resistencia en la vía paracelular porque cuando se comparan tejidos, el número de fibrillas se correlaciona con la resistencia eléctrica y la impedancia paracelular (Claude, 1978; Reuss, 1991).

Las UAs del epitelio gástrico de los animales control exhibieron una morfología similar a la descrita por Farquhar y Palade (1963). Esta región presenta las membranas de células vecinas dispuestas paralelamente, extendiéndose por distancias de 0,2 a 0,5 μm de longitud, mientras que el espacio intermembrana está en el rango reportado para estas uniones (entre 150 y 300Å) (Farquhar y Palade, 1963; Fawcett y McNutt, 1969; McNutt y Weinstein, 1973; Miyaguchi, 2000). Llamativamente, dichos valores de espacio intermembrana coinciden con los reportados por Harrison y col. (2011), al estudiar por cristalografía los ectodominios completos de las cadherinas clásicas E, N y C. Estas estructuras cristalográficas revelaron la organización extracelular de las UAs, las cuales presentan una capa molecular ensamblada a través de dos interfaces: una mediante interacciones *trans* por el intercambio de cadenas entre los dominios EC1 de cadherinas opuestas y una interfaz lateral *cis*, en la que una superficie de dominio EC1 diferente interactúa con una región del dominio EC2 de una molécula vecina. La geometría de esta capa molecular es consistente con la teoría de que las cadherinas adhesivas emanan de membranas opuestas y sugiere una separación intermembrana

de 185 a 262 Å. Es probable que estos valores correspondan a un rango continuo de posibles distancias intermembrana, ya que el modelado molecular mostró que la diferencia en el espaciado entre las tres cadherinas se debe a la curvatura de los ectodominios, la cual probablemente sea variable a pesar de la rigidización por la unión del calcio en las regiones interdominio. En el mismo trabajo, utilizando liposomas recubiertos con ectodominios de cadherinas, se evaluaron las estructuras establecidas por microscopía electrónica, observando un arreglo consistente con la disposición reticular exhibida por los cristales.

En los últimos años, se realizaron grandes esfuerzos para dilucidar el mecanismo por el cual los monómeros de cadherina E se organizan en clústeres en las UAs. Mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica, se estimó que la densidad de moléculas está en el rango de 14-24 moléculas/100 nm² (Hirokawa y Heuser, 1981; Miyaguchi, 2000; McGill y col., 2009). Utilizando técnicas de microscopía de superresolución, en combinación con mutaciones funcionales que alteran la estructura de cadherina E, se determinó que las moléculas se agrupan en clústeres de aproximadamente cinco moléculas. Éstos se establecen independientemente que las interacciones sean *cis* o *trans*, están delimitados por un mallado de actina F cortical y son los precursores de uniones adhesivas *trans* que finalmente componen la UA madura. Estos datos indican que las UAs tienen una organización heterogénea en clústeres de cadherinas, distribuidos a través de la zona de unión (Wu y col., 2015). Esta organización modular puede ser importante para la rápida reorganización de las UAs durante la morfogénesis (Harris y Tepass, 2011; Wu y col., 2015).

Los Dms de los animales control (NF53 y NF66) también exhiben una morfología característica. Su estructura es electrodensa, altamente organizada y de menos de 1 µm de diámetro. Presentan una región central que se extiende por el espacio intercelular entre las células opuestas, separando dos placas citoplasmáticas idénticas asociadas con la red de filamentos intermedios. Por estudios de microscopía electrónica se ha establecido que el espacio intermembrana de los Dms es de aproximadamente 34 nm (Al-Amoudi y col., 2004). En dichos espacios se observan puentes cruzados que se extienden hacia la membrana plasmática en la línea media densa (Rayns y col., 1969). Esta línea sería el resultado de la disposición altamente

organizada de los dominios extracelulares de las cadherinas desmosómicas (Garrod y col., 2005). Estos ectodominios además de exhibir ordenamiento en el plano Z, muestran arreglos en las direcciones X e Y. A su alrededor, el material electrodenso muestra un patrón punteado que describe una matriz cuadrículada. Estudios ulteriores demostraron, mediante modelado por homología de las cadherinas desmosómicas (Boggon y col., 2002), que esta disposición semicristalina proporciona un modelo racional del material intercelular de los Dms en las direcciones X, Z e Y (Garrod y col., 2005).

A nivel morfométrico, se encontraron diferencias porcentuales en la cantidad y distribución de Dms entre los estadios control, observándose incrementos del orden del 26% al final del clímax metamórfico. En el estadio premetamórfico (NF53), además de la escasez de zonas epiteliales con Dms, cuando están presentes, en su mayoría se encuentran ubicados alejados de las UEs - UAs y en consecuencia, los complejos tripartitos apicales son proporcionalmente escasos. Por el contrario, al finalizar la metamorfosis espontánea, el 80% de las zonas analizadas exhiben el complejo apical característico. Si bien el epitelio larval es funcional en el estadio NF53, el mismo se encuentra en un proceso de diferenciación dinámico y por lo tanto, requiere un alto grado de flexibilidad y maleabilidad en términos de la motilidad celular hasta completar su desarrollo (Garrod y Chidgey, 2008). Los Dms son las uniones tisulares que les confieren estabilidad y resistencia al estrés mecánico al que están sometidos (Garrod y Chidgey, 2008; Desai y col., 2009). Este conjunto de hechos, resulta coherente con los resultados observados en esta tesis. Adicionalmente, se ha reportado que en algunos epitelios de órganos en desarrollo, como el de los túbulos renales, los componentes desmosómicos se expresan muy tempranamente, aunque su morfología posee una organización rudimentaria. Esto sugiere que para facilitar las modificaciones de los contactos célula-célula, la adhesión mediada por los Dms sería lábil durante la morfogénesis, proporcionando la movilidad celular requerida para que se completen los procesos organogénicos (Garrod y Fleming, 1990). Más recientemente Garrod y Kimura (2008) demostraron que conforme avanza el desarrollo los Dms de la epidermis murina, pasan de una configuración flexible, dependiente de calcio, a una independiente de este catión, corroborando que la

morfología de este tipo de uniones cambia durante el desarrollo de los órganos según los requerimientos funcionales.

De la literatura revisada, excepto el trabajo pionero de Decker (1976) en el que demuestra la inducción de la formación de las uniones en hendidura mediadas por T3, no se encontraron reportes que evalúen dicho efecto sobre los complejos de unión. En este sentido, los hallazgos de esta tesis constituyen uno de los escasos estudios que demuestran importantes cambios en el complejo tripartito apical, luego del tratamiento con esta hormona.

A partir de las 24 hs se observó un aumento significativo del espacio intermembrana de las UAs y una disminución aún mayor de las zonas con Dms. Esto último, como ya se discutió precedentemente, es característico de los epitelios en desarrollo, en los que las células deben poseer un elevado grado de movilidad para completar la organogénesis. En los epitelios de los animales sometidos al tratamiento hormonal durante 5 días, las zonas con UAs disminuyen, pero la amplitud de los espacios intermembrana de las que se logran visualizar, poseen valores similares a los encontrados en controles del final de la metamorfosis (NF66). Paralelamente, las regiones en las que se encuentran los Dms aumentan, indicando que el tejido se encuentra en estado avanzado de remodelación, adquiriendo las características de los epitelios maduros con la totalidad de sus complejos de unión. A diferencia de lo observado en las UAs y los Dms, las UEs no exhiben cambios significativos con el tratamiento.

Utilizando agregados de liposomas recubiertos con ectodominios de cadherina E del tipo salvaje, Harrison y col. (2011) realizaron un extenso estudio cristalográfico de la arquitectura extracelular de las UAs. En dicho estudio, pese a que en estas estructuras artificiales las moléculas de cadherina se posicionan periódicamente de forma análoga a la disposición encontrada en las estructuras cristalinas, exhiben espacios intermembrana entre 300 y 340 Å, valores que resultan mayores a los que se observan en los estudios cristalográficos. Los autores atribuyen dicha diferencia a la presencia de un segmento de la región extracelular desordenado, aunque también podría especularse sobre artefactos resultantes de las técnicas de preparación. Adicionalmente, utilizando mutantes incapaces de formar interacciones *cis*, las

micrografías mostraron un material electrodenso, sin rasgos identificables, en el espacio entre los liposomas adherentes. Esto contrasta con las estructuras ordenadas observadas en la unión cuando los liposomas fueron recubiertos con proteínas de tipo salvaje. La distancia intermembrana fue mayor para los liposomas adherentes con cadherinas mutantes, lo que indicaría que las cadherinas mutantes son incapaces de formar estructuras ordenadas.

La capacidad de las uniones adhesivas para resistir las fuerzas de tensión, constituye una función central de las cadherinas clásicas. Así, mediante mediciones de fuerza-distancia se identificaron tres tipos de interacciones adhesivas cadherina-cadherina (Sivasankar y col., 2001; Zhu y col., 2003). Dos de ellas son consistentes con los datos biofísicos y ultraestructurales existentes. Mientras las distancias de 39 nm son consistentes con la configuración de dímeros de *intercambio de cadena* bajo tensión (Sotomayor y Schulten, 2008), las de 32 nm son distancias geoméricamente consistentes con la conformación de los denominados *dímeros X* (Leckband y Prakasam 2006; Hong y col., 2011). Se postula que ambas conformaciones de dimerización estarían involucradas con la remodelación dinámica de las UAs, siendo cruciales tanto para los procesos morfogénéticos normales, como patológicos. Los trabajos de Hong y col. (2011), demostraron que las interacciones de *intercambio de cadena* conforman fuertes uniones adhesivas entre las cadherinas que conducen a conexiones intercelulares firmes. Por el contrario, para el desensamble de las UAs, las cadherinas se reconfigurarían estructuralmente adoptando una disposición de *dímero X*. Se postula que la transición entre ambas configuraciones estaría controlada por las fuerzas de tracción intercelulares y/o por la alineación lateral de cadherinas.

En los estudios morfométricos desarrollados en la presente tesis, las distancias intercelulares observadas luego de 24 hs de tratamiento con T3, se encuentran en el rango de las reportadas para la conformación de *dímeros X*, implicadas en el desensamble de las UAs. Estos análisis permiten concluir, que el aumento del espacio intermembrana de las UAs a las 24 hs de tratamiento con T3, representan procesos de reconfiguración estructural de las regiones extracelulares, seguidos del desensamblaje del complejo adhesivo, fenómeno que se corrobora en los epitelios de los animales tratados durante 5 días, en los que disminuyeron las zonas con UAs.

En este sentido, es sabido que una de las características de las UAs es el dinamismo con que pueden reconfigurarse, tanto en *in vivo* como *in vitro* (Fujita y col., 2002; Pilot y col., 2006; Carvey y col., 2008; de Beco y col., 2009). Estas uniones se ensamblan, desensamblan y rearreglan en función de una variedad de situaciones. Un mecanismo clave para la modulación de las fuerzas de adhesión, se basaría en la concentración molecular de cadherina en la membrana plasmática. Estos niveles son función del equilibrio entre los procesos de endocitosis-degradación que conducen a su remoción (Le y col., 1999; Cano y col., 2000) y los de síntesis-reciclado que aumentan el *pool* de cadherina disponible en la membrana plasmática (Yanagisawa y col., 2004).

Los procesos de endocitosis de cadherina fueron descritos inicialmente en células endoteliales sometidas a estrés oxidativo o depleción de calcio extracelular (Alexander y col., 1998; Kevil y col., 1998). Numerosos estudios posteriores permitieron generalizar este proceso como mecanismo responsable de la remodelación y/o el desensamblaje de las UAs en diversos tipos celulares y en distintos organismos modelo. En los últimos años se verificaron importantes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados (Bryant y Stow, 2004; D'Souza-Schorey, 2005; Ivanov y col., 2005; de Beco y col., 2012; Kowalczyk y Nanes, 2012). La endocitosis de cadherina desempeña un rol fundamental en procesos fisiológicos. Por ejemplo, en células mitóticas se ha probado que permite la modificación de su morfología al disminuir el *pool* de esta molécula en las uniones (y en consecuencia la adhesión), aunque manteniéndose constante el *pool* celular total (Bauer y col., 1998).

Quizás uno de los mejores ejemplos de la importancia de la endocitosis de cadherina y su implicancia sobre la regulación dinámica de las UAs, sea la determinación de los patrones celulares durante la organogénesis. Si bien inicialmente se postuló que esta regulación depende fundamentalmente del tipo de cadherina funcional (Nose y col., 1988), posteriormente se demostró que también está regida por la variación de los niveles de cadherinas funcionales (Steinberg y Takeichi, 1994). Ejemplos típicos de regulación por endocitosis de cadherinas lo constituyen, la internalización acaecida durante la gastrulación en una variedad de organismos (Oda y col., 1998; Ogata y col., 2007), los procesos de transición epitelio-mesénquima (Miller y McClay, 1997) o el desarrollo del sistema nervioso (Kawauchi y col., 2010). Otro proceso en el que la

endocitosis es clave, es el establecimiento de la polaridad planar de las células. Por ejemplo, la extensión convergente en embriones de *Xenopus*, implica la regulación coordinada de cadherina C en respuesta a señales de inducción mesodérmica (Brieher y Gumbiner, 1994; Zhong y col., 1999, Jarrett col., 2002). Un proceso similar se reportó para cadherina DE de *Drosophila* durante la extensión de la banda germinal (Levayer y col., 2011).

En el presente modelo de remodelación gástrica inducida por T3 exógena, la endocitosis parece desempeñar un papel importante, como lo demuestran las imágenes de las regiones próximas a las UAs, en las que se observan numerosas vesículas asociadas a la membrana plasmática en las UAs de los animales tratados durante 24 hs y 5 días. La regulación hormonal sobre estos procesos no es un hecho inusual, como lo demuestran los reportes que analizan una serie de vías de señalización por factores de crecimiento, que regulan la endocitosis de cadherina. Entre los principales se incluyen los factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Kamei y col., 1999), de crecimiento epitelial (EGF) (Lu y col., 2003; Bryant y col., 2007; Orlichenko y col., 2009), de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Gavard y Gutkind, 2006), de crecimiento fibroblástico (FGF) (Bryant y col., 2005) y de crecimiento transformante β (TGF- β) (Janda y col., 2006; Xia y col., 2009).

Otro aspecto importante, emergente del presente estudio ultraestructural, es la verificación del mantenimiento de las UEs en los epitelios de los animales sometidos a la inducción con T3, a pesar de la extensa remodelación que sufre el estómago durante la metamorfosis. Esto podría explicarse por el hecho de que el epitelio continúa siendo funcional y por lo tanto, mientras se produce la reorganización tisular, se debe mantener la integridad epitelial. La función esencial del epitelio que recubre el tubo digestivo, es la de mantener una barrera entre el lumen y los tejidos internos. Así, una única capa de células epiteliales es la responsable de este rol y el espacio entre las células epiteliales adyacentes está sellado por las uniones estrechas, principales determinantes de dicha función (Marchiando y col., 2010). Resultados similares se reportaron durante el constante recambio de células superficiales del epitelio intestinal, donde se observa una redistribución de ZO-1 y ocludina en la membrana basolateral, definiendo los sitios de mantenimiento de barrera (Madara, 1990;

Marchiando y col., 2011), lo que es soportado por el comportamiento de plasticidad estructural de las UEs descrito por Shen y col., (2008).

En concordancia con lo observado tanto a nivel anatómico como histológico, la evaluación ultraestructural demuestra una incompleta maduración de las uniones, cuando se las compara con lo observado en las del estadio NF66. Sin embargo, puede verificarse una clara respuesta al tratamiento con T3, presentando una remodelación tanto de las UAs como de los Dms. Así, se propone que en una primera respuesta a T3 (24 hs) disminuirían los contactos adhesivos entre las células epiteliales, tanto por disminución de Dms, como por aumento de la distancia intercelular e intensificación de los procesos de endocitosis de cadherinas en las UAs. Esto último podría darse ya sea por desensamblaje parcial o por la reorganización más laxa de las UAs. Frente a la estimulación prolongada con T3 (5 días), las uniones madurarían, aumentando la fuerza adhesiva y la función de barrera, gracias al incremento de complejos tripartitos apicales, lo que constituye un parámetro del establecimiento de la polaridad del epitelio adulto (Vestweber y col., 1987; Gumbiner y Simons, 1987; Nejsun y Nelson, 2007).

Al presente, no se ha podido clarificar completamente la posible interrelación que se daría entre los complejos de unión durante los procesos de remodelación y mantenimiento de los tejidos epiteliales y los reportes en este sentido resultan controvertidos. En los estudios iniciales que intentaron correlacionar estos procesos se reportó que cadherina E, además del montaje de las UAs, está implicada en el de otros complejos de unión, tales como los Dms, las UEs y las uniones de hendidura (Gumbiner y col., 1988). Esto permitió postular que esta actividad de cadherina E está relacionada con la función de las UAs en el establecimiento de la polaridad celular (Tunggal y col., 2005). Los hallazgos presentados en esta tesis, muestran que el tratamiento con T3 produce cambios estructurales en las UAs y los Dms, pero no en las UEs. En concordancia con estos hallazgos, Schneider y col. (2010) demostraron que la pérdida de cadherina E no afecta la ultraestructura de las UEs, pero se traduce en pérdida de desmosomas. No obstante, en epitelios como la piel, donde la función de cadherina E en la homeostasis del epitelio ha sido mejor estudiada (Young y col., 2003; Tinkle y col., 2004; Tunggal y col., 2005; Gumbiner y col., 1988), se probó que su pérdida puede

producir alteraciones en la diferenciación (Young y col., 2003), perturbación de la integridad de la epidermis (Tinkle y col., 2004) o muerte por deshidratación de ratones poco después del nacimiento (Tunggal y col., 2005). Sin embargo, la razón de estas diferencias en la organización y función de la epidermis por la ausencia de cadherina E y su correlación con los resultados hallados en el epitelio del tubo digestivo no es clara. Se puede especular que las diferencias se basan en el estadio del desarrollo en el que fueron realizados los estudios como así también debido a las diferencias estructurales y funcionales de dichos tejidos.

8.3. Regulación transcripcional de los complejos de UAs

La estrecha correlación existente entre la respuesta al tratamiento hormonal con T3 y los cambios anatómico-histológicos, así como los evidenciados ultraestructuralmente en las variables morfométricas del tubo digestivo, sugirieron la formación y remodelación de UAs. Por este motivo, se continuó con los estudios del modelo, evaluando los posibles cambios en la expresión génica de las principales moléculas que intervienen en dichas uniones, ya que como se expresó precedentemente, la biosíntesis de éstas es parte del sistema de regulación del establecimiento, reorganización y mantenimiento de las UAs.

Desde el descubrimiento del rol de la hormona tiroidea en la metamorfosis de anfibios, el interés en comprender cómo un único factor puede afectar tan dramáticamente la regulación de una amplia variedad de diferentes programas del desarrollo en vertebrados, no ha dejado de crecer. El posterior descubrimiento que el efecto de la HT está mediado por la unión a receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción (Weinberger y col., 1986), llevó a que los estudios del efecto de T3 se focalizasen en las variaciones en la expresión génica en respuesta a los cambios hormonales.

Aunque algunos de los genes que se encuentran bajo el control de la HT se identificaron por hibridación sustractiva (Wang y Brown, 1991), los estudios funcionales de la expresión génica durante la metamorfosis cobraron un fuerte impulso con el desarrollo de la transgénesis en 1997 (Kroll y Amaya, 1996). Los experimentos con organismos transgénicos confirmaron que los diversos programas de la metamorfosis, se disparan por intervención de los mismos receptores

hormonales (Schreiber y col., 2001). A partir de estos estudios pioneros, la identificación de los genes sometidos a la regulación por T3, se convirtió en un desafío para desentrañar la función que cumplen en los eventos tisulares que ocurren en los tejidos blancos de su acción.

Para evaluar el efecto de T3 sobre los niveles de expresión génica de las moléculas de interés, en primer lugar se evaluó tanto la sensibilidad de la técnica de *sqRT-PCR*, como la respuesta del sistema de inducción, empleando dos genes reconocidos por su respuesta a la hormona, RT β e I-FABP.

El gen que codifica al receptor RT β , es de respuesta directa a T3 en los tejidos intestinales de *X. laevis* (Ranjan y col., 1994; Shi e Ishizuya-Oka, 1997; Buchholz y col., 2007). Esto es, no sólo responde dentro de las 24 horas posteriores a la inducción, sino que además no requiere de la síntesis de proteínas intermediarias para su actividad. Así, excepto la presencia de los factores generales de transcripción, su inducción sólo implica la unión del receptor alfa de la hormona (RT α) en la secuencia de unión, denominada elemento de respuesta a T3 (ERT) del gen (Kanamori y Brown, 1992; Wang y Brown, 1993; Shi, 2000).

En los tejidos gástricos estudiados, se verificó un incremento de los niveles de expresión génica para RT β de aproximadamente el 50% a las 24 hs de tratamiento con T3, valores similares a los publicados previamente para el tejido intestinal, utilizando técnicas semejantes (Buchholz y col., 2007). Por el contrario, el gen codificante de I-FABP responde negativamente a T3, durante la remodelación del epitelio intestinal (Shi y Hayes, 1994). Así, los niveles de expresión génica disminuyeron en un 40% en el epitelio gastrointestinal de los animales tratados con T3 durante 5 días, reflejando los datos publicados previamente (Shi y Hayes, 1994). La evaluación de ambos genes permitió verificar la correcta respuesta a nivel molecular del modelo de inducción aplicado, así como confirmar que la sensibilidad de la técnica utilizada para la determinación de los niveles de ARNm objeto de estudio es adecuada.

Para determinar si el efecto de la hormona induce tempramente los genes, se fijó un valor umbral, considerándose que un gen es regulado de este modo por T3, si sus niveles, además de ser significativamente diferentes de los niveles basales (NF53), exhiben incrementos o disminuciones mayores o iguales al 50%. Dicho valor se fijó

tomando como parámetro el del gen de respuesta directa, RT β , que como se indicó en el párrafo anterior, mostró incrementos de esa magnitud. Éstos son comparables a los aceptados en la comunidad científica para evaluar genes de respuesta temprana a T3 en anfibios (Das y col., 2006; Buchholz y col., 2007; Heimeier y col., 2010).

Si bien la existencia de una respuesta transcripcional positiva por el tratamiento con T3 no necesariamente significa un incremento de los niveles de la proteína funcional, al menos permite sugerir la existencia de una relación directamente proporcional entre los niveles de ARNm y los de la proteína activa, aunque dicha hipótesis deberá ser confirmada con estudios complementarios. En estudios recientes se postuló que los cambios en los niveles de expresión génica, son determinantes de la dinámica de proteínas en diversos escenarios (Li y col., 2014; Li y Biggin, 2015). Así, los estudios de Jovanovic y col. (2015) relacionados con la cinética de las proteínas y la expresión génica en células dendríticas de médula ósea de ratón estimuladas con lipopolisacáridos (LPS), probaron que los cambios en su proteoma se correlacionan con la abundancia de los ARNms correspondientes. En este estudio se concluye que la regulación de los niveles de ARNm garantizan las funciones específicas requeridas en respuesta a un estímulo, en el caso particular de esta tesis, la hormona T3. En tal sentido, grandes incrementos de los porcentajes de ARNms se acompañan de aumentos en los niveles de la proteína.

La evaluación de los niveles de expresión génica de las moléculas de las UAs en *Xenopus laevis*, así como los de β -catenina en *Rhinella arenarum*, permitieron confirmar las hipótesis planteadas en trabajos previos del grupo, en los cuales a partir de datos inmunohistoquímicos se observó una clara respuesta positiva a T3, por parte de cadherina E, β - y α -catenina. En función de estos resultados, se postuló que los tres son genes de respuesta temprana a la hormona (Izaguirre y col., 2008; Izaguirre y Casco, 2010; Izaguirre y col., 2010). Tanto cadherina E como α - y β -catenina de los tubos digestivos de *Xenopus*, exhibieron incrementos significativos y superiores al 50% de los transcritos a las 24hs de tratamiento con T3, demostrando ser genes de respuesta temprana a esta hormona. Estos niveles se mantienen a lo largo del período analizado, excepto en el caso de β -catenina que alcanza su máximo nivel a los 5 días de tratamiento. Por el contrario, los niveles de p120 no mostraron cambios significativos

(Ver **Tabla 7**). En *Rhinella arenarum* también se logró demostrar una respuesta temprana de β -catenina a la hormona.

En conjunto, estos resultados prueban que para iniciar los procesos de remodelación epitelial gástrica, incluyendo renovación celular, se requiere la síntesis *de novo* de las moléculas estructurales de las UAs. Así, las nuevas células epiteliales adultas deben migrar hacia la superficie del tejido y una vez allí, establecer los contactos adhesivos desencadenando procesos de polarización celular. Si bien existen varios reportes indicando que T3 controla la expresión de un gran número de genes durante la metamorfosis de anfibios (Yen y col., 2003; Das y col., 2006; Schreiber, 2001) y la proliferación de las células epiteliales intestinales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Ishizuya Oka y col., 1998; 2003; Ikuzawa y col., 2005; Schreiber y col., 2005; Bhuchholz y col., 2007) al presente, no se conocen estudios que analicen la expresión génica de las moléculas que participan en la formación de las UAs en este contexto tisular. En este sentido, éste sería el primer reporte que establece el control transcripcional mediado por T3 *in vivo* de los genes codificantes de las principales moléculas que participan de las UAs epiteliales en anfibios.

Tabla 7. Resumen efecto de T3 sobre moléculas de UAs

Molécula	Respuestas a T3 estadísticamente significativas*		Gen de respuesta temprana ^ψ
	24h	5d	
Cadherina E	↑	↑	si
β -Catenina	↑	↑↑	si
α -Catenina	↑	↑	si
p120	↑	-	no

*Diferencias significativas respecto del grupo control NF53 ($p \leq 0,05$). La doble flecha representa mayores niveles de expresión.

^ψLas diferencias superan el 50% del nivel en el grupo control NF53.

Los resultados obtenidos, corroboran hallazgos previos de nuestro grupo, en los que se analizaron los niveles de expresión de las proteínas que conforman el complejo adhesivo dependiente de cadherina E, en un modelo de inducción con T3 en *Rhinella arenarum*. En dichos estudios se observó que la inducción hormonal provoca el incremento de la expresión de cadherina E, β - y α -catenina, los cuales se correlacionan estrechamente con el aumento del tamaño celular, en los distintos estratos celulares del estómago larval. Dichos cambios resultaron semejantes a lo que ocurre en las larvas que metamorfosean espontáneamente. Los estudios de Izaguirre (2003)

demonstraron que estas moléculas se encuentran localizadas en los epitelios gástricos, tanto superficiales como glandulares, resultando superiores, en el primero. Adicionalmente, en estos estudios se probó que β - y α -catenina se expresan también en las capas de musculo liso, asociadas a otras cadherinas. Se determinó que los niveles de β -catenina resultan superiores a los que exhiben cadherina E y α -catenina, en todos los tipos celulares analizados. La inducción con T3 provocó aumentos de los niveles proteicos, principalmente en el epitelio superficial, al igual que lo que ocurre durante la metamorfosis espontánea. En *X. laevis* no existen antecedentes del efecto de T3 sobre las moléculas de las UAs. Sin embargo, empleando técnicas de inmunohistoquímica el grupo de Jean Paul Thiery comprobó que cadherina E se detecta en el tubo digestivo de *X. laevis* recién a partir del estadio NF20, cuando los epitelios se encuentran bien diferenciados. En ese trabajo, un hecho sobre el que se enfatiza particularmente es que, la inmunoseñal de cadherina E persiste con altos niveles durante la metamorfosis, incluso cuando los epitelios están sufriendo procesos degenerativos (fundamentalmente a nivel de la piel y el intestino). A su vez, en los organismos juveniles y adultos cadherina E continua con elevada inmunotinción en los epitelios de piel, glándulas, intestino y páncreas, siendo la señal muy débil en el hígado y ausente en la mayoría de los restantes tejidos. Así, los autores concluyen que la expresión de cadherina E en *Xenopus* está fuertemente correlacionada con la aparición de los epitelios diferenciados (Levi y col., 1991).

