

PID 6088

## Estudio de la influencia de las hormonas tiroideas en el control de los sistemas de adhesión cadherinas-cateninas durante el desarrollo de vertebrados

C. D. Galetto, J. E. Diaz-Zamboni, J. F. Adur, N. B. Vicente, D. Larrea, M. V. Bessone, MA Hasenahuer, E.V. Paravani, M. Bianchi, V. H. Casco y M. F. Izaguirre

AUTOR: Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.

CONTACTO: [fizaguirre@bioingenieria.edu.ar](mailto:fizaguirre@bioingenieria.edu.ar)

### Resumen

El desarrollo de organismos pluricelulares depende en gran medida del establecimiento y mantenimiento de contactos adhesivos fuertes, pero a la vez dinámicos para posibilitar el remodelamiento tisular frente a señales específicas, tanto durante el desarrollo como en el estado adulto. Interesados en evaluar mecanismos de control hormonal de estos contactos, estudiamos si las hormonas tiroideas eran capaces de controlar el desarrollo animal a través de la regulación de la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs), las cuales influyen la adhesión celular y la morfología celular y tisular. Para ello, en una primera etapa, se implementaron bioensayos de bloqueo e inducción de la metamorfosis de *Rhinella arenarum* y se analizó por inmunohistoquímica cuantitativa el patrón de expresión de las CAMs cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina en el intestino anterior o estómago larval de esta especie. En una segunda etapa se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia y microscopia de desconvolución digital tridimensional cuantitativa para analizar la influencia de los niveles de fosforilación de las proteínas de los complejos de unión cadherina-catenina *in vivo*. En una tercera etapa, se analizaron los niveles de expresión de los ARNm de cadherina E y  $\beta$ -catenina y de sus proteínas para correlacionar los estudios morfométricos realizados con estudios moleculares, empleando retrotranscripción y amplificación de ADNcopia (ADNc) por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y *western blotting*, para, respectivamente. Para ello, se realizaron análisis bioinformáticos de las secuencias y estructuras de las moléculas bajo estudio. Los resultados obtenidos permiten postular por primera vez en forma cuantitativa, un control positivo espacial y temporal de cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina por la hormona T3 durante el desarrollo metamórfico del estómago larval de *Rhinella arenarum*. La alteración de los niveles de fosforilación de las proteínas de los complejos de unión cadherina E- $\beta$ -catenina, produce una drástica pérdida de estas moléculas en los contactos célula-célula y el incremento citoplasmático y nuclear de  $\beta$ -catenina en las células epidérmicas, sugiriendo la activación de la ruta de señalización nuclear mediada por  $\beta$ -catenina. Sorprendentemente, no se detectan cambios en la forma celular o en la arquitectura de la piel, sugiriendo que la cadherina E epidérmica estaría involucrada en la señalización celular más que en el mantenimiento de los contactos intercelulares durante el mantenimiento de la arquitectura epitelial *in vivo*. Finalmente, se aislaron, secuenciaron y caracterizaron filogenéticamente secuencias de nucleótidos de cadherina E y de  $\beta$ -catenina de *Rhinella arenarum*, que resultaron estar altamente conservadas entre 8 especies de vertebrados.

**Palabras clave:** Cadherinas, Cateninas, Hormonas tiroideas, Desarrollo

## Introducción

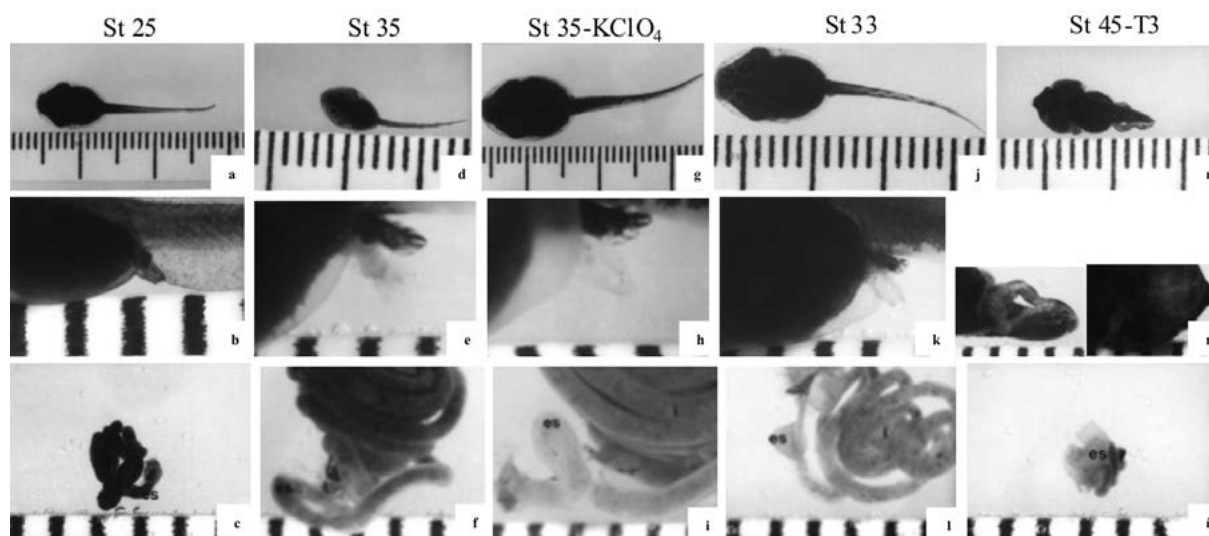
El desarrollo de organismos pluricelulares depende en gran medida del establecimiento y mantenimiento de contactos adhesivos fuertes, pero a la vez dinámicos para posibilitar el remodelamiento tisular frente a señales específicas, tanto durante el desarrollo como en el estado adulto. Interesados en evaluar mecanismos de control hormonal de estos contactos, el presente estudio se centró en analizar si las hormonas tiroideas son capaces de controlar el desarrollo animal a través de la regulación de la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs), las cuales influyen la adhesión celular y la morfología celular y tisular. Para ello, fue seleccionado como modelo de experimentación el sapo sudamericano *Rhinella* (= *Bufo*) *arenarum* Hensel (Anura, Bufonidae) — *Bufo arenarum* Hensel, 1867, Arch. Naturgesch., 33: 143 es *Rhinella arenarum* Chaparro, Pramuk, and Gluesenkamp, 2007, Herpetologica, 63: 211, by implication; Pramuk, Robertson, Sites, and Noonan, 2008, Global Ecol. Biogeograph., 17: 76—, ya que es un anuro de importancia ecológica para la región, que exhibe una gran plasticidad a las diferentes manipulaciones a las que debió ser sometido y principalmente, porque como todo anfibio, las transformaciones metamórficas de sus diferentes tejidos y órganos son reguladas por las hormonas tiroideas (HT) (White y Nicoll, 1981).