El primer trabajo que correlaciona procesos de regulación transcripcional positiva de T3 sobre cadherina E, es la evaluación de su efecto sobre células colónicas tumorales (CaCO-2) de mamíferos (Dentice y col., 2012). En dicho trabajo, se relacionó esta inducción con la reducción de los procesos proliferativos y la consecuente diferenciación celular. También se reporta que, en paralelo con estos fenómenos, se verifica una disminución de la localización y la actividad nuclear de β -catenina. Los resultados de la presente tesis son coincidentes con estos hallazgos, pero adicionalmente y por primera vez, se logra determinar su comportamiento en condiciones no patológicas y en un sistema *in vivo*.

En general, la expresión génica de las cadherinas clásicas está sometida tanto a mecanismos de inhibición, como de estimulación. Esta última se reportó tanto en

cultivos celulares (Yonagada y col., 1997), como en modelos del desarrollo (Niewiadoska y col., 2002). Así, en *Drosophila* la transcripción de cadherina E responde positivamente al factor Slbo y estaría implicada en los eventos morfogenéticos que ocurren durante la embriogénesis. Las señales que desencadenan la acción de Slbo se desconocen, pero se reportaron diversas señales, incluyendo las que involucran a Wnt7a y WT1 (Hosono y col., 2000), que estimulan su transcripción en cultivos celulares. En contraste, la inhibición de la expresión génica de cadherina E se estudió sistemáticamente en el contexto de los procesos de transición epitelio-mesénquima (TEM), en los cuales la ausencia o la localización ectópica de esta molécula es determinante de la progresión tumoral, tornándose en un marcador característico (Kang y Massague, 2004). La TEM es un proceso que se produce durante el desarrollo embrionario normal cuando las células epiteliales pierden su polaridad, se disocian y aumentan su movilidad con el fin de desplazarse a nuevas organizaciones epiteliales luego de transitar una TME (Thiery y col., 2009). En contraste con las células epiteliales embrionarias, las maduras sufren TEM durante el desarrollo del cáncer y la metástasis (Hay, 1995). En este proceso se involucra a un amplio rango de represores, la mayoría de los cuales se unen a secuencias específicas del promotor de cadherina E denominadas E-box (Baranwal y Alahari, 2009; García de Herreros y Baulida, 2012). Se identificaron seis represores diferentes que se unen a E-box, incluyendo dos miembros de la familia Snail (Snail y Slug), dos proteínas Zeb (Zeb1 y Zeb2), E47 (García de Herreros y Baulida, 2012) y twist (Yang y col., 2004). Los represores transcripcionales Snail se expresan a bajos niveles en las células epiteliales diferenciadas, pero su transcripción aumenta drásticamente por estímulos generados tempranamente en la TEM, tales como el aumento del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Batlle y col., 2000; Cano y col., 2000; Hajra y Fearon, 2002). Además, se reportó que intervendría el factor LEF1 unido a un sitio específico del promotor (Jamora y col., 2003). Este conjunto de datos sugiere que la regulación transcripcional de cadherinas es un mecanismo complejo en el que intervienen numerosos actores y que es dependiente del tipo celular como así también del estado y contexto fisiológico de las células. Por ello y a diferencia de la mayoría de los abordajes que analizan la regulación de cadherina E en cultivos celulares o en estados patológicos, en la presente tesis se

analiza tal regulación, en un modelo fisiológico normal y en un organismo pluricelular completo, contribuyendo de una manera significativa al conocimiento de este campo.

En relación con β -catenina, si bien los controles postraduccionales que regulan la actividad de proteína están bien descritos, son menos conocidos los mecanismos de regulación hormonal de su transcripción. Las secuencias génicas de β -catenina de rata y humana, se clonaron y analizaron, reportándose la presencia de diversas regiones reguladoras (Li y col., 2004). Se describieron varios sitios de unión a AP1 y un sitio de unión a TCF, lo que sugiere que varios factores putativos pueden influir en su transcripción. Sin embargo, al presente no se reportaron funciones fisiológicas de estas regiones reguladoras. Hasta ahora, la única evidencia de control transcripcional encontrada sobre la dependencia de β -catenina a T3, es la de las células epiteliales intestinales de mamíferos (Plateroti y col., 2006). Este grupo demostró que en tejidos murinos, β -catenina es un gen de respuesta positiva y directa a T3, tanto *in vitro* como *in vivo* y que dicha regulación se da por unión directa del RT α a un elemento de respuesta a T3 (ERT) presente en el intrón 1 de este gen.

La localización subcelular de β -catenina en células epiteliales define funciones específicas. Así, su ubicación predominante submembranosa resulta clave en los procesos de adhesión celular, mientras que en su translocalización al compartimento nuclear actúa en la activación de genes diana (van de Wetering y col., 2002; Nelson y Nusse, 2004). Se demostró que β -catenina activa la transcripción de genes blanco, vía la unión con factores de transcripción de la familia Tcf/Lef (Moon y col., 2004). Algunos de sus genes blanco son activadores de la proliferación celular y también son regulados positivamente por T3, tanto *in vivo* como *in vitro* (Plateroti y col., 2006). Este comportamiento sugiere fuertemente que el aumento de la tasa de proliferación celular inducida por la hormona sería dependiente de la activación transcripcional de β -catenina, a la vez que de la disminución de la molécula en las UAs favoreciendo su desensamblaje y proliferación. Este conjunto de hechos permite postular que el marcado incremento de β -catenina verificado durante la metamorfosis, podría enriquecer ambos *pools* de la molécula, en las fases iniciales como factor de transcripción que induce la proliferación de las células que formarán el epitelio juvenil

y a continuación, participaría en el establecimiento, mantenimiento y recambio de las uniones intercelulares entre células epiteliales diferenciadas.

La regulación de la expresión génica de α -catenina y p120 ha sido menos estudiada en comparación con cadherina E y β -catenina. En el caso de α -catenina su expresión se reprime en múltiples tipos de cáncer. A principios de los 90', se informó por primera vez la carencia de expresión de α -catenina en la línea PC 9 de células tumorales de pulmón humano (Shimoyama y col., 1992). A pesar de exhibir altos niveles de expresión de cadherina E, esta línea celular experimentó un deterioro de la adhesión célula-célula, probablemente como resultado de la delección del gen de α -catenina. Posteriormente, la regulación por disminución o pérdida de α -catenina se confirmó en otras líneas celulares cancerosas (Benjamin y Nelson, 2008), incluyendo células mieloides (Horrigan y col., 2000; Ye y col., 2009), mamarias (Ding y col., 2010; Hollestelle y col., 2010), colónicas (Raftopolulos y col., 1998), pulmonares (Kimura y col., 2000) y prostáticas (Aaltomaa y col., 2005), que se correlacionan con procesos metastásicos y bajas tasas de supervivencia (Raftopolulos y col., 1998; Kimura y col., 2000). La falta de expresión de α -catenina en estos tumores es la resultante de múltiples causas, incluyendo la delección cromosómica, la metilación del ADN (Horrigan y col., 2000; Ding y col., 2010) y la mutación génica (Ye y col., 2009; Hollestelle y col., 2010). Sin embargo, no se encontraron registros de pérdida de regulación transcripcional. α -Catenina no sólo es uno de los componentes principales del complejo cadherina-catenina necesario para el mantenimiento de la integridad de la unión adherente intercelular al ser el nexo con el citoesqueleto de actina, sino que también regula múltiples vías de señalización independientes de UAs, como las vías Wnt/ β -catenina, Hipo-YAP, NF- κ B y Hedgehog (Sun y col., 2014). Por ello, se considera que los datos aquí aportados son importantes para comenzar a desentrañar la regulación transcripcional de esta molécula.

Otra molécula con un rol importante en el establecimiento de la estabilidad y dinámica del complejo adhesivo es p120, ya que posee un rol fundamental en la reducción de la susceptibilidad del complejo a los procesos de endocitosis, de ubiquitinación y de destrucción proteosómica (Davis y col., 2003; Davis y Reynolds, 2006; Perez-Moreno y col., 2008; Taulet y col., 2009; Smallery-Freed y col., 2010). Estudios recientes en

cultivos celulares revelan una nueva función para esta molécula, asegurando el tráfico de cadherina N, hacia la superficie de la célula a través de la ruta biosintética, mediante la unión a su precursor (Wehrendt y col., 2016). Sin embargo, en los experimentos desarrollados en la presente tesis, si bien sus niveles de expresión génica bajo estimulación de T3 son significativamente mayores a los del control, no superan el umbral de 50%, por lo que no se lo puede considerar como un gen de respuesta temprana a T3. La hipótesis más probable y que explicaría esta diferencia entre p120 y el resto de las moléculas del complejo de UAs, es que no sería un componente necesario para el ensamblaje de las uniones, sino que cobraría importancia en la estabilización de las uniones ya conformadas. En concordancia con estos resultados, en estudios realizados con *Drosophila* probaron que p120 no es requerida para el ensamblaje de las UAs ni para la expresión de cadherina DE (Myster y col., 2003; Pacquelet y col., 2003).

Así, una vez que se determinó que la hormona T3 sería la responsable de la inducción temprana de los componentes estructurales necesarios para el ensamblaje de las UAs, el siguiente paso consistió en conocer el mecanismo molecular por el cuál se produce.

Se acepta que T3 regula diversos procesos del desarrollo en diferentes especies de vertebrados. Si bien la acción no genómica de T3, contribuye a algunos de los efectos biológicos de la hormona (Davis y Davis, 1996), se cree que los RTs son los principales mediadores de su acción a través de la regulación de la expresión génica. Esta hormona puede actuar tanto activando como reprimiendo la expresión de genes blanco, siendo el primero el más estudiado. Mediante el uso de genes reporteros se demostró *in vitro* e *in vivo* que los RTs principalmente funcionan como heterodímeros con los receptores de ácido retinoico (RXRs), uniéndose a los ERTs presentes en las regiones reguladoras de los genes blanco (Lazar, 1993; Tsai y O'Malley, 1994; Mangelsdorf y col., 1995; Yen, 2001). En ausencia de T3, RT/RXR actúa como represor mediante el reclutamiento de complejos correpresores que contienen desacetilasas histónicas; mientras que cuando T3 está presente recluta complejos coactivadores que contienen diversas enzimas que también modifican las histonas relajando la cromatina y activando la transcripción (Hu y Lazar, 2000; Sanchez y Freedman, 2000; Yen, 2001; Ito y Roeders, 2001; Jones y Shi, 2003). Este modelo dual está sustentado en

numerosos antecedentes empíricos (Wang y Brown, 1991; Buckbinder y Brown, 1992; Kanamori y Brown, 1992; Wang y Brown, 1993; Shi y Brown, 1993; Stolow y Shi, 1995; Patterton y col., 1995; Brown y col., 1996; Puzianowska-Kuznicka y col., 1997; Sachs y Shi, 2000; Schreiber y col., 2001; Buchholz y col., 2003; Havis y col., 2003; Buchholz y col., 2004; Das y col., 2006; Buchholz y col., 2007; Cai y col., 2007; Das y col., 2009).

Para profundizar la comprensión de los mecanismos moleculares sobre los que actúa T3 en la inducción de la transcripción de los genes de las UAs, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias reguladoras, tanto 5 Kb corriente arriba como 10 Kb corriente abajo del primer nucleótido publicado (que no siempre coincide con el inicio de la región codificante) de cada una de ellas. Se ha reportado que existen diversas configuraciones funcionales para los ERT entre las más importantes se destacan: la repetición directa con un espaciador de 4 pb (DR4), las repeticiones invertidas sin espaciador (IR0) y las repeticiones evertidas con un espaciador de 6 pb (ER6) (Glass, 1994). De los genes reportados por presentar ERTs funcionales en *X. laevis* y *X. tropicalis*, todos presentan la configuración (DR4) y por esta razón, se utilizaron para construir las matrices de peso. En los 3 genes que respondieron tempranamente a T3, cadherina E, β - y α -catenina, se revelaron secuencias correspondientes a ERTs, mientras que en p120, que como se indicó antes no sería un gen de respuesta temprana a T3, no se encontró ninguno. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis que los genes que respondieron tempranamente son de respuesta directa a la hormona, dado que la presencia de ERTs se considera un indicador de tal condición (Buchholz y col., 2004; Plateroti y col., 2006). De las cuatro moléculas de las UAs analizadas en este trabajo, sólo se encontraron antecedentes de ERTs en β -catenina murina (Plateroti y col., 2006); la cual, en concordancia con los resultados obtenidos en esta tesis, presenta un ERT-DR4 en el intrón 1 del gen. En α -catenina, se localizaron dos ERTs en el intrón 1 y un tercero, corriente arriba del primer nucleótido de la secuencia publicada. Esta misma situación se repite con el único ERT encontrado en cadherina E.

El que la localización de los ERTs sea intrónica no es un hecho excepcional de estos genes, ya que existen antecedentes que los reportan “corriente abajo” del promotor génico correspondiente (Pain y col., 1991; Sap y col., 1990; Ciana y col., 1998; Plateroti y col., 2006).

Para evaluar si la respuesta temprana era exclusiva de las moléculas involucradas en las UAs, estos estudios se complementaron con el análisis del efecto de T3 sobre dos de las proteínas claves de las UEs, ocludina y ZO1, ya que los estudios ultraestructurales sugieren que estas uniones se mantienen inalteradas bajo la acción de la hormona. En los estudios de expresión génica, si bien ocludina aumentó significativamente a las 24hs, no superó el valor umbral establecido, por lo que se desestimaron como genes de respuesta temprana a la hormona. En los animales sometidos a 5 días de tratamiento, los niveles transcripcionales de ambos genes muestran aumentos significativos respecto al control inicial, siendo mayores para la ocludina (Ver [Tabla 8](#)).

Tabla 8. Resumen efecto de T3 sobre moléculas de UEs

Molécula	Respuestas a T3 estadísticamente significativas*		Gen de respuesta temprana ^ψ
	24h	5d	
Ocludina	↑	↑↑	no
ZO1	-	↑	no

*Diferencias significativas respecto el grupo control NF53 ($p \leq 0,05$). La doble flecha representa mayores niveles de expresión.

^ψLas diferencias superan el 50% del nivel en el grupo control NF53.

Como se indicó previamente, existe consenso que este tipo de comportamiento puede atribuirse a genes de respuesta tardía a la hormona, lo que se ve reforzado por el hecho que los niveles alcanzados en esta inducción experimental, resultan similares a los verificados en los animales que sufren metamorfosis espontánea. Al presente, no se reportaron estudios en los que se demuestre que T3 ejerza regulación transcripcional sobre moléculas que conforman las UEs. Sin embargo, como ocurre con las UAs, las UEs se estudiaron principalmente en procesos como la transición epitelio-mesénquima asociados al cáncer u otros procesos patológicos en los que se pierde la barrera transepitelial. La represión de las proteínas de UEs se correlaciona con la estadificación, la invasividad y el potencial metastásico de los cánceres epiteliales (Hoover col., 1998; Tobioka y col., 2004; Dhawan y col., 2005). Entre los diversos mecanismos de regulación transcripcional reportados, se destaca el del factor de transcripción NF- κ B, que media la represión inducida por la interleuquina 1 (IL-1) sobre los niveles de expresión génica y proteica de ocludina. En los procesos de inflamación intestinal, estas modificaciones alteran la localización de ocludina en la unión,

conformando una barrera defectuosa (Al-Sadi y Ma, 2007). Otro mecanismo involucra al oncogén Raf1, que suprime la actividad del promotor del gen de ocludina, vía la activación del factor de transcripción Slug y lleva a la pérdida del fenotipo epitelial (Wang y col., 2006). El represor Snail también actúa reduciendo la transcripción de ocludina durante los procesos de TEM (Ikenouchi y col., 2007). En relación con ZO1, se reportó que su presencia es necesaria para la formación de huecos polarizados en cultivos tridimensionales, sugiriendo un papel clave en la regulación de la morfogénesis epitelial (Sourisseau y col., 2006). En contraste, en sistemas de cultivo bidimensionales, su represión en diferentes líneas de células epiteliales indica que no se requiere para la formación de las UEs y la polarización (Umeda y col., 2004; McNeil y col., 2006).

En el análisis bioinformático de búsqueda de sitios de unión a T3 en la secuencia de ambos genes, se observó que ZO1 no posee ETRs en las zonas reguladoras analizadas. Por el contrario, se detectó un ERT localizado en el intrón 1 del gen de ocludina. Dado que el gen de ocludina no responde tempranamente a T3, aunque exhibe aumentos significativos a las 24hs, que se incrementan en los animales tratados durante 5 días, se sugiere que se requerirían factores adicionales de unión a los sitios RT-ERTs del gen para regular su expresión. En concordancia con este modelo, es de destacar que en *Xenopus laevis*, el mismo RT β es un gen de respuesta directa, cuyo producto funcional desencadena diversas cascadas como factor de transcripción, resultando en una respuesta tardía a la hormona (Sach y Shi, 2000).

8.4. Rol de las GTPsas pequeñas

Como se analizó precedentemente, en la remodelación del epitelio gastrointestinal de *X. laevis*, la hormona T3 cumple un rol clave en la regulación del conjunto de moléculas que conforman las UAs. Dicha regulación quedó claramente patentizada tanto a nivel ultraestructural, como en los niveles de expresión génica de los componentes de dichas uniones. En función de estos hallazgos, el siguiente objetivo que se planteó fue intentar desentrañar otros eventos de la cascada de procesos moleculares intracelulares que podrían desencadenarse por la acción de T3 y que llevan al establecimiento del fenotipo epitelial. Para ello, se evaluó el efecto de la hormona

sobre la regulación transcripcional de algunos de los actores intervinientes en las vías de señalización de las GTPAsas pequeñas.

La regulación mediada por T3 de la expresión génica de éstas moléculas, constituye una contribución importante, más aún si se tiene en mente que el mismo se desarrolló en un modelo animal *in vivo* y en un proceso fisiológico, como es la metamorfosis de los anfibios.

En 2013, Zaidel-Bar publicó un trabajo integral en el que realiza un “inventario” de las moléculas relacionadas con las UAs, en base al cuál, hipotetizó una compleja red de interacciones moleculares que fue denominada *cadherin adhesome* o *cadhesome*. En dicho trabajo se reportan más de 170 proteínas que colocalizan con cadherinas o cateninas en las UAs. Éstas pueden interactuar directamente o intervenir indirectamente afectando su estructura y función. En términos generales, el cadhesoma está conformado por dos categorías de proteínas, las estructurales y las reguladoras (Zaidel-Bar, 2013). La presencia de más de 70 proteínas de esta última categoría, denota la existencia de una gran variedad de vías celulares que controlan la dinámica y señalización de las UAs y de esta manera, el comportamiento celular (Braga, 2002; McCrea y col., 2009; Stepniak y col., 2009; Cavallaro y Dejana, 2011; Lechler, 2012). Entre estas moléculas se destacan las tirosina quinasas, las fosfatasas, las GTPAsas pequeñas y sus moléculas reguladoras.

En la actualidad existe abundante literatura sobre la implicancia de las GTPAsas pequeñas, principalmente RhoA, Rac1 y Cdc42 (pertenecientes a la familia Rho) y Rap1 (perteneciente a la familia Ras), en los mecanismos de señalización y regulación de las uniones epiteliales (Braga y Yap, 2005; Kooistra y col., 2007; Samarin y Nusrat, 2009; Watanabe y col., 2009; Boettner y Van Aelst, 2009; Severson y col., 2009; Citi y col., 2011; Citalán-Madrid y col., 2013; Citi y col., 2014). Si bien existen evidencias que algunas GTPAsas pequeñas están implicadas en respuestas celulares disparadas por T3 (Vargiu, 2001; Gentile y col., 2006; Zamoner y col., 2007), no se encontraron reportes sobre la regulación directa de T3 sobre las GTPAsas.

Existe un amplio consenso que las cadherinas regulan a estas GTPAsas pequeñas. Como sucede con la estimulación de receptores por factores de crecimiento específicos, las cadherinas también funcionan como receptores capaces de actuar

como transductores de las señales extracelulares sobre las GTPasas pequeñas. En distintos tipos de cultivos celulares, se comprobó que las interacciones célula-célula mediadas por cadherina E resultan en el reclutamiento y/o activación de Rac1, Cdc42 y Rap1 (Braga y col., 1997; Kim y col., 2000; Nakagawa y col., 2001; Noren y col., 2001; Betson y col., 2002; Hogan y col., 2004; Price y col., 2004; Fukuyama y col., 2005). Por el contrario, se demostró que las uniones dependientes de cadherina E, reducen los niveles de activación de RhoA (Noren y col., 2003).

Este conjunto de antecedentes y los resultados de los experimentos conducidos en esta tesis, llevaron a hipotetizar que durante la metamorfosis dependiente de T3 de anfibios, la hormona podría ejercer algún rol en la regulación de la expresión las GTPasas pequeñas.

Si bien no se encontraron reportes del rol de estos interruptores biológicos en la remodelación gastrointestinal durante la metamorfosis de *X. laevis*, existen informes que establecen su intervención en diversos procesos ontogénicos de esta especie. En las etapas iniciales de la embriogénesis de *Xenopus*, la actividad de RhoA es localmente reducida en la membrana plasmática, estabilizando el citoesqueleto de actina y reforzando los contactos célula-célula (Cho y col., 2010). Adicionalmente, las cuatro GTPasas pequeñas tienen roles claves durante la gastrulación; RhoA y Rac1 son activadas de manera independiente y localizada en la región dorsal del embrión de *Xenopus*, para coordinar la forma celular y la formación de filopodios durante los movimientos de extensión convergente (Habas y col., 2003; Ren y col., 2006; Tanegashima y col., 2008), donde también está implicada Cdc42 (Choi y col., 2002; Nelson y col., 2004; Boissel y col., 2007). Rap1 además de participar en la gastrulación (Tsai y col., 2007), lo hace durante el cierre del tubo neural (Haigo y col., 2003). Durante la formación del tubo digestivo de esta especie, la inhibición de la vía Rho/ROCK/miosina II, impacta sobre múltiples aspectos de su morfogénesis, incluyendo la elongación, la rotación, la formación del lumen y del epitelio digestivo (Reed y col., 2009).

Estos interruptores moleculares constituyen un sistema no sólo integrado por las GTPasas pequeñas, sino también por sus moléculas reguladoras, GEFs y GAPs. Adicionalmente, las GTPasas de la familia Ras y Rho poseen, en su extremo C-terminal,

grupos farnesilo o geranilgeranilo que permiten su anclaje a la membrana plasmática. Esto les confiere mecanismos de regulación adicionales, basados en la alternancia dinámica de los *pools* citosólicos y de membrana. A su vez, dicha regulación es mediada por inhibidores de disociación de guanina (GDIs), que forman complejos solubles con las GTPasas pequeñas, encubren la porción lipídica de la molécula y evitan que éstas se unan a la membrana (Cherfils y Zeghouf, 2013). Los GDIs no sólo son inhibidores de las GTPasas, sino que mantienen un *pool* estable de GTPasas solubles inactivas, que puede representar la porción mayoritaria (90-95%) en la célula (Ren y col., 1999; Boulter y col., 2010). Una explicación aceptada para la existencia de este *pool* citoplasmático es que el mismo actúa como un reservorio, que permite que las células puedan responder rápidamente ante señales específicas, translocando las GTPasas a la membrana celular para su activación (García-Mata y col., 2011).

Teniendo en cuenta esta información, en este trabajo, se seleccionó un GEF y un GAP para cada GTPasa pequeña. Dicha selección se basó en la literatura disponible al momento del diseño experimental, evaluando su asociación a las UAs epiteliales, su función y la existencia de información genómica para *X. laevis*. Estos estudios probablemente deban ampliarse y completarse en el futuro, conforme emerja nueva información. Para el análisis de los resultados debe tenerse en cuenta que, si bien estas moléculas reguladoras tienen un perfil de especificidad para cada familia de GTPasas y en general, no existe reactividad cruzada entre diferentes familias, sí la hay al interior de éstas. Para la familia Rho, se reportaron aproximadamente 80 GEFs y 70 GAPs; superando en número a las 22 GTPasas blanco identificadas hasta el momento (Citi y col., 2011; Cherfils y Zeghouf, 2013). Esto implicaría la existencia de más de uno por cada GTPasa. Por el contrario, en el caso de la familia Ras de 33 miembros, el número de moléculas reguladoras es inferior (29 GEFs y 15 GAPs publicados a la fecha) (Citi y col., 2011; Cherfield, 2013). Así, un regulador actuaría sobre más de una GTPasa pequeña, evidenciando la necesidad de garantizar una estricta regulación espacio-temporal de la señalización de las GTPasas de la familia Ras.

Dada esta información, si bien los datos obtenidos *in vivo* en este modelo de vertebrados son sumamente valiosos, su interpretación es compleja, debido fundamentalmente a que se trata de analizar vías de señalización interconectadas y

dependientes del contexto celular. Como se reportó en otros sistemas, una respuesta transcripcional ante el tratamiento hormonal sugiere la existencia de una relación directamente proporcional entre los niveles de ARNm y los de las GTPasas pequeñas activas (Liu y col., 2009; Zhang y col., 2011).

Dado que el tratamiento hormonal de larvas premetamórficas de *X. laevis* produce una inducción diferencial de la expresión génica de las GTPasas en el tubo digestivo (Tabla 9) cada situación se analizará independientemente.

Tabla 9. Resumen del efecto de T3 sobre GTPasas pequeñas y sus reguladores

Molécula	Respuestas estadísticamente significativas*		Gen de respuesta temprana ^ψ
	24h	5d	
RhoA	-	↓	No
GEF18	↑	↑↑	No
p190	↑	↓	No
Rac1	↑↑	↑	Si
Tiam	↑	↑	No
GAP12	-	↑↑	No
Rap1	↑	↑↑	No
C3G	-	↑	No
SPA1	-	-	No
Cdc42	↑	↑	No
FRG	-	-	No
Rich	-	-	No

*Diferencias significativas respecto del grupo control NF53 ($p \leq 0,05$). La doble flecha representa mayores niveles de expresión.

^ψLas diferencias superan el 50% del nivel en el grupo control NF53.

De las GTPasas analizadas, Rac1 fue la única que mostró niveles de expresión génica incrementales que superan el 50% establecido para los genes de respuesta temprana a T3. Dicho aumento, constituye un indicio que esta molécula es necesaria para la ocurrencia de la remodelación del tubo digestivo de este anfibio. El reconocimiento célula-célula tanto durante los eventos tempranos de formación de los epitelios, como durante la metamorfosis, implica la conversión de los limitados contactos nacientes de cadherina, en zonas de adherencia de mayor extensión. En este proceso de crecimiento de la adherencia, Rac1 parece ser crítica. Cuando se estudiaron los contactos célula-célula nativos (Ehrlich y col., 2002) o entre células-substrato (Kovacs y col., 2002a), se encontró que Rac1 se recluta en los contactos en neoformación. Más aún, ésta se localiza principalmente en los márgenes de los contactos en activo

proceso de ampliación. A su vez, la inhibición de Rac1 reduce significativamente las zonas de contacto (Ehrlich y col., 2002, Kovacs y col., 2002a) y aumentan cuando esta molécula es activada (Kovacs y col., 2002a). Este conjunto de antecedentes permiten postular que la rápida activación de Rac1 es promovida por el reconocimiento homofílico de cadherina.

Adicionalmente, se postula un probable vínculo entre la señalización de Rac1 y las extensiones de las zonas de contacto a través de la regulación del citoesqueleto de actina (Braga y col., 1997; Noren y Niessen, 2001; Nakagawa y col., 2001; Kovacs y col., 2002; Betson y col., 2002; Yap y Kovacs, 2003; Kraemer y col., 2007). Durante mucho tiempo se reconoció que las cadherinas clásicas funcionan en cooperación con los filamentos de actina (Adams y Nelson, 1998). Así, el montaje de actina por el complejo Arp2/3 es estrictamente activado por señales celulares, incluyendo Cdc42 y Rac1 (Pollard y col., 2000). Una de las funciones de la activación de Rac1 por cadherina podría ser el estimular la actividad catalítica del complejo Arp2/3, mediante sus efectores WAVE2 y WASP (Heasman y Ridley, 2008; Ratheesh y col., 2012), el cuál es reclutado hacia la superficie celular por el ligamiento de cadherinas. Consistente con esta noción, sería el qué, tanto Rac1, como Arp2/3 se localizan en los contactos de cadherina recién formados (Kovacs y col., 2002a; b), mientras que la inhibición de la señalización de Rac1 bloquea el montaje de actina en los sitios de adhesión entre las células (Lambert y col., 2002) (Figura 38). Una vez en los sitios de contacto, Arp2/3 promueve la polimerización de los filamentos de actina sobre un filamento existente, creando ramificaciones claves para la formación de nuevos lamelipodios (Campellone y Welch, 2010). Éstos impulsados por el citoesqueleto promueven el acercamiento y contacto entre células adyacentes, permitiendo que los receptores de adhesión interactúen y formen los complejos de adhesión celular estables (Nelson, 2008; Noda y col., 2010; Baum y Georgiou, 2011; Yonemura, 2011; Hoelzle y Svitkina, 2012).

Adicionalmente, se postula que Rac1 actúa estabilizando las UAs ya formadas, mediante la regulación negativa de la interacción de la IQGAP (del inglés: *Ras GTPase-activating-like protein*) con β -catenina, la que promovería la estabilización de los filamentos de actina y los contactos intercelulares mediados por cadherina E (Kuroda y col., 1998; Fukata y col., 1999). Sin embargo, en otros trabajos se reportó que por

activación de factores de crecimiento, Rac1-GTP promueve el desensamblaje de las uniones y la formación de lamelipodios, favoreciendo la dispersión de las células epiteliales (Ridley y col., 1995; Potempa y Ridley, 1998).

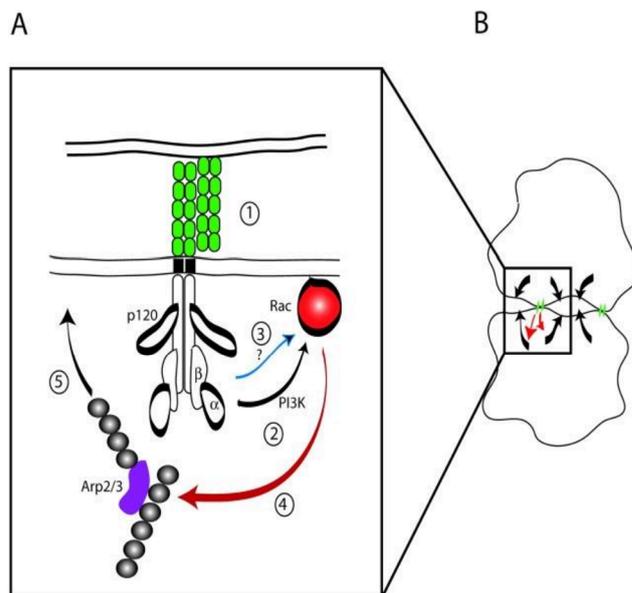


Figura 38. Modelo de señalización de la activación de Rac por cadherinas, que participa en el reconocimiento célula - célula temprano. (A) Interacción entre cadherinas en los contactos formados *de novo* (1) activación de la señalización de Rac en la membrana plasmática vía un intermediario dependiente de PI3 quinasa (2) y posiblemente también mediante una manera independiente de PI3 quinasa (3). Una consecuencia de la activación de Rac por cadherinas es la estimulación del ensamble de actina dirigido por el complejo Arp2/3 (4), lo que conduce a la protrusión de la superficie celular, formando lamelopodios (5). **(B)** El ensamble de actina dirigido por cadherina, coordinado por la activación de Rac, dirigiría la actividad en la superficie de las protrusiones del citoesqueleto de actina hacia dichos contactos nacientes, para ampliar las regiones de contacto y finalmente estabilizar la adhesión célula-célula. Adaptado de Yap y Kovacs, 2003.

Adicionalmente, el grupo de Akhtar estudió el efecto de una forma dominante-activa de esta GTPasa pequeña, demostrando que regula las UAs a través de la endocitosis de cadherina E independiente de clatrina (Akhtar y Hotchin, 2001). Estos antecedentes son congruentes con los procesos de remodelación del epitelio gástrico inducido por T3 aquí analizados, donde la regulación dinámica de las UAs por Rac1 permitiría la interrupción y la remodelación de los contactos celulares.

Si bien existen mecanismos moleculares generales de la acción de las GTPasas pequeñas, resulta necesario discutir su función, específicamente en el tejido epitelial del tubo digestivo. En este contexto, la forma activa de Rac1 está implicada en diversos procesos que controlan la homeostasis intestinal, entre ellos, cicatrización de úlceras, respuesta a infecciones bacterianas y adhesión celular/migración; fundamentalmente mediante la regulación de la dinámica de actina (Citalán-Madrid y col., 2013). En

cultivos de células colónicas tumorales, la regulación de Rac1 está implicada en la formación de las UAs, gracias a la actividad de la tirosina fosfatasa PTP-PEST asociada a los complejos de unión. Ésta es responsable del mantenimiento del equilibrio de la actividad de Rac1 y RhoA en estas localizaciones. La falta de PTP-PEST provoca alteraciones en el ensamblaje de las UAs, por el incremento de la actividad de Rac1 y la inhibición de la actividad de RhoA, generando un debilitamiento de la unión adhesiva y tornándolas más susceptibles a señales que promueven el comportamiento migratorio (Espejo y col., 2010). De particular interés resulta el rol de Rac1 durante la cicatrización de úlceras intestinales, ya que puede considerarse un proceso análogo al que sucede durante la remodelación del tejido intestinal durante la metamorfosis de anfibios. Ambos requieren procesos de migración celular desde nichos de células madres del tejido, hasta el epitelio superficial, donde ocurren tanto procesos de desensamblaje como de reensamblaje de los complejos de unión, seguidos de procesos de diferenciación celular. En modelos de cicatrización de úlceras en cultivos celulares, la activación de Rac1 ocurre mediante receptores de péptidos formilados (FRP) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Dise y col., 2008). En ambos casos, la activación se produce por PI3K, llevando a la formación de lamelipodios y aumento de la migración celular. Así, el aumento de expresión génica de Rac1 observado durante la remodelación del tubo digestivo inducido por T3, podría disparar mecanismos similares, favoreciendo la renovación de las células epiteliales larvales por las adultas, a partir de la migración desde el nicho de células madres y posterior diferenciación.

Se postula que el GEF Tiam1 es clave en la activación de Rac1 en las uniones epiteliales (Nakagawa y col., 2001; Kovacs y col., 2002a). En el modelo estudiado en esta tesis, Tiam no se comporta como un gen de respuesta temprana a T3, pero exhibe un incremento significativo a 24 hs. Adicionalmente, dado que en el estadio NF53 se detectan niveles basales de Tiam, el incremento mencionado podría ser suficiente para la activación de Rac1. Apoyando esta hipótesis, se acepta que la activación de Rac1 mediante Tiam1 promueve la adhesión mediada por cadherina E, mientras que su carencia la inhibe (Hordijk y col., 1997, Malliri y col., 2004, Mertens y col., 2005). En cultivos de células MDCK y hECHO, se recluta Tiam1 a la zona de unión intercelular, a través de su interacción con fosfolípidos producidos por la fosfatidilinositol-3-quinasa

(PI-3K), la cual a su vez se activa por la formación de las UAs (Michiels y col., 1997; Sander y col., 1998; Pece y col., 1999; Kovacs y col., 2002b). Otra alternativa para explicar los resultados, es la existencia de una vía de activación de la GTPasa independiente de Tiam (Kraemer y col., 2007) y dependiente de otros factores de intercambio presentes en el complejo. Así, se ha reportado la activación de Rac1 en los sitios de unión de células epiteliales, por acción de los GEFs Asef (Muroya y col., 2007) y Trio (Yano y col., 2011). En células MDCK II, Asef al igual que Tiam, se unen a PI3P, promoviendo su reclutamiento a los sitios de adhesión célula-célula para promover el contacto. Además se ha comprobado que la sobreexpresión de Asef produce incrementos de cadherina E y filamentos de actina en estos sitios de contacto (Muroya y col., 2007). La actividad del producto del gen Trio es más compleja, ya que posee dos dominios GEFs con diferentes especificidades, el N-terminal (TrioD1) que activa tanto Rac1 como RhoG y el C-terminal (TrioD2), que sólo intervendría en la activación de RhoA (Debant y col., 1996; Blangy y col., 2000). Si bien desde hace varios años se caracterizó a Trio, sólo recientemente se lo relaciona con las uniones dependientes de cadherina E, específicamente en células MDCK donde su activación promueve el aumento de los niveles de Rac1-GTP.

En relación al modelo aquí estudiado, no se encontraron reportes de la intervención de estos GEFs en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, en condiciones patológicas, durante la progresión de tumores colorrectales se detectaron aumentos de Tiam (Myant y col., 2013a; b) y Asef (Espina y col., 2008; Kawasaki y col., 2009) correlacionados con la activación de Rac1, la cual favorece la proliferación y expansión de las células madres intestinales, eventos fundamentales para las etapas iniciales de la mayoría de estos tipos de cáncer.

Por su parte, si bien el GAP específico de de Rac1 (GAP12), es detectado en el estadio control inicial, la hormona no provocó cambios significativos en su expresión génica en los animales tratados durante 24 hs con T3, lo cual refuerza la hipótesis de que la hormona no sólo produce la inducción transcripcional temprana de Rac1, sino que además promovería el desplazamiento hacia su estado unido a GTP, en el cual es activa. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para desentrañar las vías de regulación intervinientes.

Por otro lado, si bien resulta clara la necesidad de Rac1 y su activación en los eventos iniciales de la renovación epitelial del tubo digestivo, ésta sería necesaria sólo por un tiempo acotado, luego del cual se daría la expansión y la maduración de los contactos, proceso que requiere la activación localizada de los procesos de contractilidad vía actomiosina, mediados por RhoA (Ehrlich y col., 2002; Yamada y Nelson, 2007). En función de esto, resulta importante analizar sus perfiles de expresión génica en los tubos digestivos de *X. laevis*, luego de 5 días del tratamiento hormonal.

En este punto experimental, se observa que no sólo disminuyen los niveles de expresión génica de Rac1, sino que GAP12 exhibe incrementos significativos, lo que podría traducirse en una disminución de los niveles proteicos activos de Rac1. Al momento del diseño del ensayo, según la literatura disponible, GAP12 era el único relacionado con las UAs en células epiteliales, además de ser específico para esta GTPasa, es decir que su aumento estaría directamente ligado a la desactivación de Rac1 (Gentile y col., 2008; Matsuda y col., 2008). Por otra parte, Tiam también exhibe incrementos a los 5 días de tratamiento con T3, aunque de menor magnitud. Esta interpretación de los resultados es concordante con reportes previos que sugieren mecanismos de retroalimentación negativa sobre la maduración de las uniones (Chen y Macara, 2005).

En relación con la expresión génica de RhoA, GTPasa que se asocia principalmente con la regulación del citoesqueleto, la formación de fibras de estrés de actina y la contractilidad de actomiosina, no se detaron cambios en los niveles de ARNm a las 24 hs de tratamiento con T3 respecto de los controles sin tratar. Sin embargo, los niveles transcripcionales de las moléculas que regulan su actividad, el GEF18 y el GAP p190, sí mostraron un leve, pero significativo aumento por el tratamiento con T3. Estos resultados sugieren que si bien no se requerirían cambios en el *pool* de RhoA existente, su actividad sería promovida para participar en la remodelación del citoesqueleto de las células epiteliales intestinales. Esta hipótesis se apoya en la existencia de regulación sobre los *pools* citoplasmáticos de RhoA inactivados por GDIs, que los habilitan para generar respuestas rápidas ante algunos estímulos (García Mata y col., 2011). A su vez, las actividades de los GEFs y GAPs son también reguladas en tiempo y espacio, mediante fosforilación, unión de lípidos, autoinhibición

intramolecular e interacciones proteína-proteína (Bos y col., 2007). En tal sentido, existen reportes que muestran regulación de la actividad del GAP p190 por la fosforilación de algunos de sus residuos Tyr, Ser y Thr así como por la unión a fosfolípidos. La activación de Src por diferentes vías (EGF, integrina, PKC y por interacción de cadherinas) conduce a la fosforilación de p190 en Y1105, lo que resulta en incrementos de su actividad, con la consecuente inhibición de RhoA y el desensamble de las fibras de estrés (Arthur y col., 2000; Haskell y col., 2001). En función de estos antecedentes, no puede descartarse que en los tubos digestivos luego de 24 hs de tratamiento con T3 se induzca este tipo de regulación sobre RhoA. Adicionalmente, se identificaron otros GAPs funcionales de RhoA en el epitelio intestinal, tales como Myo9a y b, los cuales poseen un dominio GAP y otro con funciones motoras (Miosina1Xb). Éstos intervienen en la migración colectiva de células epiteliales y en los procesos de cicatrización de úlceras intestinales, promoviendo la disminución de los niveles de RhoA-GTP y así reduciendo la tensión localizada para formar nuevos contactos. Se postula además, que su inhibición en células intestinales afectaría las UEs y la permeabilidad tisular (Chandhoke y col., 2012).

Aún cuando recientemente se reportaron nuevos GEFs de RhoA asociados a las UAs y/o UEs (Citi y col., 2014), en el presente trabajo se seleccionó al GEF18 (o p114RhoGEF) por expresarse en células epiteliales intestinales, donde se recluta en los sitios de unión mediante la interacción con cingulina. En esta localización GEF18 actuaría promoviendo localmente la activación de RhoA para regular la formación de la unión y la morfogénesis epitelial (Terry y col., 2011). También se reportó su actividad en células tumorales donde impulsa la doble fosforilación y activación de la miosina cortical vía RhoA y con ello, la migración celular colectiva de láminas epiteliales. En el presente trabajo se expresó en el tubo digestivo premetamórfico (NF53) de *X. laevis* y si bien a las 24 hs de tratamiento con T3 exhibió aumentos significativos, su máximo nivel de expresión génica lo alcanzó a los 5 días, sugiriendo un rol preponderante en ese punto. Luego del tratamiento hormonal por 5 días, simultáneamente con la disminución de los niveles proteicos activos de Rac1, aumenta significativamente la transcripción del GEF de RhoA analizado (GEF18 o p114RhoGEF), lo que podría resultar en un aumento de los niveles activos de dicha GTPasa, si bien en estos animales

tratados con T3 los niveles transcripcionales de RhoA disminuyen levemente (aunque de modo significativo) respecto al control inicial. Esta interpretación de los resultados responde a la hipótesis de que Rac1/Cdc42 y RhoA ejercen efectos antagónicos durante la iniciación del contacto, la maduración y la reorganización de las UAs. Dicha hipótesis se apoya en numerosos reportes que demuestran que si Rac1 y RhoA colocalizan en un tiempo determinado, cuando la primera se encuentra en estado activado, RhoA se encuentra inhibida y viceversa (Kozma y col., 1997; Rottner y col., 1999; Sander y col., 1999; Noren y col., 2001; Nimnual y col., 2003; Wildenberg y col., 2006; Bustos y col., 2008; Burdisso y col., 2013).

El mecanismo general de acción propuesto para la GTPasa pequeña RhoA-GTP sería a través de 2 efectores: la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK) y Diafanus (mDia) (Sahai y Marshall, 2002). Ésta última actúa nucleando la polimerización de actina lineal en las zonas de unión (Kobielak y col., 2004) y adicionalmente, detecta y genera fuerzas mecánicas sobre los filamentos de actina (Jegou y col., 2013). ROCK promueve el agrupamiento de filamentos de actina y la fosforilación de la cadena liviana de miosina no muscular para formar haces de actomiosina contráctiles en los contactos adhesivos (Amano y col., 2010). Este conjunto de funciones son esenciales para inhibir la endocitosis de cadherina E, mantener la tensión en las uniones apicales y así, establecer y mantener la barrera epitelial mediante las UEs (Warners y col., 2009; Terry y col., 2011).

En relación con los niveles de expresión génica de la GTPasa Rap1, a las 24 hs de tratamiento con T3, se verifica un incremento significativo de sus transcritos, aunque los mismos no superan el umbral del 50%, para considerarlo como de respuesta temprana. Por otro lado, la falta de detección de sus reguladores C3G-GEF y SPA1-GAP, sugieren que, en el modelo experimental abordado, otros actores regularían a Rap1, o bien que su función no sería preponderante en esta etapa del proceso.

Sin embargo, luego del tratamiento por 5 días, los niveles de expresión génica de Rap1 exhiben un marcado aumento respecto de los registrados a las 24 hs, acompañados por la detección del GEF-C3G. El aumento del intercambiador, podría estar relacionado con la necesidad de que se produzca un incremento de la forma activa de la GTPasa. Si bien no existe unanimidad en adjudicar un vínculo directo de Rap1 con las uniones

adherentes, se han acumulado pruebas sólidas sobre su intervención como un regulador clave, principalmente en las etapas en que éstas se forman, antes que en su mantenimiento (Hogan y col., 2004; Price y col., 2004; Dube y col., 2008).

Se han reportado distintos GEFs, de los cuales 4 han sido implicados en la regulación de las uniones adherentes, C3G, PDZ-GEF2, Epac y DOCK4; entre los cuales sólo C3G se ha probado que tiene una interacción directa con cadherina E, lo cual justifica su elección para este estudio (Hogan y col., 2004). Así, la unión de C3G a cadherina es mutuamente excluyente con la unión de ésta a β -catenina, lo que sugiere que el GEF no se une a cadherina E en UAs maduras. Adicionalmente, se ha comprobado la intervención de C3G en la translocación de cadherina E desde el citoplasma a la membrana, dado que su inhibición bloquea dicho mecanismo. Por otro lado, este GEF ha sido localizado en endosomas (Wu y col., 2001) y se ha propuesto que puede actuar activando a Rap1 en compartimentos intracelulares en respuesta al EGF (Mochizuki y col., 2001). Del mismo modo, la activación de Rap1 puede darse por internalización de cadherina E (Balzak y col., 2005), sugiriendo que C3G podría unirse a cadherina E intracelular, para activar Rap1 e inducir su translocación a la membrana. Dado que no se han encontrado reportes sobre la expresión del GEF-C3G en el tubo digestivo, los resultados obtenidos en esta tesis, constituirían los primeros antecedentes que permiten sugerir su participación en la remodelación intestinal inducida por T3. En cultivos de células colónicas, se han reportado las funciones de otro GEF, el PDZ-GEF2, al que se lo ha vinculado con afadina y proteínas JAMs, en las que Rap1 activada, actúa estabilizando los niveles de β -integrina e incrementa los procesos de migración de las células epiteliales (Severson y col., 2009). Sin embargo, en contraste con células en las que C3G es inhibido, en las que no está presente PDZ-GEF2, no se verifican variaciones en los niveles de cadherina E en la superficie, pero son incapaces de formar uniones maduras. Dicho efecto es revertido por el agregado de Rap1 activada. Estos antecedentes sugerirían que las funciones de PDZ-GEF2 durante la formación de las UAs, son posteriores a las de C3G (Dube y col., 2008). Los efectores de Rap1 en las células epiteliales incluyen afadina/AF-6 (Boettner y col., 2000) y Rac1/Cdc42 (Sato y col., 2006). En el primer caso, se ha postulado que Rap1-GTP actúa activando a afadina/AF6, que luego indirectamente, lo haría con p120, incrementado la interacción

de ésta con cadherina E y de este modo, estabilizaría del complejo de unión (Hoshino y col., 2005; Kooistra y col., 2007).

Rap1 tiene además, un rol importante en la regulación del citoesqueleto mediante la activación de Rac1 y Cdc42 a través de la unión y la captación de sus respectivos GEFs Tiam1 y FRG (Arthur y col., 2004; Fukuyama y col., 2005b). Por lo tanto, Rap1 sería parte de un bucle de realimentación positiva que implica la familia Rho GTPasas, promoviendo la maduración de la adhesión célula-célula.

Toda estas evidencias, sumadas a los hallazgos presentados en ésta tesis, permiten hipotetizar un posible escenario sobre la función de Rap1. Así, a las 24 hs del tratamiento hormonal, el epitelio del tubo digestivo exhibe signos de desensamble de UAs con la concomitante endocitosis como parte de un sistema de reciclaje de cadherinas necesarias para el establecimiento y fortalecimiento de las nuevas uniones en el epitelio adulto. Estos procesos estarían acompañados por la migración y diferenciación de células madres; procesos que involucran a Rac1. Posteriormente y conforme se comienzan a establecer los primeros contactos entre células vecinas, en el epitelio superficial, se generarían los contactos iniciales que desencadenarían distintos procesos, entre los que se destacan la endocitosis de reciclaje de las cadherinas que, estarían involucradas en la activación de Rap1, promoviendo su translocación a la superficie reforzando la unión. Dicha hipótesis, se vio corroborada en los estudios ultraestructurales del epitelio gástrico en animales tratados durante 5 días con T3.

Con respecto a los niveles de expresión de Cdc42 registrados durante la remodelación del tracto intestinal de *Xenopus* inducida por T3, estos muestran que el gen no responde tempranamente al tratamiento en este tejido, aunque exhiben diferencias significativas respecto al grupo control. Estos resultados coinciden con los trabajos que establecen que esta GTPasa actúa conjuntamente con Rac1, produciendo efectos aparentemente similares en la barrera epitelial intestinal (Schlegel y col., 2011). El rol de Cdc42 en la dinámica de UAs es controvertida, mientras sus bajos niveles de activación se relacionan con el adelgazamiento de los haces de actina y los cambios en la arquitectura de las uniones epiteliales (Otani y col., 2006), su inhibición completa no induce cambios significativos en el citoesqueleto de actina asociado a las UAs (Kodama

y col., 1999; Rojas y col., 2001). Sin embargo, hay consenso sobre el rol que desempeña durante la determinación de la polaridad apico-basal epitelial, principalmente a través de la activación del complejo de polaridad Par3/Par6/aPKC (Yamanaka y col., 2001; Shin y col., 2006). Así, en ratones *knockdown* para Cdc42, Melendez y col. (2013) mostraron que en el intestino Cdc42 regula la polaridad, la proliferación, la migración y diferenciación de las células epiteliales, para mantener la barrera y la homeostasis intestinal. De hecho estos autores asociaron los defectos en la señalización de Cdc42 con enfermedades generadas por atrofia de microvellosidades. Estas actividades de Cdc42 se explican porque además de su vínculo con el complejo Par/aPKC durante la determinación de la polaridad, se comprobó que regula el tráfico vesicular dirigido por Rab8a para la adecuada formación de las microvellosidades de los enterocitos (Sakamori y col., 2012). En base a estos datos, algunos autores sugieren que el tejido gastrointestinal utiliza un programa de tráfico vesicular conservado y anterógrado, para la rápida renovación de células epiteliales (Yung y col., 2016).

A pesar de la importancia descrita para Cdc42 en el mantenimiento de la barrera epitelial, ni el GEF (FRG) ni el GAP (Rich) pudieron detectarse en los animales sometidos al tratamiento hormonal. Estos resultados sugieren una baja o nula respuesta a T3, aunque no puede descartarse la falta de sensibilidad de la técnica utilizada para el dosaje de los ARNm. Tampoco puede descartarse que las moléculas reguladoras de Cdc42 que intervienen en este sistema sean otras, no reportadas para *X. laevis*. En este sentido, se postula al GEF Tuba, como candidato a intervenir en los procesos de adhesión celular, dado que su depleción produce pérdida de haces de actina y cambios en la arquitectura de las uniones de las células epiteliales (Otani y col., 2006). En el caso del GAP Rich, si bien no se detectó en los animales premetamórficos ni en los tratados, sí exhibió niveles detectables en los tubos digestivos de los animales metamorfoseados espontáneamente (NF66), sugiriendo que no tendría un rol preponderante durante la metamorfosis, pero sí en el tejido adulto. Además de la regulación por Rich, se encontró un nuevo complejo de proteínas que comprende paracingulin y CD2AP (proteína asociada a CD2), que regularía la actividad Cdc42 en las uniones de las células de carcinoma intestinal, a través de su

interacción con el GAP SH3BP1 de Cdc42 (Elbediwy y col., 2012). SH3BP1 estaría implicado tanto en la maduración de las uniones célula-célula como en la remodelación de la actina en uniones maduras de cultivos de líneas celulares tumorales (Elbediwy y col., 2012).

Luego de 5 días de tratamiento Cdc42 no exhibe cambios respecto a las 24 hs, por lo tanto y de acuerdo con la hipótesis planteada sobre la vía de señalización de Rap1, luego de 5 días de tratamiento con T3, ésta podría actuar aumentando los niveles de activación de Cdc42, promoviendo la maduración de las UAs y la determinación de la polaridad ápico-basal característica de un epitelio maduro. En concordancia con esto, cabe remarcar que luego de 5 días con T3, si bien se observa un aumento de las zonas con el complejo tripartito apical en el epitelio gástrico, propio de un epitelio polarizado, aunque dicho efecto no fue uniforme en todo el epitelio, como el observado en los animales metamorfoseados espontáneamente. En cuanto a su activación, como se discutió en relación con la función de RhoA, durante la remodelación epitelial inducida por T3, podría ocurrir que la regulación hormonal actúe a nivel postraducciona, sobre niveles basales de Cdc42.

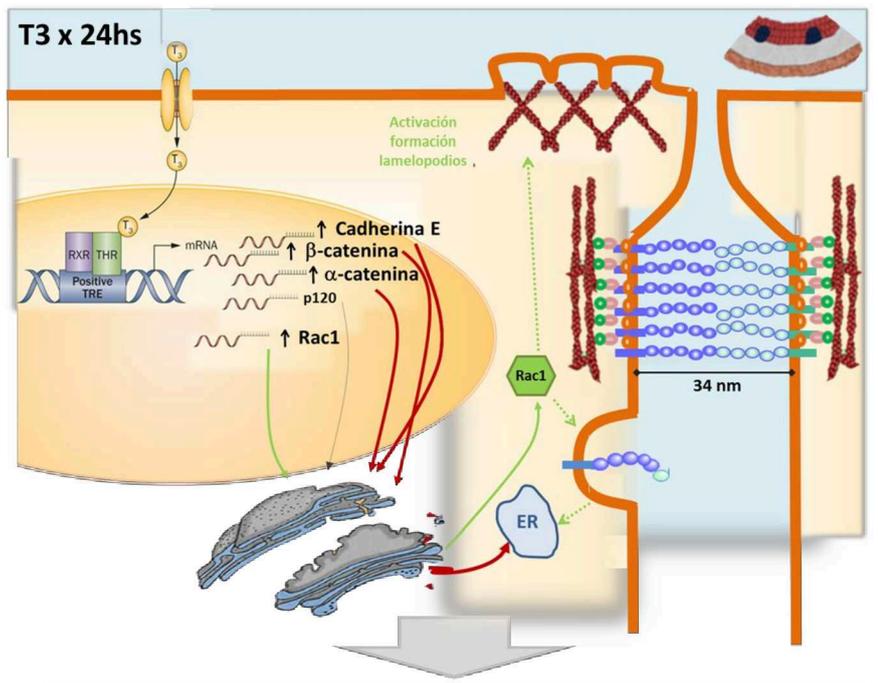
Al igual que con las moléculas de las UA y UE se analizó la presencia de ERT putativos en las GTPasas y sus reguladores. Se encontraron dichos sitios en las regiones reguladoras de todos los genes que mostraron respuesta a T3, ya sea en Rac1 que respondió tempranamente, como así también en aquellos que respondieron a los 5 días de tratamiento hormonal Rap1, TIAM, GAP12 y C3G. La metodología computacional utilizada, también permitió predecir la presencia de ERT putativos en RhoA, Cdc42, p190, SPA1 y FRG, genes que no mostraron cambios en sus niveles de ARNm en los tiempos de tratamiento estudiados. Esto último puede deberse a que el efecto de la hormona T3 es tejido específica, es decir el mismo gen puede ser inducido en un determinado tejido y no mostrar respuesta en otro bajo el mismo estímulo de T3, dependiendo del contexto celular y la presencia de correpresores y/o coactivadores (Shi, 2000; Shi y col., 2011), es decir que la sola presencia del ERT no garantiza la acción de la hormona.