Se sabe adicionalmente que los niveles de tiroxina (T4) y triiodotironina (T3) permanecen bajos durante la pre- y prometamorfosis y se incrementan alrededor del disparo del clímax larval (White y Nicoll, 1981). A su vez, las larvas de los anfibios son capaces de responder a la alteración de los niveles de HT con gran plasticidad en los fenotipos durante el desarrollo (Stearns, 1989). La tiroidectomía y los inhibidores químicos como el perclorato de potasio (goitrogénos) pueden inhibir la síntesis de HT endógenas y bloquear la metamorfosis (Dodd y Dodd, 1976), a la vez que inducen la formación de un bocio en respuesta al incremento en la secreción de la hormona estimulante de la tiroides o tirotrófina (TSH). A su vez, la metamorfosis puede ser inducida en cualquier nivel del eje y producirse de la misma manera que la espontánea, aunque la tasa puede variar según el método (Rosenkilde y Ussing, 1996; Shi, 2000; Izaguirre y Casco, 2010). La HT puede suministrarse por inyección, alimentación o inmersión. En general se prefiere la inmersión porque la acción es más uniforme y reproducible (Rosenkilde y Ussing, 1996).

La respuesta de las células sensibles a HT depende de la presencia y número de receptores. El aumento de HTs circulantes aumenta el número de receptores (Galton, 1984, 1989; Galton y St Germain, 1985) y con ello genera mayor sensibilidad de las células y por lo tanto, aumento de actividad de la hormona (Rosenkilde y Ussing, 1996; Shi, 2000). Se sabe que en *Xenopus laevis*, los genes de los receptores de HT (RT) son positivamente regulados por el tratamiento con T3 de larvas premetamórficas (Yaoita y Brown, 1990; Kawahara y col., 1991; Tata, 1996; Shi y col., 1996a). Concentraciones de T3 y T4 comparables con los niveles plasmáticos de HT inducen metamorfosis precoz en diferentes especies de anuros (Tata, 1968; Dodd y Dodd, 1976; White y Nicoll, 1981). En el clímax metamórfico de *Xenopus laevis* las concentraciones plasmáticas de 3,3',5'-triiodotironina (T3) y 3,5,3',5'-tetraiodotironina o tiroxina (T4) son de 8 y 10 nM respectivamente (Leloup y Buscaglia, 1977).

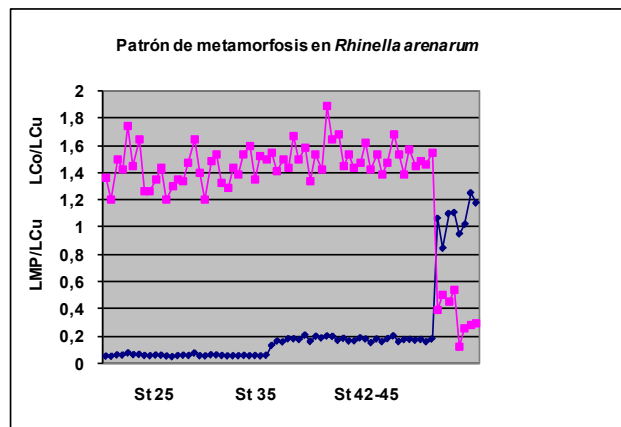
Para evaluar si las hormonas tiroideas son capaces de controlar la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs), las cuales influyen la adhesión celular y la morfología celular y tisular, en una primera etapa se implementaron bioensayos de bloqueo e inducción de la metamorfosis de *Rhinella arenarum*. En estos modelos se analizó por inmunohistoquímica cuantitativa el patrón de expresión de las CAMs cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina en el intestino anterior o estómago larval de esta especie, debido a que este órgano sufre profundas modificaciones en tamaño, ubicación y organización durante la metamorfosis.

Tanto el bloqueo como la inducción precoz de la metamorfosis de *R. arenarum* resultaron exitosas, empleando soluciones de 0,034%  $KClO_4$  durante 3 meses y de 1,25 nM, T3 (Izaguirre y colaboradores, 2008; Izaguirre y Casco, 2010) (Figura 1).



**FIGURA 1:** Vista dorsal del cuerpo, de los miembros posteriores y anteriores y de tracto digestivo de larvas de *Rhinella arenarum* control y tratadas con  $KClO_4$  y con T3. Estadios control 25 (a-c), 33 (j-l) y 35 (d-f), estadio 35 tratado con  $KClO_4$  (g-i) y estadio 45 tratado con T3 (m-ñ). Si bien la larva de estadio 35 tratada con  $KClO_4$  ha incrementado significativamente su tamaño respecto al control de estadio 35, claramente se observa que el desarrollo del miembro posterior corresponde al de una larva de estadio 35, con sus cuatro dígitos formados (h). En el caso de su tubo digestivo, muestra mayores dimensiones respecto al control del estadio 35, aunque con las mismas características morfológicas. La inducción precoz de la metamorfosis muestra una profunda remodelación de la larva y del tubo digestivo. Solo la reabsorción de la cola es menor que en la metamorfosis espontánea, tal como ha sido reportado en otros estudios (Shi, 2000). **es:** estómago larval; **im:** intestino medio; **ip:** intestino posterior; **pa:** páncreas. La escala expresa milímetros.