Por lo tanto, se concluye que la hormona T3 regula positivamente las GTPasas pequeñas mediante la inducción de la transcripción de sus genes, aunque el

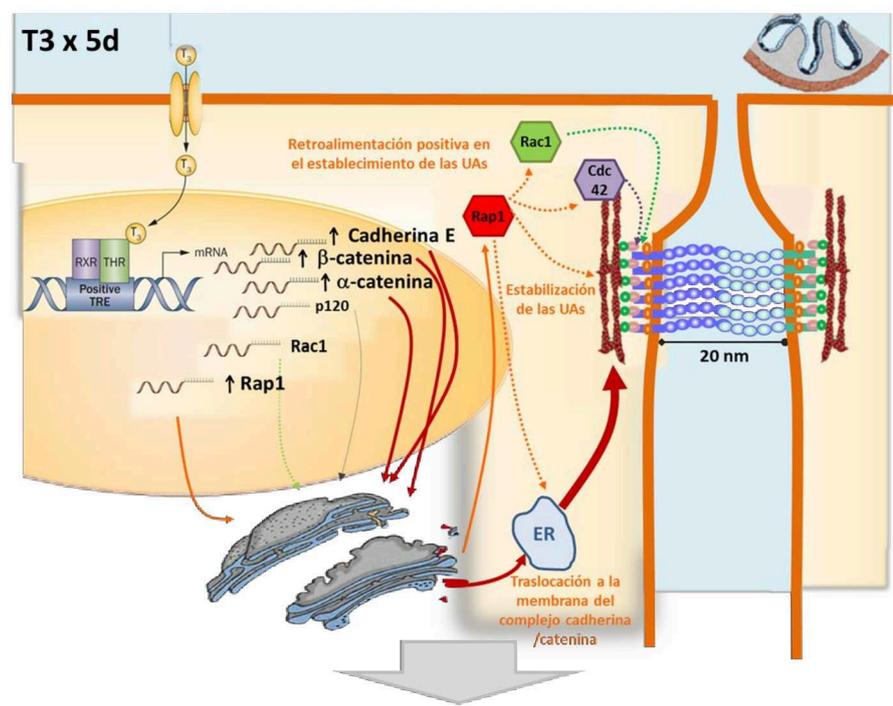
mecanismo exacto del proceso regulatorio requiere ser investigado más profundamente. Existen en la actualidad datos muy precisos que confirman la complejidad de este sistema, los cuales se obtienen gracias a sofisticadas técnicas que emplean biosensores que determinan la actividad de estas moléculas con elevada resolución espacio-temporal que revelan que sus actividades fluctúan en escalas de decenas de micrómetros y segundos, respectivamente.

Los perfiles de expresión génica determinados para las UAs, UEs, GTPAsas y sus reguladores, junto a la morfología de las UAs y UEs fueron similares a los observados en los tubos digestivos de los animales metamorfoseados espontáneamente, lo cual significa que la inducción con T3 durante 5 días produce efectos similares a los acontecidos durante la metamorfosis espontánea y la posiciona como una hormona determinante de los cambios producidos.

La **Figura 39** resume los principales resultados obtenidos en esta tesis y su implicancia en la remodelación del epitelio del tubo digestivo de anfibios durante la metamorfosis.



- Las UAs se desensamblan dando mayor flexibilidad permitiendo la movilidad celular y rearrreglo tisular (vesículas endocíticas, aumento del espacio intermembrana)
- Los primordios de progenitores epiteliales proliferarán y las células en diferenciación migrarán hasta sus destinos finales hasta establecer el epitelio adulto.



- Establecimiento y estabilización de las UAs en el epitelio adulto

Figura 39. Eventos moleculares desencadenados por la HT en el epitelio gastrointestinal durante la metamorfosis. A. Eventos tempranos B. Eventos tardíos

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis permiten arribar a las siguientes conclusiones:

- Mediante estudios bioinformáticos y de biología molecular se logró secuenciar y aislar un segmento del gen de β -catenina de un anfibio autóctono, el sapo *Rhinella arenarum*. En base a dicha secuencia se predijo la estructura primaria de un fragmento de la proteína correspondiente. Ambas secuencias mostraron poseer un elevado nivel de identidad con la de otras especies de vertebrados, demostrando el alto grado de conservación de su secuencia y en la filogenia de motivos característicos y fundamentales para la función y regulación de β -catenina.
- A nivel anatómico, se comprobó que el tratamiento hormonal de larvas premetamórficas tanto de *Rhinella arenarum*, como de *Xenopus laevis* resulta en una profunda remodelación craneal y en el desarrollo de los miembros posteriores, sin que se logre la reabsorción completa de la cola. Se produce una extensa remodelación y acortamiento del tubo digestivo; el mismo no llega a reproducir integralmente lo que ocurre durante la metamorfosis espontánea.
- A nivel histológico, se comprobó que el tratamiento con T3 provoca muerte celular programada y concomitantemente división celular en el epitelio estomacal de *Xenopus laevis*. Se verificó el engrosamiento de las capas epiteliales, musculares y serosa, aunque no se observó un desarrollo completo de la capa submucosa, ni de la muscular de la mucosa. Luego de 5 días de tratamiento los tejidos alcanzaron un nivel de remodelación similar al observado en el clímax metamórfico (~NF60) de la metamorfosis espontánea. Los cambios observados son congruentes con el modelo de remodelación gastrointestinal.
- A nivel ultraestructural, se probó que el epitelio gástrico superficial es significativamente modificado por la hormona T3, fundamentalmente a nivel de los complejos apicales (particularmente en las UAs y Dms). A las 24 hs, T3 induce remodelación del epitelio y modificación de la organización de las UAs y de los Dms y aumento de endocitosis, lo que permite postular que T3 induce el

desensamble de las UAs, de los Dms y el reciclaje de sus componentes. Luego de 5 días de tratamiento, la hormona induce la formación de nuevas UAs y Dms, configurando el complejo tripartito apical (UEs, UAs y Dms) característico de un epitelio adulto polarizado.

- A nivel molecular, se probó que los genes de cadherina E, β - y α -catenina son de respuesta temprana a T3 en el tejido gastrointestinal de *Xenopus laevis*. Esta respuesta también se confirmó para β -catenina de *Rhinella arenarum*. En contraste, el gen de p120 no responde tempranamente a T3, pese a que exhibe aumentos estadísticamente significativos. Estos resultados sugieren que para que se produzca la remodelación gastrointestinal resulta necesaria la síntesis *de novo* de estas moléculas, las que sumadas a las moléculas endocitadas y recicladas formarían los nuevos contactos necesarios para el establecimiento del epitelio adulto.
- A nivel bioinformático, se confirma que los genes de cadherina E, β - y α -catenina de *X. laevis* presentan en sus regiones reguladoras Elementos de Respuesta a T3 (ERT), mientras que dichos elementos no se encuentran en p120.
- El comportamiento de las moléculas de las UEs analizadas (occludina y ZO1) exhiben una respuesta desfasada ante el tratamiento hormonal de las UEs, comparada con las UAs. Así se refuerza la hipótesis de que bajo la inducción de T3 las UEs no son modificadas integralmente. Dicho comportamiento se asimila a la necesidad del mantenimiento de la función de barrera transepitelial necesaria aun en un tejido en proceso de renovación.
- A nivel molecular se comprobó que las GTPasas pequeñas son reguladas diferencialmente por la hormona T3 durante la remodelación del epitelio gastrointestinal de *X. laevis*. De las GTPasas analizadas, sólo el gen de Rac1 es de respuesta temprana a T3, lo que se correlaciona con los estudios bioinformáticos que muestran la presencia de ERTs en su región reguladora. Se postula que los efectos tempranos de la remodelación gastrointestinal inducidos por T3 estarían mediados principalmente por Rac1 y su GEF Tiam, así como otros GEFs y finalizando el proceso por Rap1.

Conclusión general

La morfogénesis epitelial se reconoce como un proceso crítico en la evolución de los organismos, porque es clave en el desarrollo de la multicelularidad de los seres vivos. El establecimiento de la polaridad celular vía el establecimiento de complejos de uniones célula-célula resulta ser uno de los eventos más relevantes de la conformación de los epitelios. Entre los complejos de unión conocidos, las UAs mediadas por cadherina E son esenciales no sólo desde el punto de vista biomecánico, sino también en relación con su rol como receptores de señalización inter- e intracelular. El establecimiento y mantenimiento de estas UAs durante la remodelación del epitelio gastrointestinal de *Xenopus laevis*, es directamente regida por la hormona T3, actuando a través de RTs sobre los genes integrales de estas uniones, cadherina E, β - y α -catenina y una de sus GTPasas reguladoras, Rac1. Corriente abajo en la cascada de señales involucradas temporalmente, otros actores bien conocidos son transcripcionalmente inducidos y sus productos funcionalmente activados –Cdc42, Rap1, C3G, GAP190, Rich1, TGGP.

La mayoría de los estudios realizados para intentar comprender los mecanismos de acción de estos complejos macromoleculares han sido desarrollados en sistemas *in vitro*. De allí, que los estudios como los de la presente tesis cobran especial importancia para una comprensión integral y real de la regulación de los procesos de adhesión intercelular en epitelios, así como para ser disparadores de nuevos interrogantes en la regulación de éstos en sistemas *in vivo*.

ANEXO. Bioensayo preliminar en *R. arenarum* para la selección de la concentración de T3.

Con el objetivo de establecer la concentración óptima de T3 como inductora de metamorfosis en *R. arenarum* se realizó una curva de calibrado. Larvas premetamórficas de estadio 33 (Gosner, 1960) fueron colocadas en recipientes plásticos. Tres grupos de larvas fueron incubadas en solución de 3,3',5-triiodotironina (T3) de 10 nM, 5 nM y 1,25 nM en agua artificial de laboratorio (AAL), durante 5 días. Los bioensayos se realizaron a una densidad de 10 larvas/L. Los animales fueron alimentados con lechuga hervida, mantenidos a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12 L:12 O. El AAL de todos los modelos se renovó diariamente durante los 5 días que duró el experimento. Como se puede observar claramente en la **Tabla 10** y **Figura 40**, los animales tratados con concentraciones de 5 y 10 nM presentan mayor desarrollo de los miembros posteriores y de uno de sus miembros anteriores, reabsorción de la cola casi completa y profunda remodelación de su cabeza y tronco. Estos resultados indicaron que la concentración de T3 más adecuada era la de 5 nM, debido al grado de metamorfosis logrado y a que con esta concentración se verifican mínimos signos de hiperactividad o muerte.

Tabla 10. Medias morfométricas y mortalidad

Muestra	Mortalidad	LCo/LCTr	LMP/LCTr
T3 10nM	75%	$0,10 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,04$
T3 5nM	0%	$0,20 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,05$
T3 1.25nM	0%	$0,40 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,04$
Control st 33	0%	$1,60 \pm 0,10$	$0,11 \pm 0,02$

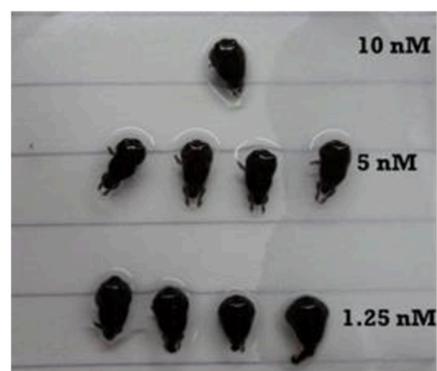


Figura 40. Efectos anatómicos sobre larvas premetamórficas de *R. arenarum* de las distintas concentraciones de T3

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aaltomaa, S., Kärjä, V., Lipponen, P., Isotalo, T., Kankkunen, J.P., Talja, M., and Mokka, R. (2005). Reduced alpha- and beta-catenin expression predicts shortened survival in local prostate cancer. *Anticancer Res.* 25, 4707–4712.
- Abe, K., and Takeichi, M. (2008). EPLIN mediates linkage of the cadherin–catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13–19.
- Aberle, H., Butz, S., Stappert, J., Weissig, H., Kemler, R., and Hoschuetzky, H. (1994). Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 12), 3655–3663.
- Aberle, H., Schwartz, H., Hoschuetzky, H., and Kemler, R. (1996). Single amino acid substitutions in proteins of the armadillo gene family abolish their binding to alpha-catenin. *J. Biol. Chem.* 271, 1520–1526.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–3804.
- Adams, C.L., and Nelson, W.J. (1998). Cyto mechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 572–577.
- Adams, C.L., Nelson, W.J., and Smith, S.J. (1996). Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 135, 1899–1911.
- Adams, C.L., Chen, Y.-T., Smith, S.J., and Nelson, W.J. (1998). Mechanisms of Epithelial Cell–Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-resolution Tracking of E-Cadherin– Green Fluorescent Protein. *J. Cell Biol.* 142, 1105–1119.
- Akhtar, N., and Hotchin, N.A. (2001). RAC1 regulates adherens junctions through endocytosis of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 12, 847–862.
- Al-Amoudi, A., Norlen, L.P.O., and Dubochet, J. (2004). Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *J. Struct. Biol.* 148, 131–135.
- Al-Amoudi, A., Díez, D.C., Betts, M.J., and Frangakis, A.S. (2007). The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. *Nature* 450, 832–837.
- Al Moustafa, A.E., Yansouni, C., Alaoui-Jamali, M.A., and O’Connor-McCourt, M. (1999). Up-regulation of E-cadherin by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 681–686.
- Alexander, J.S., Jackson, S.A., Chaney, E., Kevil, C.G., and Haselton, F.R. (1998). The role of cadherin endocytosis in endothelial barrier regulation: involvement of protein kinase C and actin-cadherin interactions. *Inflammation* 22, 419–433.
- Allen, B.M. (1925). The effects of extirpation of the thyroid and pituitary glands upon the limb development of Anurans. *J. Exp. Zool.* 42, 13–30.
- Al-Sadi, R.M., and Ma, T.Y. (2007). IL-1 β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Immunol.* 178, 4641–4649.
- Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., and Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G1054-1064.

Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A., and Yu, Y.-K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* 272, 5101–5109.

Amano, T. (1998). Isolation of genes involved in intestinal remodeling during anuran metamorphosis. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 6, 302–313.

Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. (2010). Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity. *Cytoskelet. Hoboken Nj* 67, 545–554.

Amano, T., Noro, N., Kawabata, H., Kobayashi, Y., and Yoshizato, K. (1998). Metamorphosis-associated and region-specific expression of calbindin gene in the posterior intestinal epithelium of *Xenopus laevis* larva. *Dev. Growth Differ.* 40, 177–188.

Amano, T., Fu, L., Marshak, A., Kwak, O., and Shi, Y.-B. (2005a). Spatio-temporal regulation and cleavage by matrix metalloproteinase stromelysin-3 implicate a role for laminin receptor in intestinal remodeling during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 234, 190–200.

Amano, T., Kwak, O., Fu, L., Marshak, A., and Shi, Y.-B. (2005b). The matrix metalloproteinase stromelysin-3 cleaves laminin receptor at two distinct sites between the transmembrane domain and laminin binding sequence within the extracellular domain. *Cell Res.* 15, 150–159.

Anastasiadis, P.Z. (2007). p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 34–46.

Anastasiadis, P.Z., and Reynolds, A.B. (2000). The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 8), 1319–1334.

Angst, B.D., Marozzi, C., and Magee, A.I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J. Cell Sci.* 114, 629–641.

Arthur, W.T., Petch, L.A., and Burridge, K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 10, 719–722.

Arthur, W.T., Quilliam, L.A., and Cooper, J.A. (2004). Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *J. Cell Biol.* 167, 111–122.

Assémat, E., Bazellères, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., and Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 614–630.

Atkinson, B.G., Warkman, A.S., and Chen, Y. (1998). Thyroid hormone induces a reprogramming of gene expression in the liver of premetamorphic *Rana catesbeiana* tadpoles. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 6, 323–337.

Bakolitsa, C., Cohen, D.M., Bankston, L.A., Bobkov, A.A., Cadwell, G.W., Jennings, L., Critchley, D.R., Craig, S.W., and Liddington, R.C. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* 430, 583–586.

Balzac, F., Avolio, M., Degani, S., Kaverina, I., Torti, M., Silengo, L., Small, J.V., and Retta, S.F. (2005). E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *J. Cell Sci.* 118, 4765–4783.

Bandapalli, O.R., Dihlmann, S., Helwa, R., Macher-Goeppinger, S., Weitz, J., Schirmacher, P., and Brand, K. (2009). Transcriptional activation of the beta-catenin gene at the invasion front of colorectal liver metastases. *J. Pathol.* 218, 370–379.

- Baranwal, S., and Alahari, S.K. (2009). Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 6–11.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779–827.
- Barrett, A.J., Woessner, J.F., and Rawlings, N.D. (2004). *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Elsevier).
- Barrington, E.J.W. (1946). The Delayed Development of the Stomach in the Frog (*Rana temporaria*) and the Toad (*Bufo bufo*). *Proc. Zool. Soc. Lond.* 116, 1–21.
- Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., and García De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–89.
- Bauer, A., Lickert, H., Kemler, R., and Stappert, J. (1998). Modification of the E-cadherin-Catenin Complex in Mitotic Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 28314–28321.
- Baum, B., and Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J. Cell Biol.* 192, 907–917.
- Beachy, C.K. (1997). Effect of Predatory Larval *Desmognathus quadramaculatus* on Growth, Survival, and Metamorphosis of Larval *Eurycea wilderae*. *Copeia* 1997, 131–137.
- de Beco, S., Gueudry, C., Amblard, F., and Coscoy, S. (2009). Endocytosis is required for E-cadherin redistribution at mature adherens junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7010–7015.
- de Beco, S., Ziosi, M., and Johnston, L.A. (2012). New frontiers in cell competition†. *Dev. Dyn.* 241, 831–841.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642.
- Behringer, R.R., Eakin, G.S., and Renfree, M.B. (2006). Mammalian diversity: gametes, embryos and reproduction. *Reprod Fertil Dev* 18, 99–107.
- Bernal, J. (2005). Thyroid hormones and brain development. *Vitam. Horm.* 71, 95–122.
- Bertrand, S., Brunet, F.G., Escriva, H., Parmentier, G., Laudet, V., and Robinson-Rechavi, M. (2004). Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1923–1937.
- Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J.M., Alvarez, A.B., Peña, R., Bonilla, F., and de Herreros, A.G. (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.* 22, 756–769.
- Benitah, S.A., Valerón, P.F., van Aelst, L., Marshall, C.J., and Lacal, J.C. (2004). Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1705, 121–132.
- Benjamin, J.M., and Nelson, W.J. (2008). Bench to Bedside and Back Again: Molecular Mechanisms of α -Catenin Function and Roles in Tumorigenesis. *Semin. Cancer Biol.* 18, 53–64.
- Berg, O.G., and von Hippel, P.H. (1987). Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. *J. Mol. Biol.* 193, 723–743.

- Berx, G., Staes, K., van Hengel, J., Molemans, F., Bussemakers, M.J., van Bokhoven, A., and van Roy, F. (1995). Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 26, 281–289.
- Berx, G., Cleton-Jansen, A.M., Strumane, K., de Leeuw, W.J., Nollet, F., van Roy, F., and Cornelisse, C. (1996). E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 13, 1919–1925.
- Berx, G., Becker, K.F., Höfler, H., and van Roy, F. (1998). Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum. Mutat.* 12, 226–237.
- Betson, M., Lozano, E., Zhang, J., and Braga, V.M.M. (2002). Rac Activation upon Cell-Cell Contact Formation Is Dependent on Signaling from the Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 36962–36969.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G., Boddien, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., and Engler, J.A. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 4, 197–250.
- Blacher, L.J., Woronzowa, M.A., Liosner, L.D., and Samarajew, W.N. (1931). Resorptionsprozesse als Quelle der Formbildung. *Wilhelm Roux Arch. Für Entwicklungsmechanik Org.* 124, 138–153.
- Blangy, A., Vignal, E., Schmidt, S., Debant, A., Gauthier-Rouviere, C., and Fort, P. (2000). TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci* 113, 729–739.
- Blaschuk, O.W., and Farookhi, R. (1989). Estradiol stimulates cadherin expression in rat granulosa cells. *Dev. Biol.* 136, 564–567.
- Blaschuk, O.W., Sullivan, R., David, S., and Pouliot, Y. (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev. Biol.* 139, 227–229.
- Boccellino, M., Camussi, G., Giovane, A., Ferro, L., Calderaro, V., Balestrieri, C., and Quagliuolo, L. (2005). Platelet-activating factor regulates cadherin-catenin adhesion system expression and beta-catenin phosphorylation during Kaposi's sarcoma cell motility. *Am. J. Pathol.* 166, 1515–1522.
- Boettner, B., and Van Aelst, L. (2009). Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 684–693.
- Boettner, B., Govek, E.E., Cross, J., and Van Aelst, L. (2000). The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9064–9069.
- Bogatcheva, N.V., and Verin, A.D. (2008). The role of cytoskeleton in the regulation of vascular endothelial barrier function. *Microvasc. Res.* 76, 202–207.
- Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308–1313.
- Boissel, L., Houssin, N., Chikh, A., Rynditch, A., Van Hove, L., and Moreau, J. (2007). Recruitment of Cdc42 through the GAP domain of RLIP participates in remodeling of the actin cytoskeleton and is involved in *Xenopus* gastrulation. *Dev. Biol.* 312, 331–343.
- Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 395–447.

- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865–877.
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J., and Burridge, K. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat. Cell Biol.* 12, 477–483.
- Bowers, M.A. (1909). Histogenesis and histolysis of the intestinal epithelium of *Bufo lentiginosus*. *Am. J. Anat.* 9, 263–279.
- Bowley, E., O’Gorman, D.B., and Gan, B.S. (2007). Beta-catenin signaling in fibroproliferative disease. *J Surg Res* 138, 141–150.
- Braga, V. (2000). Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Exp. Cell Res.* 261, 83–90.
- Braga, V.M.M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 546–556.
- Braga, V.M., and Yap, A.S. (2005). The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 466–474.
- Braga, V.M., Machesky, L.M., Hall, A., and Hotchin, N.A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* 137, 1421–1431.
- Brasch, J., Harrison, O.J., Ahlsen, G., Carnally, S.M., Henderson, R.M., Honig, B., and Shapiro, L. (2011). Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin: a divergent classical cadherin. *J. Mol. Biol.* 408, 57–73.
- Brembeck, F.H., Rosário, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 51–59.
- Brieher, W.M., and Gumbiner, B.M. (1994). Regulation of C-cadherin function during activin induced morphogenesis of *Xenopus* animal caps. *J. Cell Biol.* 126, 519–527.
- Brooke, M.A., Nitoiu, D., and Kelsell, D.P. (2012). Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. *J. Pathol.* 226, 158–171.
- Brooke, M.A., Etheridge, S.L., Kaplan, N., Simpson, C., O’Toole, E.A., Ishida-Yamamoto, A., Marches, O., Getsios, S., and Kelsell, D.P. (2014). iRHOM2-dependent regulation of ADAM17 in cutaneous disease and epidermal barrier function. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4064–4076.
- Brown, D.D. (2005). The Role of Deiodinases in Amphibian Metamorphosis. *Thyroid* 15, 815–821.
- Brown, D.D., and Cai, L. (2007). Amphibian metamorphosis. *Dev. Biol.* 306, 20–33.
- Brown, K.E., and Yamada, K.M. (1995). The role of integrins during vertebrate development. *Semin. Dev. Biol.* 6, 69–77.
- Brown, D.D., Wang, Z., Furlow, J.D., Kanamori, A., Schwartzman, R.A., Remo, B.F., and Pinder, A. (1996). The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1924–1929.
- Bryant, D.M., and Mostov, K.E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 887–901.
- Bryant, D.M., and Stow, J.L. (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends Cell Biol.* 14, 427–434.

- Bryant, D.M., Wylie, F.G., and Stow, J.L. (2005). Regulation of endocytosis, nuclear translocation, and signaling of fibroblast growth factor receptor 1 by E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 16, 14–23.
- Bryant, D.M., Kerr, M.C., Hammond, L.A., Joseph, S.R., Mostov, K.E., Teasdale, R.D., and Stow, J.L. (2007). EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *J. Cell Sci.* 120, 1818–1828.
- Buchholz, D.R., Hsia, S.-C.V., Fu, L., and Shi, Y.-B. (2003). A Dominant-Negative Thyroid Hormone Receptor Blocks Amphibian Metamorphosis by Retaining Corepressors at Target Genes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6750–6758.
- Buchholz, D.R., Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (2004). Spatial and temporal expression pattern of a novel gene in the frog *Xenopus laevis*: correlations with adult intestinal epithelial differentiation during metamorphosis. *Gene Expr. Patterns GEP* 4, 321–328.
- Buchholz, D.R., and Hayes, T.B. (2005). Variation in thyroid hormone action and tissue content underlies species differences in the timing of metamorphosis in desert frogs. *Evol. Dev.* 7, 458–467.
- Buchholz, D.R., Paul, B.D., Fu, L., and Shi, Y.-B. (2006). Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145, 1–19.
- Buchholz, D.R., Heimeier, R.A., Das, B., Washington, T., and Shi, Y.-B. (2007). Pairing morphology with gene expression in thyroid hormone-induced intestinal remodeling and identification of a core set of TH-induced genes across tadpole tissues. *Dev. Biol.* 303, 576–590.
- Buckbinder, L., and Brown, D.D. (1992). Thyroid hormone-induced gene expression changes in the developing frog limb. *J. Biol. Chem.* 267, 25786–25791.
- Buckbinder, L., and Brown, D.D. (1993). Expression of the *Xenopus laevis* prolactin and thyrotropin genes during metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3820–3824.
- Bullions, L.C., Notterman, D.A., Chung, L.S., and Levine, A.J. (1997). Expression of wild-type alpha-catenin protein in cells with a mutant alpha-catenin gene restores both growth regulation and tumor suppressor activities. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4501–4508.
- Burdisso, J.E., González, Á., and Arregui, C.O. (2013). PTP1B promotes focal complex maturation, lamellar persistence and directional migration. *J Cell Sci* 126, 1820–1831.
- Bustos, R.I., Forget, M.-A., Settleman, J.E., and Hansen, S.H. (2008). Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr. Biol. CB* 18, 1606–1611.
- Cadigan, K.M., and Peifer, M. (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002881.
- Cai, D., Chen, S.-C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Choesmel-Cadamuro, V., Sawyer, J.K., Danuser, G., and Montell, D.J. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* 157, 1146–1159.
- Callery, E.M., Fang, H., and Elinson, R.P. (2001). Frogs without polliwogs: evolution of anuran direct development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 23, 233–241.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 237–251.

- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76–83.
- Carr, J.A., and Patiño, R. (2011). The hypothalamus–pituitary–thyroid axis in teleosts and amphibians: Endocrine disruption and its consequences to natural populations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 299–312.
- Carroll, S.B., Grenier, J.K., and Weatherbee, S.D. (2001). *From DNA to Diversity, Molecular Genetics and Evolution of Animal Design*. ResearchGate.
- Cavallaro, U., and Dejana, E. (2011). Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 189–197.
- Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P.-F., and Lecuit, T. (2008). A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature* 453, 751–756.
- Cerejido, M., González-Mariscal, L., Contreras, R.G., Gallardo, J.M., García-Villegas, R., and Valdés, J. (1993). The making of a tight junction. *J Cell Sci* 1993, 127–132.
- Cerejido, M., Contreras, R.G., and Shoshani, L. (2004). Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol. Rev.* 84, 1229–1262.
- Chalmers, A.D., and Slack, J.M. (1998). Development of the gut in *Xenopus laevis*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 212, 509–521.
- Chandhoke, S.K., and Mooseker, M.S. (2012). A role for myosin IXb, a motor–RhoGAP chimera, in epithelial wound healing and tight junction regulation. *Mol. Biol. Cell* 23, 2468–2480.
- Chassande, O., Fraichard, A., Gauthier, K., Flamant, F., Legrand, C., Savatier, P., Laudet, V., and Samarut, J. (1997). Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 11, 1278–1290.
- Chen, X., and Macara, I.G. (2005). Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat. Cell Biol.* 7, 262–269.
- Chen, F., Zhang, Q., McDonald, T., Davidoff, M.J., Bailey, W., Bai, C., Liu, Q., and Caskey, C.T. (1999). Identification of two hERR2-related novel nuclear receptors utilizing bioinformatics and inverse PCR. *Gene* 228, 101–109.
- Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* 93, 269–309.
- Chiasson, C.M., Wittich, K.B., Vincent, P.A., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2009). p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 20, 1970–1980.
- Chitaev, N.A., and Troyanovsky, S.M. (1998). Adhesive But Not Lateral E-cadherin Complexes Require Calcium and Catenins for Their Formation. *J. Cell Biol.* 142, 837–846.
- Cho, I.J., Kim, Y.W., Han, C.Y., Kim, E.H., Anderson, R.A., Lee, Y.S., Lee, C.H., Hwang, S.J., and Kim, S.G. (2010). E-Cadherin Antagonizes Transforming Growth Factor β 1 Gene Induction in Hepatic Stellate Cells by Inhibiting RhoA–Dependent Smad3 Phosphorylation. *Hepatology. Baltim. Md* 52, 2053–2064.
- Choi, H.-J., and Weis, W.I. (2005). Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J. Mol. Biol.* 346, 367–376.

- Choi, S.-C., and Han, J.-K. (2002). *Xenopus* Cdc42 regulates convergent extension movements during gastrulation through Wnt/Ca²⁺ signaling pathway. *Dev. Biol.* 244, 342–357.
- Choi, Y.S., Sehgal, R., McCrea, P., and Gumbiner, B. (1990). A cadherin-like protein in eggs and cleaving embryos of *Xenopus laevis* is expressed in oocytes in response to progesterone. *J. Cell Biol.* 110, 1575–1582.
- Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24, 73–76.
- Chu, Y.-S., Thomas, W.A., Eder, O., Pincet, F., Perez, E., Thiery, J.P., and Dufour, S. (2004). Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J. Cell Biol.* 167, 1183–1194.
- Ciana, P., Braliou, G.G., Demay, F.G., von Lindern, M., Baretino, D., Beug, H., and Stunnenberg, H.G. (1998). Leukemic transformation by the v-ErbA oncoprotein entails constitutive binding to and repression of an erythroid enhancer in vivo. *EMBO J.* 17, 7382–7394.
- Citalán-Madrid, A.F., García-Ponce, A., Vargas-Robles, H., Betanzos, A., and Schnoor, M. (2013). Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms. *Tissue Barriers* 1.
- Citi, S., Spadaro, D., Schneider, Y., Stutz, J., and Pulimeno, P. (2011). Regulation of small GTPases at epithelial cell-cell junctions. *Mol. Membr. Biol.* 28, 427–444.
- Citi, S., Guerrero, D., Spadaro, D., and Shah, J. (2014). Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases* 5, 1–15.
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *J. Membr. Biol.* 39, 219–232.
- Cleton-Jansen, A.-M. (2002). E-cadherin and loss of heterozygosity at chromosome 16 in breast carcinogenesis: different genetic pathways in ductal and lobular breast cancer? *Breast Cancer Res. BCR* 4, 5–8.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469–480.
- Coates, J.C. (2003). Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol* 13, 463–471.
- Coates, J.C., Grimson, M.J., Williams, R.S.B., Wayland Bergman, Blanton, R.L., and Harwood, A.J. (2002). Loss of the beta-catenin homologue *aardvark* causes ectopic stalk formation in *Dictyostelium*. *Mech Dev* 116, 117–127.
- Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T., and Bergelson, J.M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15191–15196.
- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B., Hardin, J., and Priess, J.R. (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Biol.* 141, 297–308.
- Curtis, M.W., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2008). E-cadherin/catenin complexes are formed co-translationally in the endoplasmic reticulum/Golgi compartments. *Cell Commun. Adhes.* 15, 365–378.
- Damjanovski, S., Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.B. (1999). Spatial and temporal regulation of collagenases-3, -4, and stromelysin -3 implicates distinct functions in apoptosis and tissue remodeling during frog metamorphosis. *Cell Res.* 9, 91–105.

- Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. (1999). The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3614–3623.
- Das, B., Cai, L., Carter, M.G., Piao, Y.-L., Sharov, A.A., Ko, M.S.H., and Brown, D.D. (2006). Gene expression changes at metamorphosis induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis* tadpoles. *Dev. Biol.* 291, 342–355.
- Das, B., Heimeier, R.A., Buchholz, D.R., and Shi, Y.-B. (2009). Identification of direct thyroid hormone response genes reveals the earliest gene regulation programs during frog metamorphosis. *J. Biol. Chem.* 284, 34167–34178.
- Dauca, M., and Hourdry, J. (1985). *Metamorphosis: The Eighth Symposium of the British Society for Developmental Biology* (. Press New YorkPress New YorkOxford Univ 37–58.
- Davis, M.A., and Reynolds, A.B. (2006). Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland. *Dev. Cell* 10, 21–31.
- Davis, P.J., and Davis, F.B. (1996). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 6, 497–504.
- Davis, M.A., Ireton, R.C., and Reynolds, A.B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J. Cell Biol.* 163, 525–534.
- Debant, A., Serra-Pagès, C., Seipel, K., O’Brien, S., Tang, M., Park, S.H., and Streuli, M. (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5466–5471.
- Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvarezza, S., Schreiner, R., and Rodriguez-Boulan, E. (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* 452, 719–723.
- Decker, R.S. (1976). Hormonal regulation of gap junction differentiation. *J. Cell Biol.* 69, 669–685.
- Dentice, M., Luongo, C., Ambrosio, R., Sibilio, A., Casillo, A., Iaccarino, A., Troncone, G., Fenzi, G., Larsen, P.R., and Salvatore, D. (2012). β -Catenin regulates deiodinase levels and thyroid hormone signaling in colon cancer cells. *Gastroenterology* 143, 1037–1047.
- Denver, R.J., Glennemeier, K.A., and Boorse, G.C. (2002). Endocrinology of complex life cycles: amphibians. In *Hormones, Brain and Behavior*, (Academic Press), p.
- Desai, R., Sarpal, R., Ishiyama, N., Pellikka, M., Ikura, M., and Tepass, U. (2013). Monomeric α -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 15, 261–273.
- Desai, R.A., Gao, L., Raghavan, S., Liu, W.F., and Chen, C.S. (2009). Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin. *J. Cell Sci.* 122, 905–911.
- Dhawan, P., Singh, A.B., Deane, N.G., No, Y., Shiou, S.-R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M.K., and Beauchamp, R.D. (2005). Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J. Clin. Invest.* 115, 1765–1776.
- Dickinson, D.J., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2011). A polarized epithelium organized by beta- and alpha-catenin predates cadherin and metazoan origins. *Science* 331, 1336–1339.
- Dickinson, D.J., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2012). An epithelial tissue in *Dictyostelium* challenges the traditional origin of metazoan multicellularity. *BioEssays* 34, 833–840.

- Ding, V.M.Y., Ling, L., Natarajan, S., Yap, M.G.S., Cool, S.M., and Choo, A.B.H. (2010). FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling. *J. Cell. Physiol.* 225, 417–428.
- Dise, R.S., Frey, M.R., Whitehead, R.H., and Polk, D.B. (2008). Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G276–G285.
- Dodd, M.H.I., and Dodd, J.M. (1976). *Physiology of the Amphibia* (Elsevier).
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123, 903–915.
- Drenckhahn, D., and Dermietzel, R. (1988). Organization of the actin filament cytoskeleton in the intestinal brush border: a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. *J. Cell Biol.* 107, 1037–1048.
- Drenckhahn, D., and Franz, H. (1986). Identification of actin-, alpha-actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 102, 1843–1852.
- D'Souza-Schorey, C. (2005). Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends Cell Biol.* 15, 19–26.
- Dubé, N., Kooistra, M.R.H., Pannekoek, W.-J., Vliem, M.J., Oorschot, V., Klumperman, J., Rehmann, H., and Bos, J.L. (2008). The RapGEF PDZ-GEF2 is required for maturation of cell-cell junctions. *Cell. Signal.* 20, 1608–1615.
- Duc, Q. le, Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and Rooij, J. de (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J. Cell Biol.* 189, 1107–1115.
- Duesberg, J. (1906). Contribution a l'étude des phénomènes histologiques de la métamorphose chez les Amphibiens anoures. *Arch. d. Biol.* 22, 163.
- Dunsmuir, W.D., Gillett, C.E., Meyer, L.C., Young, M.P., Corbishley, C., Eeles, R.A., and Kirby, R.S. (2000). Molecular markers for predicting prostate cancer stage and survival. *BJU Int.* 86, 869–878.
- Ebnet, K., Schulz, C.U., Meyer Zu Brickwedde, M.K., Pendl, G.G., and Vestweber, D. (2000). Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* 275, 27979–27988.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer Zu Brickwedde, M.K., Ohno, S., and Vestweber, D. (2001). The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *EMBO J.* 20, 3738–3748.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M.-K., Suzuki, A., Imhof, B.A., and Vestweber, D. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J. Cell Sci.* 116, 3879–3891.
- Ehrlich, J.S., Hansen, M.D.H., and Nelson, W.J. (2002). Spatio-Temporal Regulation of Rac1 Localization and Lamellipodia Dynamics during Epithelial Cell-Cell Adhesion. *Dev. Cell* 3, 259–270.
- Elbediwy, A., Zihni, C., Terry, S.J., Clark, P., Matter, K., and Balda, M.S. (2012). Epithelial junction formation requires confinement of Cdc42 activity by a novel SH3BP1 complex. *J. Cell Biol.* 198, 677–693.

- Espejo, R., Rengifo-Cam, W., Schaller, M.D., Evers, B.M., and Sastry, S.K. (2010). PTP-PEST controls motility, adherens junction assembly, and Rho GTPase activity in colon cancer cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 299, C454–C463.
- Espina, C., Céspedes, M.V., García-Cabezas, M.A., del Pulgar, M.T.G., Boluda, A., Oroz, L.G., Cejas, P., Nistal, M., Mangués, R., and Lacal, J.C. (2008). A Critical Role for Rac1 in Tumor Progression of Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *Am. J. Pathol.* 172, 156–166.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629–635.
- Etkin, W. (1968). *Metamorphosis : a problem in developmental biology*. N. Y. Appleton-Century-Crofts 459.
- Fannon, A.M., and Colman, D.R. (1996). A Model for Central Synaptic Junctional Complex Formation Based on the Differential Adhesive Specificities of the Cadherins. *Neuron* 17, 423–434.
- Farookhi, R., Geng, C.S., MacCalman, C.D., and Blaschuk, O.W. (1997). Hormonal regulation of N-cadherin mRNA levels in rat granulosa cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 816, 165–172.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional Complexes in Various Epithelia. *J. Cell Biol.* 17, 375–412.
- Fawcett, D.W., and McNutt, N.S. (1969). THE ULTRASTRUCTURE OF THE CAT MYOCARDIUM I. Ventricular Papillary Muscle. *J. Cell Biol.* 42, 1–45.
- Fay, D.S., and Gerow, K. (2013). A biologist's guide to statistical thinking and analysis. *WormBook Online Rev. C Elegans Biol.* 1–54.
- Ferrari, A., Lascano, C.I., Anguiano, O.L., D'Angelo, A.M.P. de, and Venturino, A. (2009). Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. *Aquat Toxicol* 93, 37–44.
- Flamant, F., and Samarut, J. (2003). Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 14, 85–90.
- Fort, D.J., Degitz, S., Tietge, J., and Touart, L.W. (2007). The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in frogs and its role in frog development and reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 117–161.
- Forte, T.M., and Forte, J.G. (1970). Histochemical staining and characterization of glycoproteins in Acid-secreting cells of frog stomach. *J. Cell Biol.* 47, 437–452.
- Forte, G.M., Limlomwongse, L., and Forte, J.G. (1969). The development of intracellular membranes concomitant with the appearance of HCl secretion in oxyntic cells of the metamorphosing bullfrog tadpole. *J. Cell Sci.* 4, 709–727.
- Fox, H. (1970). Tissue degeneration: an electron microscopic study of the pronephros of *Rana temporaria*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 24, 139–157.
- Fox, H., Bailey, E., and Mahoney, R. (1972). Aspects of the ultrastructure of the alimentary canal and respiratory ducts in *Xenopus laevis* larvae. *J. Morphol.* 138, 387–405.
- Franke, W.W. (2009). Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003061.
- Fu, L., Hasebe, T., Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (2007). Roles of Matrix Metalloproteinases and ECM Remodeling during Thyroid Hormone-Dependent Intestinal Metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Organogenesis* 3, 14–19.

- Fujieda, M., Murata, Y., Hayashi, H., Kambe, F., Matsui, N., and Seo, H. (1993). Effect of thyroid hormone on epidermal growth factor gene expression in mouse submandibular gland. *Endocrinology* 132, 121–125.
- Fujimoto, K. (1995). Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 11), 3443–3449.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H.E.M., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 222–231.
- Fukata, M., and Kaibuchi, K. (2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 887–897.
- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A., et al. (1999). Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 274, 26044–26050.
- Fukuhara, A., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuhara, T., and Takai, Y. (2003). Involvement of nectin-activated Cdc42 small G protein in organization of adherens and tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 278, 51885–51893.
- Fukuhara, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuyama, T., Minami, Y., Honda, T., Hoshino, T., Yamada, T., Ogita, H., Okada, M., et al. (2004). Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *J. Cell Biol.* 166, 393–405.
- Fukuyama, T., Ogita, H., Kawakatsu, T., Fukuhara, T., Yamada, T., Sato, T., Shimizu, K., Nakamura, T., Matsuda, M., and Takai, Y. (2005a). Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions. *J. Biol. Chem.* 280, 815–825.
- Fukuyama, T., Ogita, H., Kawakatsu, T., Inagaki, M., and Takai, Y. (2005b). Activation of Rac by cadherin through the c-Src-Rap1-phosphatidylinositol 3-kinase-Vav2 pathway. *Oncogene* 25, 8–19.
- Furlow, J.D., and Neff, E.S. (2006). A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 40–47.
- Furlow, J.D., Berry, D.L., Wang, Z., and Brown, D.D. (1997). A set of novel tadpole specific genes expressed only in the epidermis are down-regulated by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Dev. Biol.* 182, 284–298.
- Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 16, 181–188.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539–1550.
- Galetto, C.D., Izaguirre, M.F., Bessone, V., and Casco, V.H. (2012). Isolation and nucleotide sequence analysis of the of *Rhinella arenarum* β -catenin: an mRNA and protein expression study during the larval stages of the digestive tract development. *Gene* 511, 256–264.

- Gallet, A., Angelats, C., Erkner, A., Charroux, B., Fasano, L., and Kerridge, S. (1999). The C-terminal domain of armadillo binds to hypophosphorylated teashirt to modulate wingless signalling in *Drosophila*. *EMBO J.* 18, 2208–2217.
- García de Herreros, A., and Baulida, J. (2012). Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1825, 223–228.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., and BurrIDGE, K. (2011). The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHO GDI. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 493–504.
- Garrod, D., and Chidgey, M. (2008). Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 572–587.
- Garrod, D., and Kimura, T.E. (2008). Hyper-adhesion: a new concept in cell–cell adhesion. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 195–201.
- Garrod, D.R., and Fleming, S. (1990). Early expression of desmosomal components during kidney tubule morphogenesis in human and murine embryos. *Development* 108, 313–321.
- Garrod, D.R., Berika, M.Y., Bardsley, W.F., Holmes, D., and Taberero, L. (2005). Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *J. Cell Sci.* 118, 5743–5754.
- Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B., and Vogel, J. (2009). Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *ELECTROPHORESIS* 30, 1845–1855.
- Gates, J., and Peifer, M. (2005). Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell* 123, 769–772.
- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* 8, 1223–1234.
- Ge, X., Jin, Q., Zhang, F., Yan, T., and Zhai, Q. (2009). PCAF acetylates {beta}-catenin and improves its stability. *Mol. Biol. Cell* 20, 419–427.
- Geisbrecht, E.R., and Montell, D.J. (2002). Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat. Cell Biol.* 4, 616–620.
- Gentile, A., D’Alessandro, L., Lazzari, L., Martinoglio, B., Bertotti, A., Mira, A., Lanzetti, L., Comoglio, P.M., and Medico, E. (2008). Met-driven invasive growth involves transcriptional regulation of Arhgap12. *Oncogene* 27, 5590–5598.
- Gentile, S., Darden, T., Erxleben, C., Romeo, C., Russo, A., Martin, N., Rossie, S., and Armstrong, D.L. (2006). Rac GTPase signaling through the PP5 protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5202–5206.
- Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., and Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr. Biol. CB* 18, 1631–1638.
- Getsios, S., Huen, A.C., and Green, K.J. (2004). Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 271–281.
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology* (Sinauer Associates).
- Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* 15, 391–407.

- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81, 1–44.
- Goode, B.L., and Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 593–627.
- Gosner, K.L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica* 16, 183–190.
- Gottardi, C.J., and Gumbiner, B.M. (2001). Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr. Biol. CB* 11, R792–794.
- Graff, J.R., Gabrielson, E., Fujii, H., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J. Biol. Chem.* 275, 2727–2732.
- Griffiths, I. (1961). The Form and Function of the Fore-Gut in Anuran Larvae (amphibia, Salientia) with Particular Reference to the Manicotto Glandulare. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 137, 249–283.
- Grimaldi, A., Buisine, N., Miller, T., Shi, Y.-B., and Sachs, L.M. (2013). Mechanisms of thyroid hormone receptor action during development: Lessons from amphibian studies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830, 3882–3892.
- Grimson, M.J., Coates, J.C., Reynolds, J.P., Shipman, M., Blanton, R.L., and Harwood, A.J. (2000). Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature* 408, 727–731.
- Grindstaff, K.K., Yeaman, C., Anandasabapathy, N., Hsu, S.-C., Rodriguez-Boulan, E., Scheller, R.H., and Nelson, W.J. (1998). Sec6/8 Complex Is Recruited to Cell–Cell Contacts and Specifies Transport Vesicle Delivery to the Basal-Lateral Membrane in Epithelial Cells. *Cell* 93, 731–740.
- Guaïta, S., Puig, I., Franci, C., Garrido, M., Dominguez, D., Batlle, E., Sancho, E., Dedhar, S., De Herreros, A.G., and Baulida, J. (2002). Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J. Biol. Chem.* 277, 39209–39216.
- Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 622–634.
- Gumbiner, B., and Simons, K. (1987). The role of uvomorulin in the formation of epithelial occluding junctions. *Ciba Found. Symp.* 125, 168–186.
- Gumbiner, B., Stevenson, B., and Grimaldi, A. (1988). The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.* 107, 1575–1587.
- Guyton, C., and Hall, J. (2006). *Tratado de fisiología médica* (Madrid: Elsevier).
- Habas, R., Dawid, I.B., and He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev.* 17, 295–309.
- Haigo, S.L., Hildebrand, J.D., Harland, R.M., and Wallingford, J.B. (2003). Shroom induces apical constriction and is required for hinge point formation during neural tube closure. *Curr. Biol. CB* 13, 2125–2137.
- Hajra, K.M., and Fearon, E.R. (2002). Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* 34, 255–268.

- Han, S.P., and Yap, A.S. (2012). The Cytoskeleton and Classical Cadherin Adhesions. In *Adherens Junctions: From Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease*, T. Harris, ed. (Springer Netherlands), pp. 111–135.
- Handschuh, G., Lubert, B., Hutzler, P., Höfler, H., and Becker, K.F. (2001). Single amino acid substitutions in conserved extracellular domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J. Mol. Biol.* 314, 445–454.
- Hansen, C.G., and Nichols, B.J. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J. Cell Sci.* 122, 1713–1721.
- Harris, K.P., and Tepass, U. (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *J. Cell Biol.* 183, 1129–1143.
- Harris, T.J.C., and Peifer, M. (2005). The positioning and segregation of apical cues during epithelial polarity establishment in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 170, 813–823.
- Harris, T.J.C., and Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 502–514.
- Harrison, O.J., Corps, E.M., and Kilshaw, P.J. (2005). Cadherin adhesion depends on a salt bridge at the N-terminus. *J. Cell Sci.* 118, 4123–4130.
- Harrison, O.J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Ahlsen, G., Brasch, J., Wu, Y., Vendome, J., Felsovalyi, K., Hampton, C.M., et al. (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Struct. Lond. Engl.* 19, 244–256.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2012). Competitive Regulation of E-Cadherin JuxtaMembrane Domain Degradation by p120-Catenin Binding and Hakai-Mediated Ubiquitination. *PLOS ONE* 7, e37476.
- Hasebe, T., Fu, L., Miller, T.C., Zhang, Y., Shi, Y.-B., and Ishizuya-Oka, A. (2013). Thyroid hormone-induced cell-cell interactions are required for the development of adult intestinal stem cells. *Cell Biosci.* 3, 18.
- Haskell, M.D., Slack, J.K., Parsons, J.T., and Parsons, S.J. (2001). c-Src tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, P190 RhoGAP, and focal adhesion kinase regulates diverse cellular processes. *Chem. Rev.* 101, 2425–2440.
- Hatsell, S., and Cowin, P. (2001). Deconstructing desmoplakin. *Nat. Cell Biol.* 3, E270–E272.
- Hausen, P., and Riebesell, M. (1991). *The Early Development of Xenopus Laevis: An Atlas of the Histology* (Verlag der Zeitschrift für Naturforschung).
- Haussinger, D., Ahrens, T., Sass, H.-J., Pertz, O., Engel, J., and Grzesiek, S. (2002). Calcium-dependent Homoassociation of E-cadherin by NMR Spectroscopy: Changes in Mobility, Conformation and Mapping of Contact Regions. *J. Mol. Biol.* 324, 823–839.
- Haussinger, D., Ahrens, T., Aberle, T., Engel, J., Stetefeld, J., and Grzesiek, S. (2004). Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J.* 23, 1699–1708.
- Hay, E.D. (1991). Collagen and Other Matrix Glycoproteins in Embryogenesis. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*, E.D. Hay, ed. (Springer US), pp. 419–462.
- Hay, E.D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* 154, 8–20.
- He, B., and Guo, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 537–542.

- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 690–701.
- Hecht, A., Litterst, C.M., Huber, O., and Kemler, R. (1999). Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 18017–18025.
- Heimeier, R.A., Das, B., Buchholz, D.R., Fiorentino, M., and Shi, Y.-B. (2010). Studies on *Xenopus laevis* intestine reveal biological pathways underlying vertebrate gut adaptation from embryo to adult. *Genome Biol.* 11, R55.
- Helbing, C.C., Ji, L., Bailey, C.M., Veldhoen, N., Zhang, F., Holcombe, G.W., Kosian, P.A., Tietge, J., Korte, J.J., and Degitz, S.J. (2007a). Identification of gene expression indicators for thyroid axis disruption in a *Xenopus laevis* metamorphosis screening assay: Part 2. Effects on the tail and hindlimb. *Aquat. Toxicol.* 82, 215–226.
- Helbing, C.C., Bailey, C.M., Ji, L., Gunderson, M.P., Zhang, F., Veldhoen, N., Skirrow, R.C., Mu, R., Lesperance, M., Holcombe, G.W., et al. (2007b). Identification of gene expression indicators for thyroid axis disruption in a *Xenopus laevis* metamorphosis screening assay: Part 1. Effects on the brain. *Aquat. Toxicol.* 82, 227–241.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.
- Helwani, F.M., Kovacs, E.M., Paterson, A.D., Verma, S., Ali, R.G., Fanning, A.S., Weed, S.A., and Yap, A.S. (2004). Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J. Cell Biol.* 164, 899–910.
- Herrenknecht, K., Ozawa, M., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Lenter, M., and Kemler, R. (1991). The uvomorulin-anchorage protein alpha catenin is a vinculin homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9156–9160.
- Herzberg, F., Wildermuth, V., and Wedlich, D. (1991). Expression of XBCad, a novel cadherin, during oogenesis and early development of *Xenopus*. *Mech. Dev.* 35, 33–42.
- Higgs, D.M., and Burd, G.D. (2001). Neuronal turnover in the *Xenopus laevis* olfactory epithelium during metamorphosis. *J. Comp. Neurol.* 433, 124–130.
- Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* 125, 1327–1340.
- Hirabayashi, S., Tajima, M., Yao, I., Nishimura, W., Mori, H., and Hata, Y. (2003). JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4267–4282.
- Hiraguri, S., Godfrey, T., Nakamura, H., Graff, J., Collins, C., Shayesteh, L., Doggett, N., Johnson, K., Wheelock, M., Herman, J., et al. (1998). Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 58, 1972–1977.
- Hirokawa, N., and Heuser, J.E. (1981). Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 91, 399–409.
- Hirokawa, N., Keller, T.C., Chasan, R., and Mooseker, M.S. (1983). Mechanism of brush border contractility studied by the quick-freeze, deep-etch method. *J. Cell Biol.* 96, 1325–1336.
- Hoelzle, M.K., and Svitkina, T. (2012). The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 23, 310–323.

- Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M.M., Birchmeier, W., and Fujita, Y. (2004). Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6690–6700.
- Hollestelle, A., Elstrodt, F., Timmermans, M., Sieuwerts, A.M., Klijn, J.G.M., Foekens, J.A., den Bakker, M.A., and Schutte, M. (2010). Four human breast cancer cell lines with biallelic inactivating alpha-catenin gene mutations. *Breast Cancer Res. Treat.* 122, 125–133.
- Holtfreter, J. (1931). Über die Aufzucht isolierter Teile des Amphibienkeimes. *Wilhelm Roux Arch. Für Entwicklungsmechanik Org.* 124, 404–466.
- Honda, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Yasumi, M., Shingai, T., Fukuhara, A., Ozaki-Kuroda, K., Irie, K., Nakanishi, H., and Takai, Y. (2003). Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin-based cell-cell adhesion. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 8, 51–63.
- Hong, J.Y., Oh, I.-H., and McCrea, P.D. (2016). Phosphorylation and isoform use in p120-catenin during development and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1863, 102–114.
- Hong, S., Troyanovsky, R.B., and Troyanovsky, S.M. (2010). Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3528–3533.
- Hong, S., Troyanovsky, R.B., and Troyanovsky, S.M. (2011). Cadherin exits the junction by switching its adhesive bond. *J. Cell Biol.* 192, 1073–1083.
- Hoover, K.B., Liao, S.-Y., and Bryant, P.J. (1998). Loss of the Tight Junction MAGUK ZO-1 in Breast Cancer. *Am. J. Pathol.* 153, 1767–1773.
- Hordijk, P.L., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Michiels, F., Oomen, L.C., and Collard, J.G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* 278, 1464–1466.
- Horiuchi (1980). Some aspects of the shortening of the small intestine in rana catesbeiana larvae during metamorphosis. *Zool. Mag. Tokyo tokyo*, 176–182.
- Horrigan, S.K., Arbieva, Z.H., Xie, H.Y., Kravarusic, J., Fulton, N.C., Naik, H., Le, T.T., and Westbrook, C.A. (2000). Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. *Blood* 95, 2372–2377.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H., and Kemler, R. (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 127, 1375–1380.
- Hoshino, T., Sakisaka, T., Baba, T., Yamada, T., Kimura, T., and Takai, Y. (2005). Regulation of E-cadherin Endocytosis by Nectin through Afadin, Rap1, and p120ctn. *J. Biol. Chem.* 280, 24095–24103.
- Hoskins, S.G. (1986). Control of the development of the ipsilateral retinothalamic projection in *Xenopus laevis* by thyroxine: results and speculation. *J. Neurobiol.* 17, 203–229.
- Hosono, S., Gross, I., English, M.A., Hajra, K.M., Fearon, E.R., and Licht, J.D. (2000). E-cadherin Is a WT1 Target Gene. *J. Biol. Chem.* 275, 10943–10953.
- Houssay, B.A., Smyth, F.S., Foglia, V.G., and Houssay, A.B. (1942). COMPARATIVE DIABETOGENIC ACTION OF THE HYPOPHYSIS FROM VARIOUS ANIMALS. *J Exp Med* 75, 93–106.
- Hu, X., and Lazar, M.A. (1999). The CoNRN motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93–96.

- Hu, P., O'Keefe, E.J., and Rubenstein, D.S. (2001). Tyrosine phosphorylation of human keratinocyte beta-catenin and plakoglobin reversibly regulates their binding to E-cadherin and alpha-catenin. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1059–1067.
- Huang, H., Cai, L., Remo, B.F., and Brown, D.D. (2001). Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7348–7353.
- Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391–402.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90, 871–882.
- Huber, A.H., Stewart, D.B., Laurents, D.V., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J. Biol. Chem.* 276, 12301–12309.
- Huber, O., Kemler, R., and Langosch, D. (1999). Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 23), 4415–4423.
- Hugo, H.J., Kokkinos, M.I., Blick, T., Ackland, M.L., Thompson, E.W., and Newgreen, D.F. (2011). Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. *Cells Tissues Organs* 193, 23–40.
- Hulpiau, P., and van Roy, F. (2009). Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 349–369.
- Hülken, J., Birchmeier, W., and Behrens, J. (1994). E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 127, 2061–2069.
- Humphrey, R.R. (1967). Albino axolotls from an albino tiger salamander through hybridization. *J. Hered.* 58, 95–101.
- Ikeda, W., Nakanishi, H., Miyoshi, J., Mandai, K., Ishizaki, H., Tanaka, M., Togawa, A., Takahashi, K., Nishioka, H., Yoshida, H., et al. (1999). Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J. Cell Biol.* 146, 1117–1132.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 171, 939–945.
- Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J. Cell Biol.* 176, 779–786.
- Ikuzawa, M., Yasumasu, S., Inokuchi, T., Kobayashi, K., Nomura, K., and Iuchi, I. (2003). Differential Expression of Two Cathepsin Es during Metamorphosis-Associated Remodeling of the Larval to Adult Type Epithelium in *Xenopus* Stomach. *J. Biochem. (Tokyo)* 134, 385–394.
- Ikuzawa, M., Yasumasu, S., Kobayashi, K.-I., Inokuchi, T., and Iuchi, I. (2004). Stomach remodeling-associated changes of H⁺/K⁺-ATPase beta subunit expression in *Xenopus laevis* and H⁺/K⁺-ATPase-dependent acid secretion in tadpole stomach. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 301, 992–1002.
- Ikuzawa, M., Kobayashi, K., Yasumasu, S., and Iuchi, I. (2005). Expression of CCAAT/enhancer binding protein delta is closely associated with degeneration of surface mucous cells of larval stomach during the metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 140, 505–511.

- Ikezawa, M., Yasumasu, S., Kobayashi, K.-I., and Iuchi, I. (2007). Cloning and expression of xP1-L, a new marker gene for larval surface mucous cells of tadpole stomach in *Xenopus laevis*. *Gene Expr. Patterns* 8, 12–18.
- Insall, R.H., and Machesky, L.M. (2009). Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev. Cell* 17, 310–322.
- Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., Ikeda, W., and Takai, Y. (2004). Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 643–656.
- Ishiyama, N., and Ikura, M. (2012). The three-dimensional structure of the cadherin-catenin complex. *Subcell. Biochem.* 60, 39–62.
- Ishiyama, N., Lee, S.-H., Liu, S., Li, G.-Y., Smith, M.J., Reichardt, L.F., and Ikura, M. (2010). Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion. *Cell* 141, 117–128.
- Ishizuya-Oka, A., and Hasebe, T. (2008). Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein-4 signaling pathway involved in epithelial cell renewal along the radial axis of the intestine. *Digestion* 77 Suppl 1, 42–47.
- Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (2005). Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: A model for studying organ regeneration. *Dev. Growth Differ.* 47, 601–607.
- Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (2007). Regulation of adult intestinal epithelial stem cell development by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 236, 3358–3368.
- Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (2011). Evolutionary insights into postembryonic development of adult intestinal stem cells. *Cell Biosci.* 1, 37.
- Ishizuya-Oka, A., and Shimozawa, A. (1987). Development of the connective tissue in the digestive tract of the larval and metamorphosing *Xenopus laevis*. *Anat. Anz.* 164, 81–93.
- Ishizuya-Oka, A., and Shimozawa, A. (1989). Ultrastructural changes in the connective tissue of the gastric region during the metamorphosis of *Xenopus laevis*. *J. Morphol.* 199, 259–268.
- Ishizuya-Oka, A., and Shimozawa, A. (1990). Changes in lectin-binding pattern in the digestive tract of *Xenopus laevis* during metamorphosis. I. Gastric region. *J. Morphol.* 205, 1–8.
- Ishizuya-Oka, A., and Shimozawa, A. (1992). Connective tissue is involved in adult epithelial development of the small intestine during anuran metamorphosis in vitro. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 201, 322–329.
- Ishizuya-Oka, A., and Shimozawa, A. (1994). Inductive action of epithelium on differentiation of intestinal connective tissue of *Xenopus laevis* tadpoles during metamorphosis in vitro. *Cell Tissue Res.* 277, 427–436.
- Ishizuya-Oka, A., and Ueda, S. (1996). Apoptosis and cell proliferation in the *Xenopus* small intestine during metamorphosis. *Cell Tissue Res.* 286, 467–476.
- Ishizuya-Oka, A., Inokuchi, T., and Ueda, S. (1998). Thyroid hormone-induced apoptosis of larval cells and differentiation of pepsinogen-producing cells in the stomach of *Xenopus laevis* in vitro. *Differ. Res. Biol. Divers.* 63, 59–68.

- Ishizuya-Oka, A., Ueda, S., Amano, T., Shimizu, K., Suzuki, K., Ueno, N., and Yoshizato, K. (2001a). Thyroid-hormone-dependent and fibroblast-specific expression of BMP-4 correlates with adult epithelial development during amphibian intestinal remodeling. *Cell Tissue Res.* 303, 187–195.
- Ishizuya-Oka, A., Ueda, S., Inokuchi, T., Amano, T., Damjanovski, S., Stolow, M., and Shi, Y.-B. (2001b). Thyroid hormone-induced expression of Sonic hedgehog correlates with adult epithelial development during remodeling of the *Xenopus* stomach and intestine. *Differentiation* 69, 27–37.
- Ishizuya-Oka, A., Shimizu, K., Sakakibara, S., Okano, H., and Ueda, S. (2003). Thyroid hormone-upregulated expression of Musashi-1 is specific for progenitor cells of the adult epithelium during amphibian gastrointestinal remodeling. *J. Cell Sci.* 116, 3157–3164.
- Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T., Buchholz, D.R., Kajita, M., Fu, L., and Shi, Y.-B. (2009). Origin of the adult intestinal stem cells induced by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 2568–2575.
- Ito, M., and Roeder, R.G. (2001). The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 12, 127–134.
- Ivanov, A. (2008). Pharmacological Inhibition of Endocytic Pathways: Is It Specific Enough to Be Useful? In *Exocytosis and Endocytosis*, A. Ivanov, ed. (Humana Press), pp. 15–33.
- Ivanov, A.I., and Naydenov, N.G. (2013). Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 303, 27–99.
- Ivanov, A.I., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2004). Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol. Biol. Cell* 15, 176–188.
- Ivanov, A.I., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2005). Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers. *BioEssays* 27, 356–365.
- Izaguirre, M.F. (2003). Influencia de la expresión de las moléculas de adhesión celular en el desarrollo embrionario, larval y metamórfico de *Bufo arenarum*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Izaguirre, M., and Casco, V.H. (2011). Adhesión intercelular en el desarrollo de vertebrados, Su rol en el desarrollo embrionario y larval de anfibios. *Cell Commun Adhes* 1, 1–12.
- Izaguirre, M.F., and Casco, V.H. (2010). T3 regulates E-cadherin, and β - and α -catenin expression in the stomach during the metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum*. *Biotech Histochem* 85, 305–323.
- Izaguirre, M.F., Adur, J.F., Soler, A.P., and Casco, V.H. (2001). Alterations induced by E-cadherin and beta-catenin antibodies during the development of *Bufo arenarum* (Anura-Bufonidae). *Histol Histopathol* 16, 1097–1106.
- Izaguirre, M.F., García-Sancho, M.N., Miranda, L.A., Tomas, J., and Casco, V.H. (2008). Expression of cell adhesion molecules in the normal and T3 blocked development of the tadpole's kidney of *Bufo arenarum* (Amphibian, Anuran, Bufonidae). *Braz. J. Biol. Rev. Brasleira Biol.* 68, 561–569.
- Izaguirre, M.F., Larrea, D., Adur, J.F., Diaz-Zamboni, J.E., Vicente, N.B., Galetto, C.D., and Casco, V.H. (2010). Role of E-cadherin in epithelial architecture maintenance. *Cell Commun Adhes* 17, 1–12.
- Izumi, G., Sakisaka, T., Baba, T., Tanaka, S., Morimoto, K., and Takai, Y. (2004). Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J. Cell Biol.* 166, 237–248.

- Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247–269.
- Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631–643.
- Jamieson, C., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 847–850.
- Jamora, C., DasGupta, R., Kocieniewski, P., and Fuchs, E. (2003). Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature* 422, 317–322.
- Janda, E., Nevolo, M., Lehmann, K., Downward, J., Beug, H., and Grieco, M. (2006). Raf plus TGF β dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene* 25, 7117–7130.
- Janes, R.G. (1934). Studies on the amphibian digestive system. I. Histological changes in the alimentary tract of anuran larvae during involution. *J. Exp. Zool.* 67, 73–91.
- Jarrett, O., Stow, J.L., Yap, A.S., and Key, B. (2002). Dynamin-dependent endocytosis is necessary for convergent-extension movements in *Xenopus* animal cap explants. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 467–473.
- Jégou, A., Carlier, M.-F., and Romet-Lemonne, G. (2013). Formin mDia1 senses and generates mechanical forces on actin filaments. *Nat. Commun.* 4, 1883.
- Jones, P.L., and Shi, Y.B. (2003). N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 274, 237–268.
- Jovanovic, M., Rooney, M.S., Mertins, P., Przybylski, D., Chevrier, N., Satija, R., Rodriguez, E.H., Fields, A.P., Schwartz, S., Raychowdhury, R., et al. (2015). Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science* 347, 1259038.
- Jungblut, L.D., Pozzi, A.G., and Paz, D.A. (2012). A putative functional vomeronasal system in anuran tadpoles. *J. Anat.* 221, 364–372.
- Kam, Y., and Quaranta, V. (2009). Cadherin-Bound β -Catenin Feeds into the Wnt Pathway upon Adherens Junctions Dissociation: Evidence for an Intersection between β -Catenin Pools. *PLOS ONE* 4, e4580.
- Kamei, T., Matozaki, T., Sakisaka, T., Kodama, A., Yokoyama, S., Peng, Y.F., Nakano, K., Takaishi, K., and Takai, Y. (1999). Coendocytosis of cadherin and c-Met coupled to disruption of cell-cell adhesion in MDCK cells--regulation by Rho, Rac and Rab small G proteins. *Oncogene* 18, 6776–6784.
- Kametani, Y., and Takeichi, M. (2007). Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nat. Cell Biol.* 9, 92–98.
- Kanamori, A., and Brown, D.D. (1992). The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 267, 739–745.
- Kane, D.A., Hammerschmidt, M., Mullins, M.C., Maischein, H.M., Brand, M., Eeden, F.J. van, Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C.P., et al. (1996). The zebrafish epiboly mutants. *Development* 123, 47–55.
- Kang, Y., and Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277–279.

- Kawahara, A., Kohara, S., and Amano, M. (1989). Thyroid hormone directly induces hepatocyte competence for estrogen-dependent vitellogenin synthesis during the metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 132, 73–80.
- Kawakatsu, T., Shimizu, K., Honda, T., Fukuhara, T., Hoshino, T., and Takai, Y. (2002). Trans-interactions of nectins induce formation of filopodia and Lamellipodia through the respective activation of Cdc42 and Rac small G proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 50749–50755.
- Kawasaki, Y., Tsuji, S., Muroya, K., Furukawa, S., Shibata, Y., Okuno, M., Ohwada, S., and Akiyama, T. (2009). The adenomatous polyposis coli-associated exchange factors Asef and Asef2 are required for adenoma formation in *ApcMin/+* mice. *EMBO Rep.* 10, 1355–1362.
- Kawauchi, T. (2012). Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4564–4590.
- Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y.-I., and Hoshino, M. (2010). Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron* 67, 588–602.
- Kevil, C.G., Ohno, N., Gute, D.C., Okayama, N., Robinson, S.A., Chaney, E., and Alexander, J.S. (1998). Role of Cadherin Internalization in Hydrogen Peroxide-Mediated Endothelial Permeability. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1015–1022.
- Kikuyama, S., Kawamura, K., Tanaka, S., and Yamamoto, K. (1993). Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. *Int. Rev. Cytol.* 145, 105–148.
- Kim, S.K. (2000). Cell polarity: new PARTners for Cdc42 and Rac. *Nat. Cell Biol.* 2, E143–145.
- Kim, S.A., Tai, C.-Y., Mok, L.-P., Mosser, E.A., and Schuman, E.M. (2011). Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell–cell junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9857–9862.
- Kim, S.W., Park, J.-I., Spring, C.M., Sater, A.K., Ji, H., Otchere, A.A., Daniel, J.M., and McCrea, P.D. (2004). Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat. Cell Biol.* 6, 1212–1220.
- Kimura, K., Endo, Y., Yonemura, Y., Heizmann, C.W., Schafer, B.W., Watanabe, Y., and Sasaki, T. (2000). Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 16, 1125–1131.
- Kitt, K.N., and Nelson, W.J. (2011). Rapid Suppression of Activated Rac1 by Cadherins and Nectins during De Novo Cell-Cell Adhesion. *PLOS ONE* 6, e17841.
- Klingelhöfer, J., Laur, O.Y., Troyanovsky, R.B., and Troyanovsky, S.M. (2002). Dynamic interplay between adhesive and lateral E-cadherin dimers. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7449–7458.
- Knudsen, K.A., Soler, A.P., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (1995). Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J. Cell Biol.* 130, 67–77.
- Knust, E., and Bossinger, O. (2002). Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science* 298, 1955–1959.
- Kobiela, A., and Fuchs, E. (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 614–625.

- Kobiela, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.* 6, 21–30.
- Koch, A.W., Pokutta, S., Lustig, A., and Engel, J. (1997). Calcium binding and homoassociation of E-cadherin domains. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 7697–7705.
- Kodama, A., Takaishi, K., Nakano, K., Nishioka, H., and Takai, Y. (1999). Involvement of Cdc42 small G protein in cell-cell adhesion, migration and morphology of MDCK cells. *Oncogene* 18, 3996–4006.
- Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W., and Moore, D.D. (1989). Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337, 659–661.
- Kollros, J.J. (1981). Transitions in the nervous system during amphibian metamorphosis. In *Metamorphosis*. 2, (Plenum Press;)
- Kooistra, M.R.H., Dubé, N., and Bos, J.L. (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J. Cell Sci.* 120, 17–22.
- Korpala, M., Lee, E.S., Hu, G., and Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.* 283, 14910–14914.
- Korswagen, H.C., Herman, M.A., and Clevers, H.C. (2000). Distinct beta-catenins mediate adhesion and signalling functions in *C. elegans*. *Nature* 406, 527–532.
- Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Paterson, A.D., and Yap, A.S. (2002a). Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr. Biol.* CB 12, 379–382.
- Kovacs, E.M., Ali, R.G., McCormack, A.J., and Yap, A.S. (2002b). E-cadherin Homophilic Ligation Directly Signals through Rac and Phosphatidylinositol 3-Kinase to Regulate Adhesive Contacts. *J. Biol. Chem.* 277, 6708–6718.
- Kovacs, E.M., Verma, S., Ali, R.G., Ratheesh, A., Hamilton, N.A., Akhmanova, A., and Yap, A.S. (2011). N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway. *Nat. Cell Biol.* 13, 934–943.
- Kowalczyk, A.P., and Nanes, B.A. (2012). Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Subcell. Biochem.* 60, 197–222.
- Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., and Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1201–1211.
- Kraemer, A., Goodwin, M., Verma, S., Yap, A.S., and Ali, R.G. (2007). Rac is a dominant regulator of cadherin-directed actin assembly that is activated by adhesive ligation independently of Tiam1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C1061-1069.
- Kress, E., Samarut, J., and Plateroti, M. (2009). Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Mol. Cell. Endocrinol.* 313, 36–49.
- Kroll, K.L., and Amaya, E. (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* 122, 3173–3183.
- Kuntz, A. (1924). Anatomical and physiological changes in the digestive system during metamorphosis in *Rana pipiens* and *Amblystoma tigrinum*. *J. Morphol.* 38, 581–598.

- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., et al. (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* 281, 832–835.
- Kwiatkowski, A.V., Maiden, S.L., Pokutta, S., Choi, H.-J., Benjamin, J.M., Lynch, A.M., Nelson, W.J., Weis, W.I., and Hardin, J. (2010). In vitro and in vivo reconstitution of the cadherin-catenin-actin complex from *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14591–14596.
- Lambert, M., Choquet, D., and Mège, R.-M. (2002). Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 157, 469–479.
- Lambertini, G. (1929). Il manicotto glandulare di *Rana esculenta* nei suoi aspetti strutturali e nelle sue evoluzioni metamorfiche durante lo sviluppo. *Ric Morfol Roma.* 9, 71–88.
- Lametschwandtner, A., Höll, M., Bartel, H., Anupunpisit, V., and Minnich, B. (2012). Maturation of the gastric microvasculature in *Xenopus laevis* (Lissamphibia, Anura) occurs at the transition from the herbivorous to the carnivorous lifestyle, predominantly by intussusceptive microvascular growth (IMG): a scanning electron microscope study of microvascular corrosion casts and correlative light microscopy. *Anat. Sci. Int.* 87, 88–100.
- Lampugnani, M.G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., Spagnuolo, R., Betson, M., Braga, V., and Dejana, E. (2002). VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol. Biol. Cell* 13, 1175–1189.
- Larsson, F., Fagman, H., and Nilsson, M. (2004). TSH receptor signaling via cyclic AMP inhibits cell surface degradation and internalization of E-cadherin in pig thyroid epithelium. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 61, 1834–1842.
- Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., and Kemler, R. (1994). E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8263–8267.
- Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M., and Kemler, R. (1996). A role for cadherins in tissue formation. *Development* 122, 3185–3194.
- Laslett, A.L., Li, L.H., Jester, W.F., and Orth, J.M. (2000). Thyroid hormone down-regulates neural cell adhesion molecule expression and affects attachment of gonocytes in Sertoli cell-gonocyte cocultures. *Endocrinology* 141, 1633–1641.
- Laudet, V. (2011). The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr. Biol. CB* 21, R726-737.
- Lazar, M.A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* 14, 184–193.
- Le, T.L., Yap, A.S., and Stow, J.L. (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J. Cell Biol.* 146, 219–232.
- Lechler, T. (2012). Adherens junctions and stem cells. *Subcell. Biochem.* 60, 359–377.
- Leckband, D., and Prakasam, A. (2006). Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 259–287.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B., and Cossart, P. (1999). A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 18, 3956–3963.
- Lee, S.H. (2015). Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intest. Res.* 13, 11–18.

- Lee, J.-Y., and Harland, R.M. (2010). Endocytosis is Required for Efficient Apical Constriction During *Xenopus* Gastrulation. *Curr. Biol.* 20, 253–258.
- Leloup, J., and Buscaglia, M. (1977). La triiodothyronine, hormone de la métamorphose des amphibiens. *C R Acad Sci D* 2261–2269.
- Lerch, M.M., Lutz, M.P., Weidenbach, H., Müller-Pillasch, F., Gress, T.M., Leser, J., and Adler, G. (1997). Dissociation and reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis. *Gastroenterology* 113, 1355–1366.
- Levayer, R., Pelissier-Monier, A., and Lecuit, T. (2011). Spatial regulation of Dia and Myosin-II by RhoGEF2 controls initiation of E-cadherin endocytosis during epithelial morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 13, 529–540.
- Levi, G., Gumbiner, B., and Thiery, J.P. (1991). The distribution of E-cadherin during *Xenopus laevis* development. *Dev. Camb. Engl.* 111, 159–169.
- Leys, S.P., and Hill, A. (2012). The physiology and molecular biology of sponge tissues. *Adv. Mar. Biol.* 62, 1–56.
- Li, J.J., and Biggin, M.D. (2015). Gene expression. Statistics requantitates the central dogma. *Science* 347, 1066–1067.
- Li, G., Schaidler, H., Satyamoorthy, K., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., and Herlyn, M. (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20, 8125–8135.
- Li, J.J., Bickel, P.J., and Biggin, M.D. (2014). System wide analyses have underestimated protein abundances and the importance of transcription in mammals. *PeerJ* 2, e270.
- Li, Q., Dashwood, W.-M., Zhong, X., Al-Fageeh, M., and Dashwood, R.H. (2004). Cloning of the rat β -catenin gene (*Ctnnb1*) promoter and its functional analysis compared with the *Catnb* and *CTNNB1* promoters. *Genomics* 83, 231–242.
- Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B.I., Freund, J.N., and Kemler, R. (2000). Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Dev. Camb. Engl.* 127, 3805–3813.
- Lien, W.-H., Klezovitch, O., and Vasioukhin, V. (2006). Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 499–506.
- Lilien, J., Balsamo, J., Arregui, C., and Xu, G. (2002). Turn-off, drop-out: Functional state switching of cadherins. *Dev. Dyn.* 224, 18–29.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* 108, 837–847.
- Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Miao, Y., Zhao, Y., Zhang, P.-X., Jiang, G.-Y., Zhang, J.-Y., Han, Y., Lin, X.-Y., et al. (2009). Abnormal expression of p120-catenin, E-cadherin, and small GTPases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* 63, 375–382.
- Liu, Y., Dong, Q.-Z., Wang, S., Xu, H.-T., Miao, Y., Wang, L., and Wang, E.-H. (2014). Kaiso interacts with p120-catenin to regulate β -catenin expression at the transcriptional level. *PLoS One* 9, e87537.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.

- López-Barahona, M., Fialka, I., González-Sancho, J.M., Asunción, M., González, M., Iglesias, T., Bernal, J., Beug, H., and Muñoz, A. (1995). Thyroid hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal polarized mammary epithelial cells. *EMBO J.* 14, 1145–1155.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., and Hunter, T. (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4, 499–515.
- Madara, J.L. (1990). Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: physiological rearrangement of tight junctions. *J. Membr. Biol.* 116, 177–184.
- Maddugoda, M.P., Crampton, M.S., Shewan, A.M., and Yap, A.S. (2007). Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell–cell contacts in mammalian epithelial cells. *J. Cell Biol.* 178, 529–540.
- Maeda, O., Usami, N., Kondo, M., Takahashi, M., Goto, H., Shimokata, K., Kusugami, K., and Sekido, Y. (2004). Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene* 23, 964–972.
- Malliri, A., van Es, S., Huvneers, S., and Collard, J.G. (2004). The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions. *J. Biol. Chem.* 279, 30092–30098.
- Malsam, J., Kreye, S., and Söllner, T.H. (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 2814–2832.
- Mandicourt, G., Iden, S., Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., and Imhof, B.A. (2007). JAM-C regulates tight junctions and integrin-mediated cell adhesion and migration. *J. Biol. Chem.* 282, 1830–1837.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.
- Mangold, S., Wu, S.K., Norwood, S.J., Collins, B.M., Hamilton, N.A., Thorn, P., and Yap, A.S. (2011). Hepatocyte Growth Factor Acutely Perturbs Actin Filament Anchorage at the Epithelial Zonula Adherens. *Curr. Biol.* 21, 503–507.
- Mann, F., and Holt, C.E. (2001). Control of retinal growth and axon divergence at the chiasm: lessons from *Xenopus*. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 23, 319–326.
- Marchiando, A.M., Graham, W.V., and Turner, J.R. (2010). Epithelial Barriers in Homeostasis and Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 119–144.
- Marchiando, A.M., Shen, L., Graham, W.V., Edelblum, K.L., Duckworth, C.A., Guan, Y., Montrose, M.H., Turner, J.R., and Watson, A.J.M. (2011). The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* 140, 1208–1218-2.
- Mariner, D.J., Anastasiadis, P., Keilhack, H., Böhmer, F.D., Wang, J., and Reynolds, A.B. (2001). Identification of Src phosphorylation sites in the catenin p120ctn. *J. Biol. Chem.* 276, 28006–28013.
- Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 14, 455–463.
- Matsuda, H., Paul, B.D., Choi, C.Y., Hasebe, T., and Shi, Y.-B. (2009). Novel functions of protein arginine methyltransferase 1 in thyroid hormone receptor-mediated transcription and in the regulation of metamorphic rate in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 29, 745–757.

- Matsuda, M., Kobayashi, Y., Masuda, S., Adachi, M., Watanabe, T., Yamashita, J.K., Nishi, E., Tsukita, S., and Furuse, M. (2008). Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. *Exp. Cell Res.* 314, 939–949.
- Matsumura, T., Makino, R., and Mitamura, K. (2001). Frequent down-regulation of E-cadherin by genetic and epigenetic changes in the malignant progression of hepatocellular carcinomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 594–599.
- McAvoy, J.W., and Dixon, K.E. (1977). Cell proliferation and renewal in the small intestinal epithelium of metamorphosing and adult *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.* 202, 129–137.
- McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 534–540.
- McCrea, P.D., Turck, C.W., and Gumbiner, B. (1991). A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254, 1359–1361.
- McCrea, P.D., Briehner, W.M., and Gumbiner, B.M. (1993). Induction of a secondary body axis in *Xenopus* by antibodies to beta-catenin. *J. Cell Biol.* 123, 477–484.
- McCrea, P.D., Gu, D., and Balda, M.S. (2009). Junctional music that the nucleus hears: cell-cell contact signaling and the modulation of gene activity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002923.
- McGill, M.A., McKinley, R.F.A., and Harris, T.J.C. (2009). Independent cadherin-catenin and Bazooka clusters interact to assemble adherens junctions. *J. Cell Biol.* 185, 787–796.
- McGuire, J.K., Li, Q., and Parks, W.C. (2003). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am. J. Pathol.* 162, 1831–1843.
- McLachlan, R.W., and Yap, A.S. (2007). Not so simple: the complexity of phosphotyrosine signaling at cadherin adhesive contacts. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 85, 545–554.
- McNeil, E., Capaldo, C.T., and Macara, I.G. (2006). Zonula Occludens-1 Function in the Assembly of Tight Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 17, 1922–1932.
- McNutt, N.S., and Weinstein, R.S. (1973). Membrane ultrastructure at mammalian intercellular junctions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 26, 45–101.
- Melendez, J., Liu, M., Sampson, L., Akunuru, S., Han, X., Vallance, J., Witte, D., Shroyer, N., and Zheng, Y. (2013). Cdc42 Coordinates Proliferation, Polarity, Migration, and Differentiation of Small Intestinal Epithelial Cells in Mice. *Gastroenterology* 145.
- Meng, W., and Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002899.
- Meng, S., Badrinarain, J., Sibley, E., Fang, R., and Hodin, R. (2001). Thyroid hormone and the D-type cyclins interact in regulating enterocyte gene transcription. *J. Gastrointest. Surg.* 5, 49–55.
- Mertens, A.E.E., Rygiel, T.P., Olivo, C., van der Kammen, R., and Collard, J.G. (2005). The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J. Cell Biol.* 170, 1029–1037.
- Michiels, F., Stam, J.C., Hordijk, P.L., van der Kammen, R.A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C.A., and Collard, J.G. (1997). Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J. Cell Biol.* 137, 387–398.