El éxito de ambos bioensayos quedó demostrado por el análisis de diversos parámetros de crecimiento larval y desarrollo metamórfico (Izaguirre y Casco, 2010), los cuales deben evaluarse ya que larvas con el mismo nivel de desarrollo morfológico pueden variar en tamaño debido a diferentes factores ambientales (Etkin, 1968; Derby, 1970; Dodd y Dodd, 1976). Inversamente, a veces ocurren cambios morfológicos significativos con insignificantes cambios en el tamaño (Etkin, 1968; Derby, 1970). Así, se evaluaron el estadio (st) (Gosner, 1960); longitud total (LT): desde la boca al extremo de la cola; longitud del cuerpo (LCu): desde la boca al borde posterior del ano; longitud de la cola (LCo): desde el borde posterior del ano al extremo de la cola; longitud del miembro posterior (LMP), longitud del miembro anterior (LMA), longitud transversal, medida en la región cefálica a la altura del borde posterior de los ojos (LTr); longitud del tubo digestivo (LTD), desde cavidad bucal a la cloaca; longitud y diámetro del estómago y del páncreas; peso total (PT), peso del tubo digestivo (Ptd): peso de la cavidad bucal a la cloaca, peso del páncreas (Pp). Con los valores absolutos se calcularon los valores relativos: LMP/LCu, LCo/LCu. Según Etkin (1968), si bien los valores absolutos de tamaño varían de cohorte en cohorte, los valores relativos de LMP/LCu y LCo/LCu, correspondientes a los distintos estadios, exhiben un alto grado de uniformidad entre cohortes (Figura 2, Tablas 1-3).



**FIGURA 2:** Patrón de metamorfosis en *R. arenarum*, basado en las relaciones LMP/LCu y LCo/LCu.

**TABLA 1.** Longitud en milímetros (media y desviación estándar) total, del miembro posterior, del miembro anterior, del tubo digestivo y relaciones LMP / LCu y LCo / LCu.

Modelo	Estadio	LT (mm)	LMP (mm)	LMA (mm)	LMP / LCu	LCo / LCu	LTD (mm)	
AAL (n=30)	25	9,16 ± 0,68	< 0,2	Ausente	0,053 ± 0,006	1,42 ± 0,14	16,29 3,60	±
AAL (n=30)	35	22,58 ± 0,82	1,53 ± 0,14	Ausente	0,17 ± 0,02	1,52 ± 0,11	99,49 14,22	±
AAL (3 m) (n=8)	45	13,08 ± 2,73	10,15 ± 1,19	6,2 ± 0,62	1,07 ± 0,13	0,36 ± 0,14	14,54 2,65	±
KClO <sub>4</sub> (n=15)	35	28,39 ± 3,31	1,64 ± 0,33	Ausente	0,16 ± 0,02	1,74 ± 0,12	111,71 23,57	±

Nota: los valores relativos de LMP/LCu de las larvas de estadio 25 se calcularon tomando siempre como dato la LMP de 0,2 mm, a los fines de la graficación.

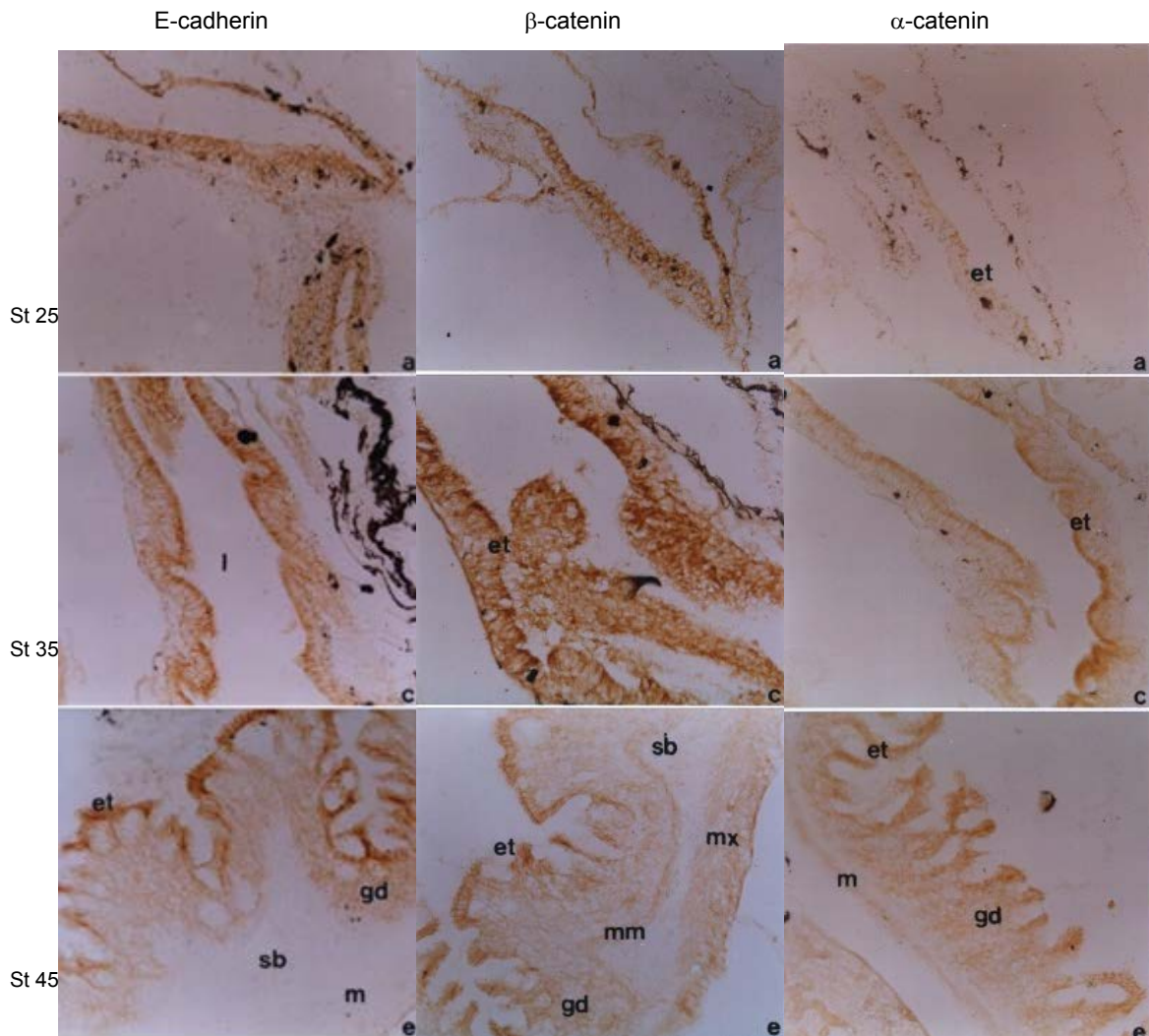
**TABLA 2.** Longitud y diámetro en milímetros (media y desviación estándar) del estómago