- Miller, J.R., and McClay, D.R. (1997). Changes in the pattern of adherens junction-associated beta-catenin accompany morphogenesis in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 192, 310–322.
- Miranda, K.C., Joseph, S.R., Yap, A.S., Teasdale, R.D., and Stow, J.L. (2003). Contextual binding of p120^{ctn} to E-cadherin at the basolateral plasma membrane in polarized epithelia. *J. Biol. Chem.* 278, 43480–43488.
- Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. (2000). Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 275, 35170–35175.
- Miyaguchi, K. (2000). Ultrastructure of the Zonula Adherens Revealed by Rapid-Freeze Deep-Etching. *J. Struct. Biol.* 132, 169–178.
- Miyashita, Y., and Ozawa, M. (2007). A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs β -catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome. *J. Cell Sci.* 120, 4395–4406.
- Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., and Matsuda, M. (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411, 1065–1068.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 691–701.
- Müller, H.A., and Wieschaus, E. (1996). armadillo, bazooka, and stardust are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 134, 149–163.
- Muroya, K., Kawasaki, Y., Hayashi, T., Ohwada, S., and Akiyama, T. (2007). PH domain-mediated membrane targeting of Asef. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 85–88.
- Murray, P.S., and Zaidel-Bar, R. (2014). Pre-metazoan origins and evolution of the cadherin adhesome. *Biol. Open* 3, 1183–1195.
- Myant, K.B., Scopelliti, A., Haque, S., Vidal, M., Sansom, O.J., and Cordero, J.B. (2013a). Rac1 drives intestinal stem cell proliferation and regeneration. *Cell Cycle* 12, 2973–2977.
- Myant, K.B., Cammareri, P., McGhee, E.J., Ridgway, R.A., Huels, D.J., Cordero, J.B., Schwitalla, S., Kalna, G., Ogg, E.-L., Athineos, D., et al. (2013b). ROS Production and NF- κ B Activation Triggered by RAC1 Facilitate WNT-Driven Intestinal Stem Cell Proliferation and Colorectal Cancer Initiation. *Cell Stem Cell* 12, 761–773.
- Myster, S.H., Cavallo, R., Anderson, C.T., Fox, D.T., and Peifer, M. (2003). *Drosophila* p120catenin plays a supporting role in cell adhesion but is not an essential adherens junction component. *J. Cell Biol.* 160, 433–449.
- Nagafuchi, A., Shirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K., and Takeichi, M. (1987). Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329, 341–343.
- Nagafuchi, A., Takeichi, M., and Tsukita, S. (1991). The 102 kd cadherin-associated protein: similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65, 849–857.
- Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M., and Rini, J.M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380, 360–364.
- Najy, A.J., Day, K.C., and Day, M.L. (2008). The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J. Biol. Chem.* 283, 18393–18401.

- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., and Kaibuchi, K. (2001). Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J. Cell Sci.* 114, 1829–1838.
- Nass, S.J., Herman, J.G., Gabrielson, E., Iversen, P.W., Parl, F.F., Davidson, N.E., and Graff, J.R. (2000). Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 60, 4346–4348.
- Natarajan, L., Witwer, N.E., and Eisenmann, D.M. (2001). The divergent *Caenorhabditis elegans* beta-catenin proteins BAR-1, WRM-1 and HMP-2 make distinct protein interactions but retain functional redundancy in vivo. *Genetics* 159, 159–172.
- Nathke, I.S., Hinck, L., Swedlow, J.R., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 125, 1341–1352.
- Nejsum, L.N., and Nelson, W.J. (2007). A molecular mechanism directly linking E-cadherin adhesion to initiation of epithelial cell surface polarity. *J. Cell Biol.* 178, 323–335.
- Nelson, W.J. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 149–155.
- Nelson, K.K., and Nelson, R.W. (2004). Cdc42 Effector Protein 2 (XCEP2) is required for normal gastrulation and contributes to cellular adhesion in *Xenopus laevis*. *BMC Dev. Biol.* 4, 13.
- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science* 303, 1483–1487.
- Nelson, W.J., Dickinson, D.J., and Weis, W.I. (2013). Chapter One - Roles of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Adhesion and Epithelial Cell Polarity. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, F. van Roy, ed. (Academic Press), pp. 3–23.
- Niessen, C.M., and Gottardi, C.J. (2008). Molecular components of the adherens junction. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 562–571.
- Niessen, C.M., Leckband, D., and Yap, A.S. (2011). Tissue Organization by Cadherin Adhesion Molecules: Dynamic Molecular and Cellular Mechanisms of Morphogenetic Regulation. *Physiol. Rev.* 91, 691–731.
- Nieuwkoop, P., and Faber, J. (1967). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis / edited by P. D. Nieuwkoop and J. Faber. - Version details.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236–241.
- Nishita, M., Hashimoto, M.K., Ogata, S., Laurent, M.N., Ueno, N., Shibuya, H., and Cho, K.W. (2000). Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403, 781–785.
- Noda, K., Zhang, J., Fukuhara, S., Kunimoto, S., Yoshimura, M., and Mochizuki, N. (2010). Vascular Endothelial-Cadherin Stabilizes at Cell-Cell Junctions by Anchoring to Circumferential Actin Bundles through α - and β -Catenins in Cyclic AMP-Epac-Rap1 Signal-activated Endothelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 584–596.
- Nojima, D., Nakajima, K., Li, L.C., Franks, J., Ribeiro-Filho, L., Ishii, N., and Dahiya, R. (2001). CpG methylation of promoter region inactivates E-cadherin gene in renal cell carcinoma. *Mol. Carcinog.* 32, 19–27.

- Nollet, F., Berx, G., and van Roy, F. (1999). The Role of the E-Cadherin/Catenin Adhesion Complex in the Development and Progression of Cancer. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 2, 77–85.
- Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 299, 551–572.
- Noren, N.K., Liu, B.P., Burrridge, K., and Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J. Cell Biol.* 150, 567–580.
- Noren, N.K., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M., and Burrridge, K. (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.* 276, 33305–33308.
- Noren, N.K., Arthur, W.T., and Burrridge, K. (2003). Cadherin Engagement Inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* 278, 13615–13618.
- Nose, A., Nagafuchi, A., and Takeichi, M. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54, 993–1001.
- Nose, A., Tsuji, K., and Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61, 147–155.
- Oda (2012). Evolution of the Cadherin–Catenin Complex. In *Adherens Junctions: From Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease*, T. Harris, ed. (Springer Netherlands), pp. 9–35.
- Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1993). Identification of a *Drosophila* homologue of alpha-catenin and its association with the armadillo protein. *J. Cell Biol.* 121, 1133–1140.
- Oda, H., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1998). Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev. Biol.* 203, 435–450.
- Ogata, S., Morokuma, J., Hayata, T., Kolle, G., Niehrs, C., Ueno, N., and Cho, K.W.Y. (2007). TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes Dev.* 21, 1817–1831.
- Oinuma, T., Kawano, J.-I., and Sukanuma, T. (1991). Glycoconjugate histochemistry of *Xenopus laevis* fundic gland with special reference to mucous neck cells during development. *Anat. Rec.* 230, 502–512.
- Orlichenko, L., Weller, S.G., Cao, H., Krueger, E.W., Awoniyi, M., Beznoussenko, G., Buccione, R., and McNiven, M.A. (2009a). Caveolae mediate growth factor-induced disassembly of adherens junctions to support tumor cell dissociation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4140–4152.
- Orlichenko, L., Weller, S.G., Cao, H., Krueger, E.W., Awoniyi, M., Beznoussenko, G., Buccione, R., and McNiven, M.A. (2009b). Caveolae Mediate Growth Factor-induced Disassembly of Adherens Junctions to Support Tumor Cell Dissociation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4140–4152.
- Otani, T., Ichii, T., Aono, S., and Takeichi, M. (2006). Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *J. Cell Biol.* 175, 135–146.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* 433, 488–494.
- Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K.I., Yau, P., Takeichi, M., and Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267, 386–389.

- Ozawa, M., and Kemler, R. (1992). Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *J. Cell Biol.* 116, 989–996.
- Ozawa, M., Ringwald, M., and Kemler, R. (1990). Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4246–4250.
- Pacquelet, A., Lin, L., and Rorth, P. (2003). Binding site for p120/delta-catenin is not required for *Drosophila* E-cadherin function in vivo. *J. Cell Biol.* 160, 313–319.
- Padmanabhan, R., and Taneyhill, L.A. (2015). Cadherin-6B undergoes macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis during cranial neural crest cell EMT. *J. Cell Sci.* 128, 1773–1786.
- Pai, L.M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M., and Peifer, M. (1996). *Drosophila* alpha-catenin and E-cadherin bind to distinct regions of *Drosophila* Armadillo. *J. Biol. Chem.* 271, 32411–32420.
- Pain, B., Woods, C.M., Saez, J., Flickinger, T., Raines, M., Peyroll, S., Moscovici, C., Moscovici, M.G., Kung, H.-J., Jurdic, P., et al. (1991). EGF-R as a hemopoietic growth factor receptor: The c-erbB product is present in chicken erythrocytic progenitors and controls their self-renewal. *Cell* 65, 37–46.
- Pannekoek, W.-J., Kooistra, M.R.H., Zwartkruis, F.J.T., and Bos, J.L. (2009). Cell-cell junction formation: the role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 790–796.
- Paris, M., and Laudet, V. (2008). The history of a developmental stage: metamorphosis in chordates. *Genes. N. Y. N* 2000 46, 657–672.
- Park, J., Ji, H., Jun, S., Gu, D., Hikasa, H., Li, L., Sokol, S.Y., and McCrea, P.D. (2006). Frd1 links Dishevelled to the p120-catenin/Kaiso pathway: distinct catenin subfamilies promote Wnt signals. *Dev. Cell* 11, 683–695.
- Parra, R.G., Rohr, C.O., Koile, D., Perez-Castro, C., and Yankilevich, P. (2016). INSECT 2.0: a web-server for genome-wide cis-regulatory modules prediction. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 32, 1229–1231.
- Patel, I.S., Madan, P., Getsios, S., Bertrand, M.A., and MacCalman, C.D. (2003). Cadherin switching in ovarian cancer progression. *Int. J. Cancer* 106, 172–177.
- Paterson, A.D., Parton, R.G., Ferguson, C., Stow, J.L., and Yap, A.S. (2003). Characterization of E-cadherin Endocytosis in Isolated MCF-7 and Chinese Hamster Ovary Cells THE INITIAL FATE OF UNBOUND E-CADHERIN. *J. Biol. Chem.* 278, 21050–21057.
- Patterson, D., Hayes, W.P., and Shi, Y.B. (1995). Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase gene stromelysin-3 coincides with thyroid hormone-induced cell death during frog metamorphosis. *Dev. Biol.* 167, 252–262.
- Paul, B.D., Buchholz, D.R., Fu, L., and Shi, Y.-B. (2007). SRC-p300 coactivator complex is required for thyroid hormone-induced amphibian metamorphosis. *J. Biol. Chem.* 282, 7472–7481.
- Paul, R., Ewing, C.M., Jarrard, D.F., and Isaacs, W.B. (1997). The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression. *Br. J. Urol.* 79 Suppl 1, 37–43.
- Pece, S., Chiariello, M., Murga, C., and Gutkind, J.S. (1999). Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J. Biol. Chem.* 274, 19347–19351.
- Peifer, M., and Polakis, P. (2000). Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287, 1606–1609.

- Peifer, M., Berg, S., and Reynolds, A.B. (1994). A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76, 789–791.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–428.
- Perez, P., and Rincón, S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.* 426, 243–253.
- Perez-Moreno, M., and Fuchs, E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev. Cell* 11, 601–612.
- Perez-Moreno, M., Davis, M.A., Wong, E., Pasolli, H.A., Reynolds, A.B., and Fuchs, E. (2006). p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. *Cell* 124, 631–644.
- Perez-Moreno, M., Song, W., Pasolli, H.A., Williams, S.E., and Fuchs, E. (2008). Loss of p120 catenin and links to mitotic alterations, inflammation, and skin cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15399–15404.
- Phillips, B.T., and Kimble, J. (2009). A new look at TCF and beta-catenin through the lens of a divergent *C. elegans* Wnt pathway. *Dev Cell* 17, 27–34.
- Piedra, J., Martinez, D., Castano, J., Miravet, S., Dunach, M., and de Herreros, A.G. (2001). Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 20436–20443.
- Piedra, J., Miravet, S., Castaño, J., Pálmer, H.G., Heisterkamp, N., García de Herreros, A., and Duñach, M. (2003). p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2287–2297.
- Pilot, F., Philippe, J.-M., Lemmers, C., and Lecuit, T. (2006). Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein Btsz. *Nature* 442, 580–584.
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.-N., Samarut, J., and Chassande, O. (2001). Functional Interference between Thyroid Hormone Receptor α (TR α) and Natural Truncated TR $\Delta\alpha$ Isoforms in the Control of Intestine Development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4761–4772.
- Plateroti, M., Kress, E., Mori, J.I., and Samarut, J. (2006). Thyroid Hormone Receptor α 1 Directly Controls Transcription of the β -Catenin Gene in Intestinal Epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3204–3214.
- Pokutta, S., and Weis, W.I. (2000). Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol. Cell* 5, 533–543.
- Pokutta, S., Herrenknecht, K., Kemler, R., and Engel, J. (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur. J. Biochem. FEBS* 223, 1019–1026.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.
- Poluektov, A.I. (1964). Effect of thyroid hormone on regeneration of the adrenal cortex. *Bull. Exp. Biol. Med.* 57, 84–86.
- Posy, S., Shapiro, L., and Honig, B. (2008). Sequence and structural determinants of strand swapping in cadherin domains: do all cadherins bind through the same adhesive interface? *J. Mol. Biol.* 378, 954–968.

- Potempa, S., and Ridley, A.J. (1998). Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol. Biol. Cell* 9, 2185–2200.
- Prakasam, A.K., Maruthamuthu, V., and Leckband, D.E. (2006). Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15434–15439.
- Prasad, A., Zhao, H., Rutherford, J.M., Housley, N., Nichols, C., and Pedigo, S. (2006). Effect of linker segments on the stability of epithelial cadherin domain 2. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 62, 111–121.
- Price, L.S., Hajdo-Milasinovic, A., Zhao, J., Zwartkruis, F.J.T., Collard, J.G., and Bos, J.L. (2004). Rap1 regulates E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 279, 35127–35132.
- Prochnik, S.E., Umen, J., Nedelcu, A.M., Hallmann, A., Miller, S.M., Nishii, I., Ferris, P., Alan Kuo, Mitros, T., Fritz-Laylin, L.K., et al. (2010). Genomic analysis of organismal complexity in the multicellular green alga *Volvox carteri*. *Science* 329, 223–226.
- Puzianowska-Kuznicka, M., Damjanovski, S., and Shi, Y.B. (1997). Both thyroid hormone and 9-cis retinoic acid receptors are required to efficiently mediate the effects of thyroid hormone on embryonic development and specific gene regulation in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4738–4749.
- Rabelo, E.M., Baker, B.S., and Tata, J.R. (1994). Interplay between thyroid hormone and estrogen in modulating expression of their receptor and vitellogenin genes during *Xenopus* metamorphosis. *Mech. Dev.* 45, 49–57.
- Raftopoulos, I., Davaris, P., Karatzas, G., Karayannacos, P., and Kouraklis, G. (1998). Level of α -catenin expression in colorectal cancer correlates with invasiveness, metastatic potential, and survival. *J. Surg. Oncol.* 68, 92–99.
- Ranjan, M., Wong, J., and Shi, Y.B. (1994). Transcriptional repression of *Xenopus* TR beta gene is mediated by a thyroid hormone response element located near the start site. *J. Biol. Chem.* 269, 24699–24705.
- Raschperger, E., Engstrom, U., Pettersson, R.F., and Fuxe, J. (2004). CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J. Biol. Chem.* 279, 796–804.
- Ratheesh, A., Gomez, G.A., Priya, R., Verma, S., Kovacs, E.M., Jiang, K., Brown, N.H., Akhmanova, A., Stehbens, S.J., and Yap, A.S. (2012). Centralspindlin and α -catenin regulate Rho signalling at the epithelial zonula adherens. *Nat. Cell Biol.* 14, 818–828.
- Rayns, D.G., Simpson, F.O., and Ledingham, J.M. (1969). Ultrastructure of desmosomes in mammalian intercalated disc; appearances after lanthanum treatment. *J. Cell Biol.* 42, 322–326.
- Reed, R.A., Womble, M.A., Dush, M.K., Tull, R.R., Bloom, S.K., Morckel, A.R., Devlin, E.W., and Nascone-Yoder, N.M. (2009). Morphogenesis of the primitive gut tube is generated by Rho/ROCK/myosin II-mediated endoderm rearrangements. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 3111–3125.
- Reinhold, W.C., Reimers, M.A., Lorenzi, P., Ho, J., Shankavaram, U.T., Ziegler, M.S., Bussey, K.J., Nishizuka, S., Ikediobi, O., Pommier, Y.G., et al. (2010). Multifactorial regulation of E-cadherin expression: an integrative study. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1–16.
- Relyea, R.A. (2007). Getting out alive: how predators affect the decision to metamorphose. *Oecologia* 152, 389–400.

- Ren, R., Nagel, M., Tahinci, E., Winklbauer, R., and Symes, K. (2006). Migrating anterior mesoderm cells and intercalating trunk mesoderm cells have distinct responses to Rho and Rac during *Xenopus* gastrulation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 1090–1099.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., and Schwartz, M.A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18, 578–585.
- Rengel, D., Paz, D., Pisanó, A., and Pasina, L. (1988). Developmental capacity of *Bufo arenarum* aged oocytes. *Microsc Electron Biol Cel* 10, 101–113.
- Reuss, L. (1991). Tight junction permeability to ions and water. In *Tight Junctions*, (Boca Ratón), p. 49.
- Reynolds, A.B. (2007). p120-catenin: Past and present. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1773, 2–7.
- Reynolds, A.B., Roesel, D.J., Kanner, S.B., and Parsons, J.T. (1989). Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene. *Mol. Cell. Biol.* 9, 629–638.
- Reynolds, A.B., Herbert, L., Cleveland, J.L., Berg, S.T., and Gaut, J.R. (1992). p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* 7, 2439–2445.
- Reynolds, A.B., Daniel, J., McCrea, P.D., Wheelock, M.J., Wu, J., and Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8333–8342.
- Rhee, J., Mahfooz, N.S., Arregui, C., Lilien, J., Balsamo, J., and VanBerkum, M.F.A. (2002). Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nat. Cell Biol.* 4, 798–805.
- Richards, F.M., McKee, S.A., Rajpar, M.H., Cole, T.R., Evans, D.G., Jankowski, J.A., McKeown, C., Sanders, D.S., and Maher, E.R. (1999). Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* 8, 607–610.
- Ridley, A.J. (2001). Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713–2722.
- Ridley, A.J., Comoglio, P.M., and Hall, A. (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1110–1122.
- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D., and Morrow, J.S. (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8813–8817.
- Robertson, J.C., and Kelley, D.B. (1996). Thyroid hormone controls the onset of androgen sensitivity in the developing larynx of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 176, 108–123.
- Roberts, D.J., Johnson, R.L., Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., and Tabin, C. (1995). Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Dev. Camb. Engl.* 121, 3163–3174.
- Roberts, D.J., Smith, D.M., Goff, D.J., and Tabin, C.J. (1998). Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Dev. Camb. Engl.* 125, 2791–2801.
- Rodriguez-Boulán, E., and Macara, I.G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 225–242.

- Rohr, C.O., Parra, R.G., Yankilevich, P., and Perez-Castro, C. (2013). INSECT: IN-silico SEArch for Co-occurring Transcription factors. *Bioinformatics* 29, 2852–2858.
- Rojas, R., Ruiz, W.G., Leung, S.M., Jou, T.S., and Apodaca, G. (2001). Cdc42-dependent modulation of tight junctions and membrane protein traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 2257–2274.
- Rojas-Cartagena, C., Ortiz-Pineda, P., Ramirez-Gomez, F., Suarez-Castillo, E.C., Matos-Cruz, V., Rodriguez, C., Ortiz-Zuazaga, H., and Garcia-Arrarns, J.E. (2007). Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Physiol Genomics* 31, 203–215.
- Rollins-Smith, L.A. (1998). Metamorphosis and the amphibian immune system. *Immunol. Rev.* 166, 221–230.
- Rose, O., Grund, C., Reinhardt, S., Starzinski-Powitz, A., and Franke, W.W. (1995). Contactus adherens, a special type of plaque-bearing adhering junction containing M-cadherin, in the granule cell layer of the cerebellar glomerulus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6022–6026.
- Rosenbaum, E.A., Duboscq, L., Soleno, J., Montagna, C.M., Ferrari, A., and Venturino, A. (2012). Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. *Env. Toxicol Chem.*
- Rosenkilde, P., and Ussing, A.P. (1996). What mechanisms control neoteny and regulate induced metamorphosis in urodeles? *Int. J. Dev. Biol.* 40, 665–673.
- Rot-Nikcevic, I., and Wassersug, R.J. (2003). Tissue sensitivity to thyroid hormone in athyroid *Xenopus laevis* larvae. *Dev. Growth Differ.* 45, 321–325.
- Rottner, K., Hall, A., and Small, J.V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 9, 640–648.
- Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., García de Herreros, A., and Duñach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 36734–36740.
- Roy, F. van, and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3756–3788.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1995). The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J. Biol. Chem.* 270, 5549–5555.
- Ruffer, C., and Gerke, V. (2004). The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 135–144.
- Ryan, T.J., and Semlitsch, R.D. (2003). Growth and the expression of alternative life cycles in the salamander *Ambystoma talpoideum* (Caudata: Ambystomatidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 80, 639–646.
- Sachs, L.M., and Shi, Y.B. (2000). Targeted chromatin binding and histone acetylation in vivo by thyroid hormone receptor during amphibian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13138–13143.
- Sachs, L.M., Damjanovski, S., Jones, P.L., Li, Q., Amano, T., Ueda, S., Shi, Y.B., and Ishizuya-Oka, A. (2000). Dual functions of thyroid hormone receptors during *Xenopus* development. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126, 199–211.
- Sahai, E., and Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 133–142.

- Sakamori, R., Das, S., Yu, S., Feng, S., Stypulkowski, E., Guan, Y., Douard, V., Tang, W., Ferraris, R.P., Harada, A., et al. (2012). Cdc42 and Rab8a are critical for intestinal stem cell division, survival, and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1052–1065.
- Samarin, S., and Nusrat, A. (2009). Regulation of epithelial apical junctional complex by Rho family GTPases. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 1129–1142.
- Samarin, S.N., Ivanov, A.I., Flatau, G., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2007). Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Mol. Biol. Cell* 18, 3429–3439.
- Sander, E.E., van Delft, S., ten Klooster, J.P., Reid, T., van der Kammen, R.A., Michiels, F., and Collard, J.G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.* 143, 1385–1398.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A., and Collard, J.G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* 147, 1009–1022.
- Sap, J., Muñoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., and Vennström, B. (1986). The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324, 635–640.
- Sap, J., de Magistris, L., Stunnenberg, H., and Vennström, B. (1990). A major thyroid hormone response element in the third intron of the rat growth hormone gene. *EMBO J.* 9, 887–896.
- Sato, K., Watanabe, T., Wang, S., Kakeno, M., Matsuzawa, K., Matsui, T., Yokoi, K., Murase, K., Sugiyama, I., Ozawa, M., et al. (2011). Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Mol. Biol. Cell* 22, 3103–3119.
- Sato, T., Fujita, N., Yamada, A., Ooshio, T., Okamoto, R., Irie, K., and Takai, Y. (2006). Regulation of the Assembly and Adhesion Activity of E-cadherin by Nectin and Afadin for the Formation of Adherens Junctions in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Biol. Chem.* 281, 5288–5299.
- Satoh-Horikawa, K., Nakanishi, H., Takahashi, K., Miyahara, M., Nishimura, M., Tachibana, K., Mizoguchi, A., and Takai, Y. (2000). Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. *J. Biol. Chem.* 275, 10291–10299.
- Sayegh, T.Y.E., Arora, P.D., Laschinger, C.A., Lee, W., Morrison, C., Overall, C.M., Kapus, A., and McCulloch, C.A.G. (2004). Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 117, 5117–5131.
- Schierwater, B., Eitel, M., Jakob, W., Osigus, H.-J., Hadrys, H., Dellaporta, S.L., Kolokotronis, S.-O., and DeSalle, R. (2009). Concatenated Analysis Sheds Light on Early Metazoan Evolution and Fuels a Modern “Urmotazoan” Hypothesis. *PLOS Biol* 7, e1000020.
- Schlegel, N., Meir, M., Spindler, V., Germer, C.-T., and Waschke, J. (2011). Differential role of Rho GTPases in intestinal epithelial barrier regulation in vitro. *J. Cell. Physiol.* 226, 1196–1203.
- Schneider, M.R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trülzsch, K., Müller-Höcker, J., Vogelmann, R., Allgäuer, M., Gerhard, M., Steininger, S., et al. (2010). A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. *PLoS One* 5, e14325.
- Schneider, S.Q., Finnerty, J.R., and Martindale, M.Q. (2003). Protein evolution: structure-function relationships of the oncogene beta-catenin in the evolution of multicellular animals. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 295, 25–44.
- Schock, F., and Perrimon, N. (2002). Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 463–493.

- Schreiber, A.M., Das, B., Huang, H., Marsh-Armstrong, N., and Brown, D.D. (2001). Diverse developmental programs of *Xenopus laevis* metamorphosis are inhibited by a dominant negative thyroid hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10739–10744.
- Schreiber, A.M., Cai, L., and Brown, D.D. (2005). Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3720–3725.
- Scott, J.A., Shewan, A.M., den Elzen, N.R., Loureiro, J.J., Gertler, F.B., and Yap, A.S. (2006). Ena/VASP proteins can regulate distinct modes of actin organization at cadherin-adhesive contacts. *Mol. Biol. Cell* 17, 1085–1095.
- Severson, E.A., Lee, W.Y., Capaldo, C.T., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2009). Junctional Adhesion Molecule A Interacts with Afadin and PDZ-GEF2 to Activate Rap1A, Regulate β 1 Integrin Levels, and Enhance Cell Migration. *Mol. Biol. Cell* 20, 1916–1925.
- Shan, W., Yagita, Y., Wang, Z., Koch, A., Svenningsen, A.F., Gruzglin, E., Pedraza, L., and Colman, D.R. (2004). The Minimal Essential Unit for Cadherin-mediated Intercellular Adhesion Comprises Extracellular Domains 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 279, 55914–55923.
- Shan, W.S., Tanaka, H., Phillips, G.R., Arndt, K., Yoshida, M., Colman, D.R., and Shapiro, L. (2000). Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J. Cell Biol.* 148, 579–590.
- Shapiro, L., and Weis, W.I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003053.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grübel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., and Hendrickson, W.A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327–337.
- Sheikh, F., Ross, R.S., and Chen, J. (2009). Cell-Cell Connection to Cardiac Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 19, 182–190.
- Shen, L., Weber, C.R., and Turner, J.R. (2008). The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J. Cell Biol.* 181, 683–695.
- Shi (2000). *Amphibian metamorphosis. From morphology to molecular biology* (New York).
- Shi, Y.B., and Brown, D.D. (1993). The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 268, 20312–20317.
- Shi, Y.B., and Hayes, W.P. (1994). Thyroid hormone-dependent regulation of the intestinal fatty acid-binding protein gene during amphibian metamorphosis. *Dev. Biol.* 161, 48–58.
- Shi, Y.B., and Ishizuya-Oka, A. (1996). Biphasic intestinal development in amphibians: embryogenesis and remodeling during metamorphosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 32, 205–235.
- Shi, Y.-B., and Ishizuya-Oka, A. (1997). Autoactivation of *Xenopus* Thyroid Hormone Receptor beta Genes Correlates with Larval Epithelial Apoptosis and Adult Cell Proliferation. *J. Biomed. Sci.* 4, 9–18.
- Shi, Y.-B., Hasebe, T., Fu, L., Fujimoto, K., and Ishizuya-Oka, A. (2011). The development of the adult intestinal stem cells: Insights from studies on thyroid hormone-dependent amphibian metamorphosis. *Cell Biosci.* 1, 30.
- Shimizu, K., Ishizuya-Oka, A., Amano, T., Yoshizato, K., and Ueda, S. (2002). Isolation of connective-tissue-specific genes involved in *Xenopus* intestinal remodeling: thyroid hormone up-regulates Tollid/BMP-1 expression. *Dev. Genes Evol.* 212, 357–364.

- Shimoyama, Y., Nagafuchi, A., Fujita, S., Gotoh, M., Takeichi, M., Tsukita, S., and Hirohashi, S. (1992). Cadherin Dysfunction in a Human Cancer Cell Line: Possible Involvement of Loss of α -Catenin Expression in Reduced Cell-Cell Adhesiveness. *Cancer Res.* 52, 5770–5774.
- Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. (2006). Tight Junctions and Cell Polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207–235.
- Shiraishi, K., Tsuzaka, K., Yoshimoto, K., Kumazawa, C., Nozaki, K., Abe, T., Tsubota, K., and Takeuchi, T. (2005). Critical role of the fifth domain of E-cadherin for heterophilic adhesion with alpha E beta 7, but not for homophilic adhesion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 1014–1021.
- Shirayoshi, Y., Hatta, K., Hosoda, M., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., and Takeichi, M. (1986). Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. *EMBO J.* 5, 2485–2488.
- Siitonen, S.M., Kononen, J.T., Helin, H.J., Rantala, I.S., Holli, K.A., and Isola, J.J. (1996). Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 105, 394–402.
- Sirakov, M., and Plateroti, M. (2011). The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 938–946.
- Sivasankar, S., Gumbiner, B., and Leckband, D. (2001). Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys. J.* 80, 1758–1768.
- Smalley-Freed, W.G., Efimov, A., Burnett, P.E., Short, S.P., Davis, M.A., Gumucio, D.L., Washington, M.K., Coffey, R.J., and Reynolds, A.B. (2010). p120-catenin is essential for maintenance of barrier function and intestinal homeostasis in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 1824–1835.
- Smith, K.B., and Tata, J.R. (1976). Cell death. *Exp. Cell Res.* 100, 129–146.
- Smith, D.M., Grasty, R.C., Theodosiou, N.A., Tabin, C.J., and Nascone-Yoder, N.M. (2000). Evolutionary relationships between the amphibian, avian, and mammalian stomachs. *Evol. Dev.* 2, 348–359.
- Smutny, M., and Yap, A.S. (2010). Neighborly relations: cadherins and mechanotransduction. *J. Cell Biol.* 189, 1075–1077.
- Sotomayor, M., and Schulten, K. (2008). The Allosteric Role of the Ca²⁺ Switch in Adhesion and Elasticity of C-Cadherin. *Biophys. J.* 94, 4621–4633.
- Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R.R., Pestell, R., Matter, K., and Balda, M.S. (2006). Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2387–2398.
- Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L., et al. (2008). The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature* 454, 955–960.
- Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Steinberg, M.S., and Takeichi, M. (1994). Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 206–209.
- Steinhusen, U., Weiske, J., Badock, V., Tauber, R., Bommert, K., and Huber, O. (2001). Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 4972–4980.

- Stepniak, E., Radice, G.L., and Vasioukhin, V. (2009). Adhesive and Signaling Functions of Cadherins and Catenins in Vertebrate Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Stevenson, B.R., and Keon, B.H. (1998). The tight junction: morphology to molecules. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 89–109.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103, 755–766.
- Stolow, M.A., and Shi, Y.B. (1995). *Xenopus* sonic hedgehog as a potential morphogen during embryogenesis and thyroid hormone-dependent metamorphosis. *Nucleic Acids Res.* 23, 2555–2562.
- Stolow, M.A., Bauzon, D.D., Li, J., Sedgwick, T., Liang, V.C., Sang, Q.A., and Shi, Y.B. (1996). Identification and characterization of a novel collagenase in *Xenopus laevis*: possible roles during frog development. *Mol. Biol. Cell* 7, 1471–1483.
- Stormo, G.D., and Fields, D.S. (1998). Specificity, free energy and information content in protein–DNA interactions. *Trends Biochem. Sci.* 23, 109–113.
- Stormo, G.D., Schneider, T.D., Gold, L., and Ehrenfeucht, A. (1982). Use of the “Perceptron” algorithm to distinguish translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 10, 2997–3011.
- Strathdee, G. (2002). Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin. Cancer Biol.* 12, 373–379.
- Sukegawa, A., Narita, T., Kameda, T., Saitoh, K., Nohno, T., Iba, H., Yasugi, S., and Fukuda, K. (2000). The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Dev. Camb. Engl.* 127, 1971–1980.
- Sun, L., Chen, M., Yang, H., Wang, T., Liu, B., Shu, C., and Gardiner, D.M. (2011). Large scale gene expression profiling during intestine and body wall regeneration in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 6, 195–205.
- Sun, Y., Zhang, J., and Ma, L. (2014). α -catenin. *Cell Cycle* 13, 2334–2339.
- Swingle, W.W. (1918). The acceleration of metamorphosis in frog larvae by thyroid feeding, and the effects upon the alimentary tract and sex glands. *J. Exp. Zool.* 24, 521–543.
- Taguchi, K., Ishiuchi, T., and Takeichi, M. (2011). Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *J. Cell Biol.* 194, 643–656.
- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., et al. (1999). Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.* 145, 539–549.
- Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., and Ikeda, W. (2003). Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci.* 94, 655–667.
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., and Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 603–615.
- Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.* 75, 464–474.

- Takeichi, M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 102, 639–655.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 237–252.
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 619–627.
- Takeichi, M. (2014). Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 397–410.
- Takeichi, M., Uemura, T., Iwai, Y., Uchida, N., Inoue, T., Tanaka, T., and Suzuki, S.C. (1997). Cadherins in Brain Patterning and Neural Network Formation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62, 505–510.
- Takeichi, M., Nakagawa, S., Aono, S., Usui, T., and Uemura, T. (2000). Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 355, 885–890.
- Takemaru, K.I., and Moon, R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* 149, 249–254.
- Tamura, K., Shan, W.S., Hendrickson, W.A., Colman, D.R., and Shapiro, L. (1998). Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* 20, 1153–1163.
- Tanegashima, K., Zhao, H., and Dawid, I.B. (2008). WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in *Xenopus* gastrulation. *EMBO J.* 27, 606–617.
- Tanos, B., and Rodriguez-Boulan, E. (2008). The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* 27, 6939–6957.
- Tata, J.R. (1968). Early metamorphic competence of *Xenopus* larvae. *Dev. Biol.* 18, 415–440.
- Tata, J.R., Baker, B.S., Machuca, I., Rabelo, E.M., and Yamauchi, K. (1993). Autoinduction of nuclear receptor genes and its significance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 105–119.
- Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Charrasse, S., Bodin, S., and Gauthier-Rouvière, C. (2009). N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis. *J. Biol. Chem.* 284, 23137–23145.
- Taylor, A.C., and Kollros, J.J. (1946). Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* 94, 7–23.
- Tepass, U. (1999). Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 540–548.
- Tepass, U., and Hartenstein, V. (1994). The Development of Cellular Junctions in the *Drosophila* Embryo. *Dev. Biol.* 161, 563–596.
- Terry, S.J., Zihni, C., Elbediwy, A., Vitiello, E., Leefa Chong San, I.V., Balda, M.S., and Matter, K. (2011). Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 13, 159–166.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.

- Thoreson, M.A., Anastasiadis, P.Z., Daniel, J.M., Ireton, R.C., Wheelock, M.J., Johnson, K.R., Hummingbird, D.K., and Reynolds, A.B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol.* 148, 189–202.
- Tinkle, C.L., Lechler, T., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Conditional targeting of E-cadherin in skin: Insights into hyperproliferative and degenerative responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 552–557.
- Tobioka, H., Tokunaga, Y., Isomura, H., Kokai, Y., Yamaguchi, J., and Sawada, N. (2004). Expression of occludin, a tight-junction-associated protein, in human lung carcinomas. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 445, 472–476.
- Tolwinski, N.S., and Wieschaus, E. (2004). A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS Biol.* 2, E95.
- Tompkins, P.K. (1978). Organizational metamorphosis in space research and development. *Commun. Monogr.* 45, 110–118.
- Thompson, C.C., and Bottcher, M.C. (1997). The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8527–8532.
- Toranzo, G.S., Bühler, M.C.G., and Bühler, M. i. (2014). Participation of IP3R, RyR and L-type Ca²⁺ channel in the nuclear maturation of *Rhinella arenarum* oocytes. *Zygote* 22, 110–123.
- Torres, M., Stoykova, A., Huber, O., Chowdhury, K., Bonaldo, P., Mansouri, A., Butz, S., Kemler, R., and Gruss, P. (1997). An α -E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 901–906.
- Tortora, G.J., and Derrickson, B.H. (2014). *Introduction to the Human Body* (Place of publication not identified: Wiley).
- Troyanovsky, S. (2005). Cadherin dimers in cell-cell adhesion. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 225–233.
- Troyanovsky, R.B., Sokolov, E., and Troyanovsky, S.M. (2003). Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7965–7972.
- Troyanovsky, R.B., Sokolov, E.P., and Troyanovsky, S.M. (2006). Endocytosis of Cadherin from Intracellular Junctions Is the Driving Force for Cadherin Adhesive Dimer Disassembly. *Mol. Biol. Cell* 17, 3484–3493.
- Troyanovsky, R.B., Klingelhöfer, J., and Troyanovsky, S.M. (2011). α -Catenin contributes to the strength of E-cadherin-p120 interactions. *Mol. Biol. Cell* 22, 4247–4255.
- Troyanovsky, R.B., Indra, I., Chen, C.-S., Hong, S., and Troyanovsky, S.M. (2015). Cadherin controls nectin recruitment into adherens junctions by remodeling the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 128, 140–149.
- Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 451–486.
- Tsai, I.-C., Amack, J.D., Gao, Z.-H., Band, V., Yost, H.J., and Virshup, D.M. (2007). A Wnt-CKI ϵ -Rap1 Pathway Regulates Gastrulation by Modulating SIPA1L1, a Rap GTPase Activating Protein. *Dev. Cell* 12, 335–347.
- Tsukita, S., and Furuse, M. (2000). Pores in the Wall Claudins Constitute Tight Junction Strands Containing Aqueous Pores. *J. Cell Biol.* 149, 13–16.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285–293.

- Tsutsumida, A., Hamada, J., Tada, M., Aoyama, T., Furuuchi, K., Kawai, Y., Yamamoto, Y., Sugihara, T., and Moriuchi, T. (2004). Epigenetic silencing of E- and P-cadherin gene expression in human melanoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 25, 1415–1421.
- Tucker, R.P., and Adams, J.C. (2014). Adhesion networks of cnidarians: a postgenomic view. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 308, 323–377.
- Tunggal, J.A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Günzel, D., Fromm, M., Kemler, R., Krieg, T., and Niessen, C.M. (2005). E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J.* 24, 1146–1156.
- Turksen, K., and Troy, T.-C. (2004). Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117, 2435–2447.
- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., and Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* 135, 767–779.
- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* 279, 44785–44794.
- Utech, M., Ivanov, A.I., Samarin, S.N., Bruewer, M., Turner, J.R., Mrsny, R.J., Parkos, C.A., and Nusrat, A. (2005). Mechanism of IFN- γ -induced Endocytosis of Tight Junction Proteins: Myosin II-dependent Vacuolarization of the Apical Plasma Membrane. *Mol. Biol. Cell* 16, 5040–5052.
- Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V., and Fuchs, E. (2002). Actin Cable Dynamics and Rho/Rock Orchestrate a Polarized Cytoskeletal Architecture in the Early Steps of Assembling a Stratified Epithelium. *Dev. Cell* 3, 367–381.
- Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 403–429.
- Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F., and Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 33, 6566–6578.
- Varallo, V.M., Gan, B.S., Seney, S., Ross, D.C., Roth, J.H., Richards, R.S., McFarlane, R.M., Alman, B., and Howard, J.C. (2003). Beta-catenin expression in Dupuytren's disease: potential role for cell-matrix interactions in modulating beta-catenin levels in vivo and in vitro. *Oncogene* 22, 3680–3684.
- Vargiu, P., Morte, B., Manzano, J., Perez, J., de Abajo, R., Gregor Sutcliffe, J., and Bernal, J. (2001). Thyroid hormone regulation of rhes, a novel Ras homolog gene expressed in the striatum. *Mol. Brain Res.* 94, 1–8.
- Vasioukhin, V., and Fuchs, E. (2001). Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 76–84.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100, 209–219.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Degenstein, L., Wise, B., and Fuchs, E. (2001). Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin. *Cell* 104, 605–617.
- Verma, S., Shewan, A.M., Scott, J.A., Helwani, F.M., den Elzen, N.R., Miki, H., Takenawa, T., and Yap, A.S. (2004). Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J. Biol. Chem.* 279, 34062–34070.

- Vestweber, D., Gossler, A., Boller, K., and Kemler, R. (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev. Biol.* 124, 451–456.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299–1304.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 778–790.
- Voss, S.R., and Shaffer, H.B. (1996). What insights into the developmental traits of urodeles does the study of interspecific hybrids provide? *Int. J. Dev. Biol.* 40, 885–893.
- Voss, S.R., and Smith, J.J. (2005). Evolution of salamander life cycles: a major-effect quantitative trait locus contributes to discrete and continuous variation for metamorphic timing. *Genetics* 170, 275–281.
- Vukicevic, S., Kleinman, H.K., Luyten, F.P., Roberts, A.B., Roche, N.S., and Reddi, A.H. (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp. Cell Res.* 202, 1–8.
- Wahl, J.K., Kim, Y.J., Cullen, J.M., Johnson, K.R., and Wheelock, M.J. (2003). N-cadherin-catenin complexes form prior to cleavage of the proregion and transport to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 17269–17276.
- Wakahara, M. (1996). Heterochrony and neotenic salamanders: possible clues for understanding the animal development and evolution. *Zoolog. Sci.* 13, 765–776.
- Wang, Z., and Brown, D.D. (1991). A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11505–11509.
- Wang, Z., and Brown, D.D. (1993). Thyroid hormone-induced gene expression program for amphibian tail resorption. *J. Biol. Chem.* 268, 16270–16278.
- Wang, A.Z., Ojakian, G.K., and Nelson, W.J. (1990). Steps in the morphogenesis of a polarized epithelium. I. Uncoupling the roles of cell-cell and cell-substratum contact in establishing plasma membrane polarity in multicellular epithelial (MDCK) cysts. *J. Cell Sci.* 95 (Pt 1), 137–151.
- Wang, C.S., Lin, K.H., and Hsu, Y.C. (2002). Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett.* 175, 121–127.
- Wang, X., Matsuda, H., and Shi, Y.-B. (2008). Developmental regulation and function of thyroid hormone receptors and 9-cis retinoic acid receptors during *Xenopus tropicalis* metamorphosis. *Endocrinology* 149, 5610–5618.
- Wang, Y.X., Catlett, N.L., and Weisman, L.S. (1998). Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole. *J. Cell Biol.* 140, 1063–1074.
- Wang, Z., Wade, P., Mandell, K.J., Akyildiz, A., Parkos, C.A., Mrsny, R.J., and Nusrat, A. (2006). Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug. *Oncogene* 26, 1222–1230.
- Warner, S.J., and Longmore, G.D. (2009a). Distinct functions for Rho1 in maintaining adherens junctions and apical tension in remodeling epithelia. *J. Cell Biol.* 185, 1111–1125.
- Warner, S.J., and Longmore, G.D. (2009b). Cdc42 antagonizes Rho1 activity at adherens junctions to limit epithelial cell apical tension. *J. Cell Biol.* 187, 119–133.

- Watabe, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S., and Takeichi, M. (1994). Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J. Cell Biol.* 127, 247–256.
- Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., and Takeichi, M. (1998). α -Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142, 847–857.
- Watanabe, T., Sato, K., and Kaibuchi, K. (2009). Cadherin-mediated Intercellular Adhesion and Signaling Cascades Involving Small GTPases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1.
- Wehrendt, D.P., Carmona, F., Wusener, A.E.G., González, Á., Martínez, J.M.L., and Arregui, C.O. (2016). P120-Catenin Regulates Early Trafficking Stages of the N-Cadherin Precursor Complex. *PLOS ONE* 11, e0156758.
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., and Evans, R.M. (1986). The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324, 641–646.
- Weis, W.I., and Nelson, W.J. (2006). Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J. Biol. Chem.* 281, 35593–35597.
- Weiss, E.E., Kroemker, M., Rüdiger, A.-H., Jockusch, B.M., and Rüdiger, M. (1998). Vinculin Is Part of the Cadherin–Catenin Junctional Complex: Complex Formation between α -Catenin and Vinculin. *J. Cell Biol.* 141, 755–764.
- Wells, C.D., Fawcett, J.P., Traweger, A., Yamanaka, Y., Goudreault, M., Elder, K., Kulkarni, S., Gish, G., Virag, C., Lim, C., et al. (2006). A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 125, 535–548.
- Weber, R. (1962). Induced metamorphosis in isolated tails of *Xenopus* larvae. *Experientia* 18, 84–85.
- Werb, Z., Simpson, C.J., Alexander, C.M., Thomasset, N., Lund, L.R., MacAuley, A., Ashkenas, J., and Bissell, M.J. (1996). Extracellular matrix remodeling and the regulation of epithelial-stromal interactions during differentiation and involution. *Kidney Int. Suppl.* 54, S68-74.
- Werner, E.E. (1986). Amphibian Metamorphosis: Growth Rate, Predation Risk, and the Optimal Size at Transformation. *Am. Nat.* 128, 319–341.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., et al. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241–250.
- Whittard, J.D., Craig, S.E., Mould, A.P., Koch, A., Pertz, O., Engel, J., and Humphries, M.J. (2002). E-cadherin is a ligand for integrin $\alpha 2 \beta 1$. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 21, 525–532.
- Wiechmann, A.F., and Wirsig-Wiechmann, C.R. (2003). Gastrointestinal System. In *Color Atlas of Xenopus Laevis Histology*, (Springer US), pp. 31–46.
- Wilbur, H.M. (1980). Complex Life Cycles. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11, 67–93.
- Wilbur, H.M., and Collins, J.P. (1973). Ecological Aspects of Amphibian Metamorphosis: Nonnormal distributions of competitive ability reflect selection for facultative metamorphosis. *Science* 182, 1305–1314.
- Wildenberg, G.A., Dohn, M.R., Carnahan, R.H., Davis, M.A., Lobdell, N.A., Settleman, J., and Reynolds, A.B. (2006). p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* 127, 1027–1039.

- Wilder, I.W. (1925). The morphology of amphibian metamorphosis. (Northampton, Mass.: Smith College).
- Williams, B.O., Barish, G.D., Klymkowsky, M.W., and Varmus, H.E. (2000). A comparative evaluation of beta-catenin and plakoglobin signaling activity. *Oncogene* 19, 5720–5728.
- Winer, I.S., Bommer, G.T., Gonik, N., and Fearon, E.R. (2006). Lysine residues Lys-19 and Lys-49 of beta-catenin regulate its levels and function in T cell factor transcriptional activation and neoplastic transformation. *J. Biol. Chem.* 281, 26181–26187.
- Witcher, L.L., Collins, R., Puttagunta, S., Mechanic, S.E., Munson, M., Gumbiner, B., and Cowin, P. (1996). Desmosomal cadherin binding domains of plakoglobin. *J Biol Chem* 271, 10904–10909.
- Woessner, J.F. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 5, 2145–2154.
- Wolf, D., Rodova, M., Miska, E.A., Calvet, J.P., and Kouzarides, T. (2002). Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP). *J. Biol. Chem.* 277, 25562–25567.
- Wong, J., and Shi, Y.B. (1995). Coordinated regulation of and transcriptional activation by *Xenopus* thyroid hormone and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 18479–18483.
- Wu, C., Lai, C.F., and Mobley, W.C. (2001). Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 5406–5416.
- Wu, Y., Kanchanawong, P., and Zaidel-Bar, R. (2015). Actin-delimited adhesion-independent clustering of E-cadherin forms the nanoscale building blocks of adherens junctions. *Dev. Cell* 32, 139–154.
- Wuchter, P., Boda-Heggemann, J., Straub, B.K., Grund, C., Kuhn, C., Krause, U., Seckinger, A., Peitsch, W.K., Spring, H., Ho, A.D., et al. (2007). Processus and recessus adhaerentes: giant adherens cell junction systems connect and attract human mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 328, 499–514.
- Xavier-Neto, J., and Behringer, R.R. (2005). *Developmental Biology Takes on a Latin American Rhythm.* *Cell* 122, 327–332.
- Xia, W., Wong, E.W.P., Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2009). TGF-beta3 and TNFalpha perturb blood-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis. *Dev. Biol.* 327, 48–61.
- Xia, X., Mariner, D.J., and Reynolds, A.B. (2003). Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 9195–9204.
- Xiao, K., Garner, J., Buckley, K.M., Vincent, P.A., Chiasson, C.M., Dejana, E., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2005). p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol. Biol. Cell* 16, 5141–5151.
- Xie, L., Bian, L., Li, Z., Li, Y., Li, Z., and Li, B. (2010). Altered expression of E-cadherin by hepatocyte growth factor and effect on the prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 1927–1936.
- Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 478–487.
- Xiong, X., Xu, Q., Huang, Y., Singh, R.D., Anderson, R., Leof, E., Hu, J., and Ling, K. (2012). An association between type Iy PI4P 5-kinase and Exo70 directs E-cadherin clustering and epithelial polarization. *Mol. Biol. Cell* 23, 87–98.

- Yagi, T., and Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 14, 1169–1180.
- Yamada, S., and Nelson, W.J. (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell–cell adhesion. *J. Cell Biol.* 178, 517–527.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., and Nelson, W.J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123, 889–901.
- Yamamura, R., Nishimura, N., Nakatsuji, H., Arase, S., and Sasaki, T. (2008). The Interaction of JRAB/MICAL-L2 with Rab8 and Rab13 Coordinates the Assembly of Tight Junctions and Adherens Junctions. *Mol. Biol. Cell* 19, 971–983.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., et al. (2001). PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 6, 721–731.
- Yanagisawa, M., Kaverina, I.N., Wang, A., Fujita, Y., Reynolds, A.B., and Anastasiadis, P.Z. (2004). A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J. Biol. Chem.* 279, 9512–9521.
- Yanagisawa, M., Huvelde, D., Kreinest, P., Lohse, C.M., Cheville, J.C., Parker, A.S., Copland, J.A., and Anastasiadis, P.Z. (2008). A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease. *J. Biol. Chem.* 283, 18344–18354.
- Yang, D.-H., Cai, K.Q., Roland, I.H., Smith, E.R., and Xu, X.-X. (2007). Disabled-2 is an epithelial surface positioning gene. *J. Biol. Chem.* 282, 13114–13122.
- Yang, J., Dokurno, P., Tonks, N.K., and Barford, D. (2001). Crystal structure of the M-fragment of alpha-catenin: implications for modulation of cell adhesion. *EMBO J.* 20, 3645–3656.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.
- Yano, T., Yamazaki, Y., Adachi, M., Okawa, K., Fort, P., Uji, M., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2011). Tara up-regulates E-cadherin transcription by binding to the Trio RhoGEF and inhibiting Rac signaling. *J. Cell Biol.* 193, 319–332.
- Yaoita, Y., and Brown, D.D. (1990). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev.* 4, 1917–1924.
- Yaoita, Y., and Nakajima, K. (1997). Induction of apoptosis and CPP32 expression by thyroid hormone in a myoblastic cell line derived from tadpole tail. *J. Biol. Chem.* 272, 5122–5127.
- Yap, A.S., and Kovacs, E.M. (2003). Direct cadherin-activated cell signaling. *J. Cell Biol.* 160, 11–16.
- Yap, A.S., Brieher, W.M., and Gumbiner, B.M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 119–146.
- Ye, F., Chen, Y., Hoang, T., Montgomery, R.L., Zhao, X., Bu, H., Hu, T., Taketo, M.M., van Es, J.H., Clevers, H., et al. (2009). HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the β -catenin–TCF interaction. *Nat. Neurosci.* 12, 829–838.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K., and Nelson, W.J. (2004). Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 559–570.

- Yen, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81, 1097–1142.
- Yen, P.M., Feng, X., Flamant, F., Chen, Y., Walker, R.L., Weiss, R.E., Chassande, O., Samarut, J., Refetoff, S., and Meltzer, P.S. (2003). Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep.* 4, 581–587.
- Yokoyama, S., Tachibana, K., Nakanishi, H., Yamamoto, Y., Irie, K., Mandai, K., Nagafuchi, A., Monden, M., and Takai, Y. (2001). alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin. *Mol. Biol. Cell* 12, 1595–1609.
- Yonemura, S. (2011). A mechanism of mechanotransduction at the cell-cell interface. *BioEssays* 33, 732–736.
- Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A., and Tsukita, S. (1995). Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 1), 127–142.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat. Cell Biol.* 12, 533–542.
- Yoshida, C., and Takeichi, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 28, 217–224.
- Yoshida-Noro, C., Suzuki, N., and Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Dev. Biol.* 101, 19–27.
- Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T., and Hirohashi, S. (1995). Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7416–7419.
- Yoshizato, K. (1996). Cell death and histolysis in amphibian tail during metamorphosis. In *Metamorphosis*, (New York: Academic Press), p.
- Young, P., Boussadia, O., Halfter, H., Grose, R., Berger, P., Leone, D.P., Robenek, H., Charnay, P., Kemler, R., and Suter, U. (2003). E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. *EMBO J.* 22, 5723–5733.
- Zaidel-Bar, R. (2013). Cadherin adhesome at a glance. *J Cell Sci* 126, 373–378.
- Zamoner, A., Funchal, C., Jacques-Silva, M.C., Gottfried, C., Silva, F.R.M.B., and Pessoa-Pureur, R. (2007). Thyroid Hormones Reorganize the Cytoskeleton of Glial Cells Through Gfap Phosphorylation and Rho-Dependent Mechanisms. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 845–865.
- Zhadanov, A.B., Provance, D.W., Speer, C.A., Coffin, J.D., Goss, D., Blixt, J.A., Reichert, C.M., and Mercer, J.A. (1999). Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Curr. Biol. CB* 9, 880–888.
- Zhang, P., Chen, Y.-Q., Zhou, H., Liu, Y.-F., Wang, X.-L., Papenfuss, T.J., Wake, D.B., and Qu, L.-H. (2006). Phylogeny, evolution, and biogeography of Asiatic Salamanders (Hynobiidae). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 7360–7365.
- Zhang, J., Betson, M., Erasmus, J., Zeikos, K., Bailly, M., Cramer, L.P., and Braga, V.M.M. (2005). Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations. *J. Cell Sci.* 118, 5549–5562.

- Zhang, P.-X., Wang, Y., Liu, Y., Jiang, G.-Y., Li, Q.-C., and Wang, E.-H. (2011). p120-catenin isoform 3 regulates subcellular localization of Kaiso and promotes invasion in lung cancer cells via a phosphorylation-dependent mechanism. *Int. J. Oncol.* 38, 1625–1635.
- Zhang, Y., Sivasankar, S., Nelson, W.J., and Chu, S. (2009). Resolving cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 109–114.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.* 7, 203–214.
- Zhao, Z.-M., Reynolds, A.B., and Gaucher, E.A. (2011). The evolutionary history of the catenin gene family during metazoan evolution. *BMC Evol Biol* 11, 198.
- Zheng, G., Lyons, J.G., Tan, T.K., Wang, Y., Hsu, T.-T., Min, D., Succar, L., Rangan, G.K., Hu, M., Henderson, B.R., et al. (2009). Disruption of E-Cadherin by Matrix Metalloproteinase Directly Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition Downstream of Transforming Growth Factor- β 1 in Renal Tubular Epithelial Cells. *Am. J. Pathol.* 175, 580–591.
- Zhong, Y., Briehner, W.M., and Gumbiner, B.M. (1999). Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J. Cell Biol.* 144, 351–359.
- Zhu, B., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Jensen, I.E., Gumbiner, B.M., and Leckband, D. (2003). Functional analysis of the structural basis of homophilic cadherin adhesion. *Biophys. J.* 84, 4033–4042.
- Zorn, A.M., Barish, G.D., Williams, B.O., Lavender, P., Klymkowsky, M.W., and Varmus, H.E. (1999). Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol. Cell* 4, 487–498.