Modelo	Estadio	Longitud (mm)	Diámetro (mm)
AAL (n=30)	25	0,72 ± 0,11	0,25 ± 0,05
AAL (n=30)	35	1,76 ± 0,20	0,76 ± 0,08
AAL (3 m) (n=8)	45	2,92 ± 0,53	1,51 ± 0,29
KClO <sub>4</sub> (n=15)	35	1,94 ± 0,28	0,81 ± 0,22

**TABLA 3.** Longitud en milímetros (media y desviación estándar) total, miembro posterior, miembro anterior, tubo digestivo y relaciones LMP / LCu y LCo / LCu.

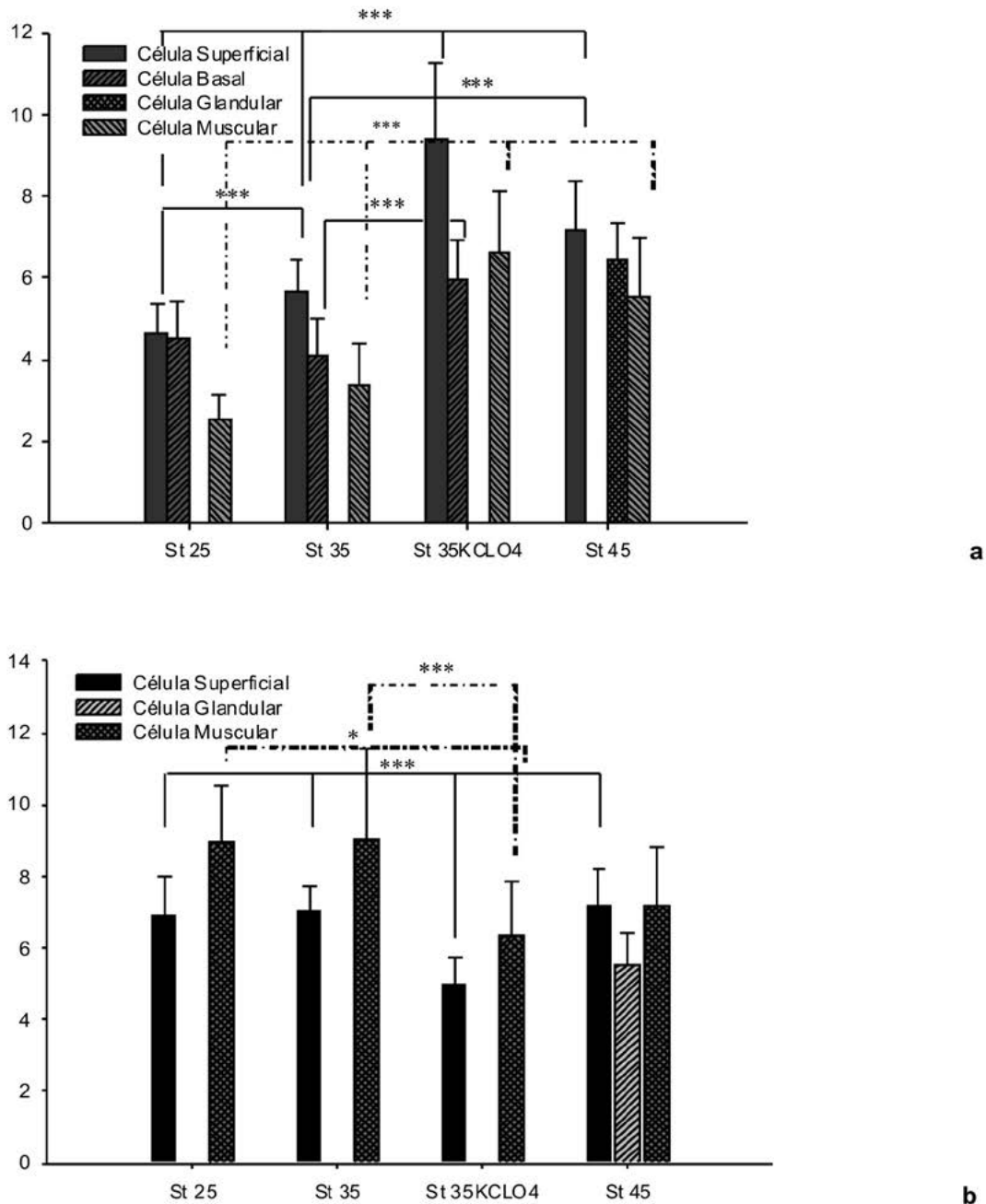
Modelo	Estadio	LT (mm)	LMP (mm)	LMA (mm)	LMP/LCu	LCo/Lcu	LTD (mm)
<b>AAL</b> <b>5 días</b> <b>(n = 30)</b>	33	18,16 ± 1,06	0,80 ± 0,19	Ausente	0,11 0,02	1,49 ± 0,12	65,72 ± 17,25
<b>T3</b> <b>(n = 30)</b>	42-45	10,16 ± 2,40	2,17 ± 0,43	1,02 ± 0,17	0,39 ± 0,07	0,82 ± 0,33	9,81 ± 1,63
<b>AAL</b> <b>(3 m)</b> <b>(n=8)</b>	45	13,08 ± 2,73	10,15 ± 1,19	6,2 ± 0,62	1,07 ± 0,13	0,36 ± 0,14	14,54 ± 2,65

Establecido el patrón de expresión de cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina durante la metamorfosis espontánea (Figura 3), para cuantificar el nivel de expresión se realizó un análisis morfométrico de la inmunomarcación del intestino anterior o estómago larval de 5 animales por cada modelo experimental (Figuras 4&5) (Izaguirre y Casco, 2010).

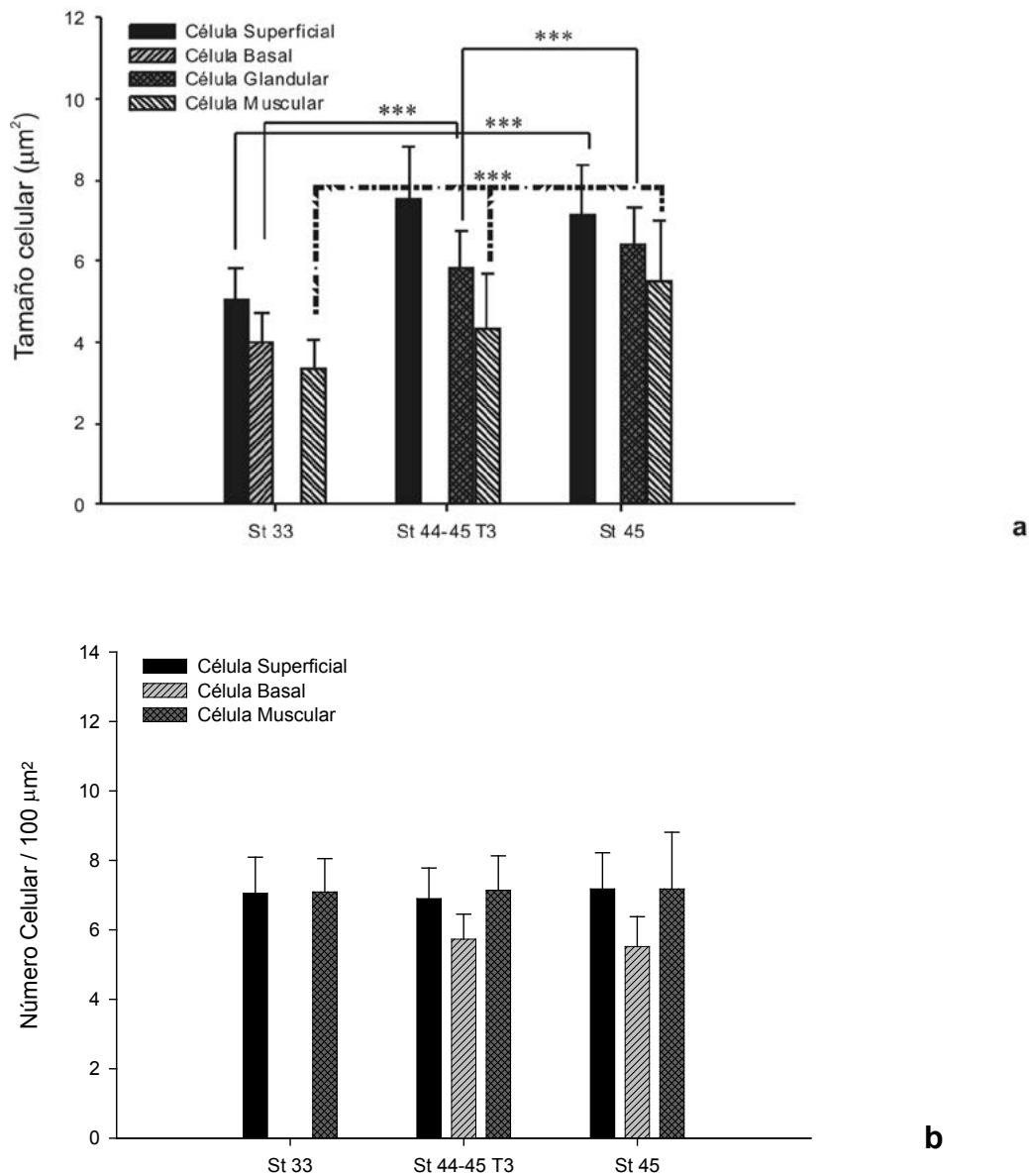


**FIGURA 3.** Expresión de cadherina E (izquierda),  $\beta$ -catenina (medio) y  $\alpha$ -catenina (derecha) durante el desarrollo espontáneo del intestino anterior de *Rhinella arenarum*. Observe el incremento de su expresión desde el estadio 25 al 45. et: epitelio superficial, l: lumen; gd: glándulas; mm: muscular de la mucosa; sb: submucosa; m: capas musculares; mx: capa muscular externa.

Las larvas metamorfoseadas por administración exógena de T3, siguieron básicamente el mismo patrón de distribución celular y tisular de cadherina E,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina que el de las larvas que metamorfosean espontáneamente, aumentando sus niveles a lo largo del desarrollo del intestino anterior (Figura 6). En el caso de las larvas de estadio 35 tratadas con  $KClO_4$  presentan prácticamente la misma localización celular y tisular de cadherina E,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina que las larvas control de estadio 35, evidenciando el bloqueo de la función tiroidea (Figura 6).

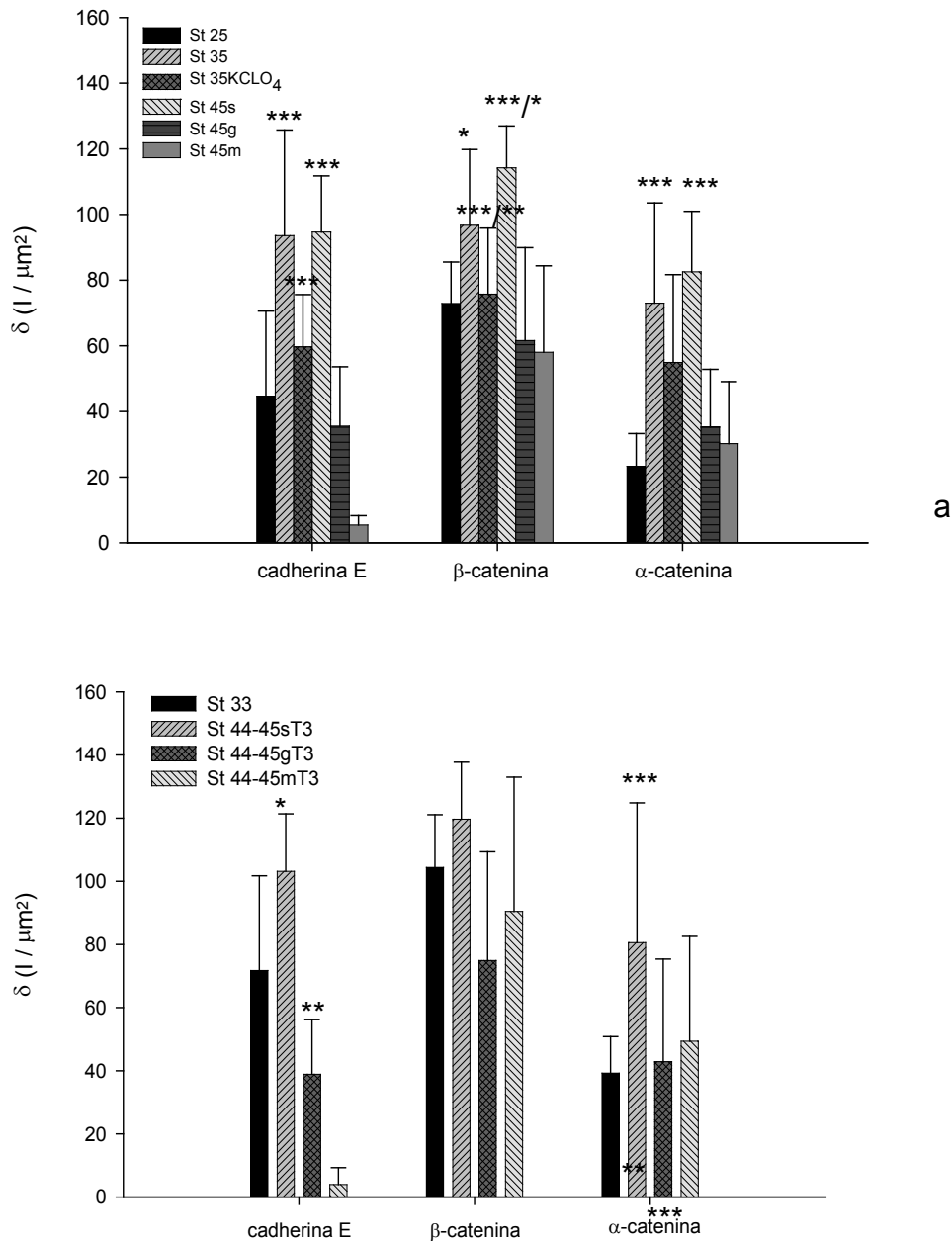


**FIGURA 4.** Análisis del tamaño (a) y el número celular (b) del estómago larval de *Rhinella arenarum* durante la inhibición de la metamorfosis por la administración exógena de  $KClO_4$ . Los histogramas representan medias  $\pm$  desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó con el test ANOVA no paramétrico de Kruskal–Wallis con test de Dunn. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Sólo se han representado las significatividades relevantes.



**Figura 5.** Análisis del tamaño (a) y el número celular (b) del estómago larval de *Rhinella arenarum* durante la inducción de la metamorfosis por la administración exógena de la hormona T3. Los histogramas representan medias  $\pm$  desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó con el test ANOVA no paramétrico de Kruskal–Wallis con test de Dunn. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Sólo se han representado las significatividades relevantes.

Estos resultados sugieren que T3 ejerce un efecto regulatorio positivo sobre la expresión de cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina durante su desarrollo metamórfico. Adicionalmente, estos resultados muestran la actividad coordinada de T3 sobre los genes responsables de la expresión de cadherina E y sus moléculas de conexión al citoesqueleto,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina en el intestino anterior (Figuras 3-6).



**FIGURA 6.** Cuantificación de la expresión de cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina en el estómago larval de *Rhinella arenarum* control y bloqueado con perclorato de potasio (a) y control e inducido con hormona tiroidea T3 (b). Los histogramas representan medias  $\pm$  desviaciones estándar. El análisis estadístico se realizó con el test ANOVA no paramétrico de Kruskal–Wallis con test de Dunn. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Sólo se han representado las significatividades relevantes.

Los resultados del presente trabajo muestran que el tamaño de las células que conforman el epitelio superficial de la mucosa y el de las células musculares del estómago larval aumentan muy significativamente desde el estadio 25 hasta el estadio 45, mientras que el número de células por estrato se mantiene constante durante la metamorfosis espontánea (Figura 4).



Experimentalmente, la hipertrofia larval producida por el bloqueo de la función tiroidea genera un aumento muy significativo del tamaño de los distintos tipos celulares del estómago respecto a sus controles. A su vez, la hipertrofia del estómago se correlaciona con la generación de larvas gigantes de *R. arenarum* por la acción goitrogénica (Figura 4). En contraste, la inducción de la metamorfosis por T3 reproduce el comportamiento celular del estómago durante la metamorfosis espontánea, generando un aumento muy significativo del tamaño de todos sus tipos celulares superficiales. Sin embargo, las células glandulares y musculares fueron significativamente más pequeñas (Figura 5). Estas diferencias podrían atribuirse tanto a factores individuales como al efecto catabólico producido por la administración de T3 en la inducción precoz de la metamorfosis. El análisis estadístico del tamaño celular y de la intensidad de expresión de cadherina E,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina en el estómago larval de *Rhinella arenarum* mostró que durante la premetamorfosis de esta especie se produce una síntesis continua de estas moléculas, la cual sería esencialmente independiente de las HT, ya que durante este periodo los niveles de las HT son bajísimos y comienzan a elevarse durante la prometamorfosis.

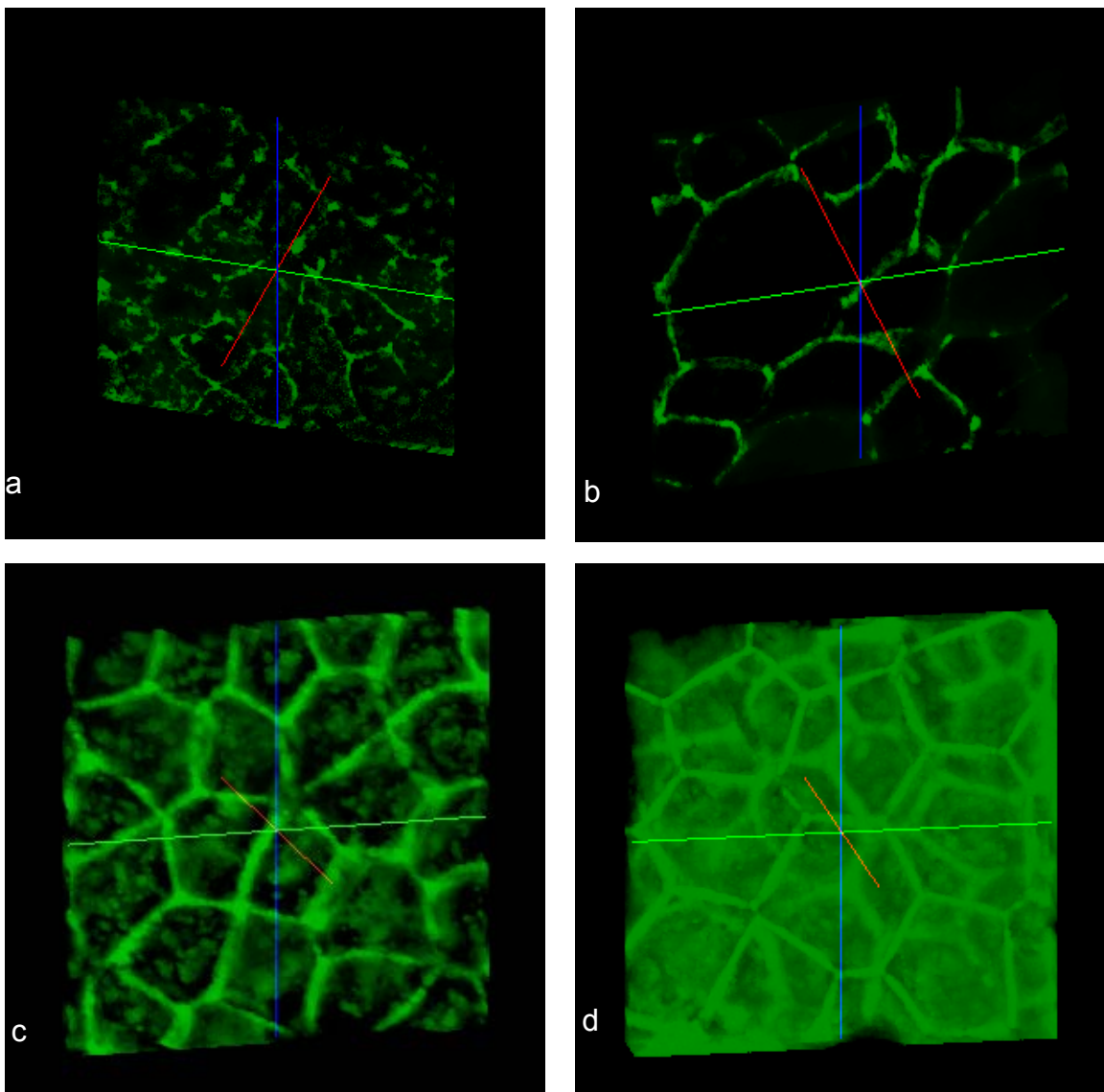
El bloqueo de la función tiroidea por la acción goitrogénica del perclorato de potasio no afectó la producción de las moléculas estudiadas, como lo demuestra la disminución de su expresión relativa al aumento del tamaño celular. Estos resultados confirman la independencia de la síntesis de HT de cadherina E,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina durante la premetamorfosis y prometamorfosis temprana. Adicionalmente, estos resultados sugieren la ausencia de mecanismos compensatorios independientes de T3, o al menos que los mismos, si existen son ineficientes para mantener la densidad de expresión de estas moléculas. Sin embargo, no se detectaron alteraciones en la adhesión celular en el estómago larval (Figura 6).

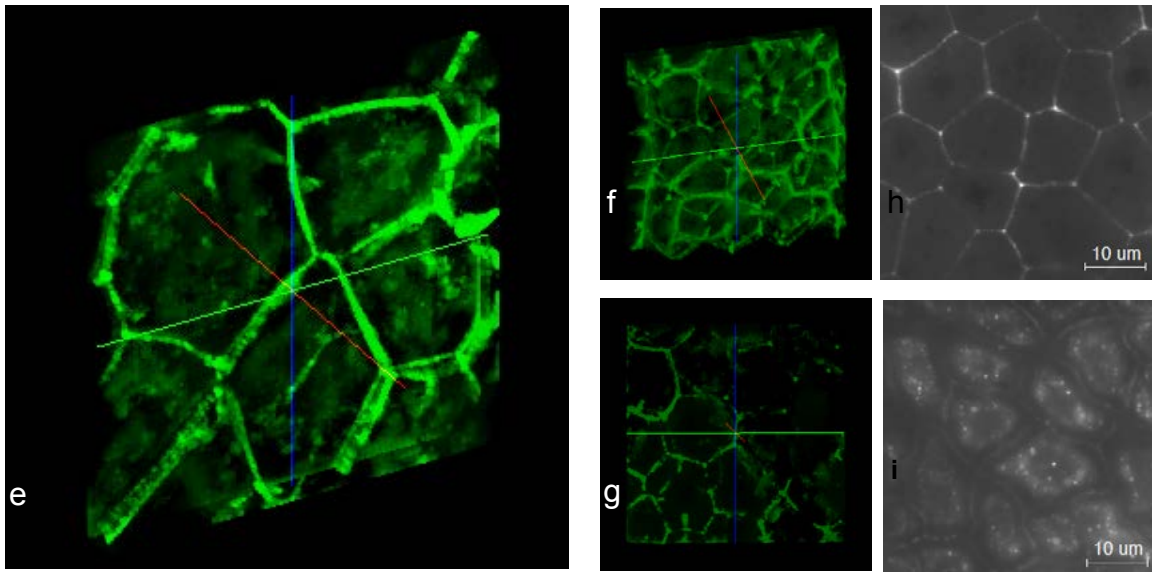
La inducción de la metamorfosis de *R. arenarum* por T3 generó la regulación positiva de la expresión de cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina correlacionada al aumento de tamaño celular, en los distintos estratos celulares del estómago larval y reprodujo el comportamiento seguido por las larvas que metamorfosean espontáneamente. A su vez, se observó que los perfiles de expresión de cadherina E y de  $\alpha$ -catenina son más similares entre sí en el epitelio superficial y glándulas de la mucosa que con el perfil exhibido por  $\beta$ -catenina. Respecto a la distribución por estratos, la expresión de las tres moléculas es mayor en el epitelio superficial respecto a las glándulas de la mucosa y  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina se expresan adicionalmente en las capas musculares lisas, siendo la expresión de  $\beta$ -catenina mucho mayor que la de  $\alpha$ -catenina en este tipo celular. Los niveles de expresión de cadherina E son prácticamente despreciables en la capa muscular y se atribuyeron al fondo inespecífico de la reacción (Figura 6). La expresión de  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina en las capas musculares del estómago y la ausencia de cadherina E hacen pensar en la presencia de una cadherina diferente, tal como lo sugieren trabajos previos realizados en otras especies de anuros (Izaguirre y col., 2001). Para todos los estratos la intensidad de expresión de  $\beta$ -catenina fue mayor que la de cadherina E y  $\alpha$ -catenina, sugiriendo la participación de esta molécula en cascadas de señalización además de su rol adhesivo durante la metamorfosis del estómago larval, periodo en el que se produce una extensa y profunda remodelación celular y tisular.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo permiten postular por primera vez en forma cuantitativa, un control positivo espacial y temporal de cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina por la hormona T3 durante el desarrollo metamórfico del estómago larval de *Rhinella arenarum*. El aumento de los niveles de cadherina E,  $\beta$ -catenina y  $\alpha$ -catenina durante la premetamorfosis, cuando los niveles de T3 son bajos, sugiere la regulación de su expresión por factores diferentes a los que actúan durante la prometamorfosis y el clímax metamórfico. Otra hipótesis, aunque a la luz de estos resultados menos probable, es que el control por T3 de la expresión de estas moléculas se ejerza desde la premetamorfosis en *R. arenarum*. Se sabe que por ejemplo, en *X. laevis* la glándula tiroidea se desarrolla en la embriogénesis tardía (Dodd y Dodd, 1976; Regard, 1978), es decir durante la eclosión larval (estadios 35/36, Nieuwkoop y Faber, 1956), aunque la tiroides recién se torna funcional alrededor del estadio 53 (Nieuwkoop y Faber,

1956; Saxen y col., 1957a, b). Este proceso es bastante similar al que se produce en otros anuros (Dodd y Dodd, 1976), reduciendo la factibilidad de esta segunda hipótesis. A medida que la larva se desarrolla, la tiroides incrementa la síntesis y secreción de HT en el plasma, llevando a un acúmulo en sus niveles plasmáticos y en consecuencia al disparo de la metamorfosis (Dodd y Dodd, 1976).

Habiendo demostrado por estudios de inmunohistoquímica bidimensional cuantitativa en modelos animales *in vivo* (Izaguirre y Casco, 2010), que la expresión de cadherina E,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina es controlada hormonalmente por la hormona T3, ejerciendo un efecto regulatorio positivo durante la remodelación y el mantenimiento del epitelio metamórfico en anuros, en una segunda etapa se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia y microscopía de desconvolución digital tridimensional cuantitativa (Adur y Schlegel, 1997; Díaz-Zamboni, 2004; Adur, 2006; Adur y col., 2007; Díaz-Zamboni y col., 2007; 2008; Izaguirre y col., 2010) para avanzar en el conocimiento del control de los receptores de adhesión de interés. Para ello, se diseñó e implementó un modelo experimental *in vivo* de alteración de los niveles de fosforilación de las proteínas de los complejos de unión cadherina-catenina. Empleando ortovanadato sódico como inhibidor de fosfatas de tirosina, se evaluó el patrón y nivel de expresión de cadherina E y de  $\beta$ -catenina a nivel de la epidermis de *Rhinella arenarum* (Izaguirre y colaboradores, 2010; Figura 7).

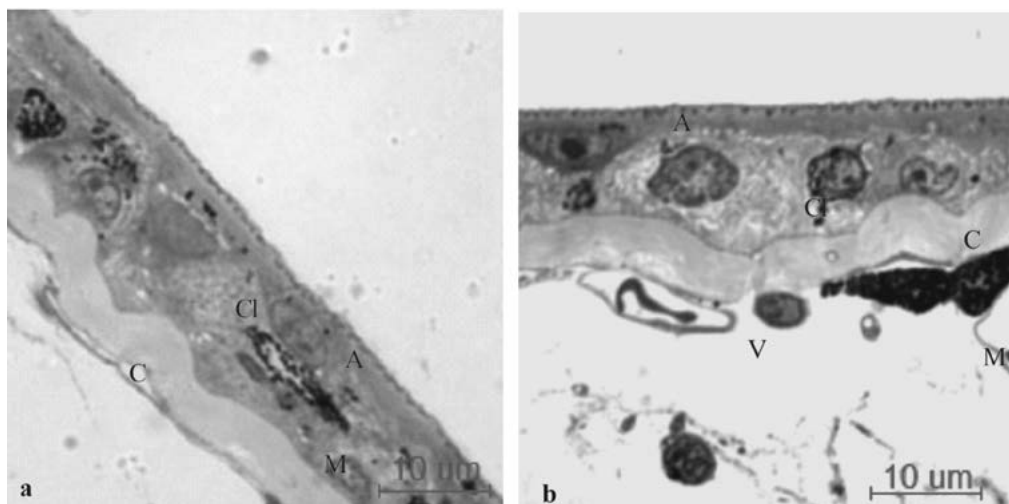




**FIGURA 7.** (a-g) Proyecciones 2D de intensidad máxima de stacks de 128 imágenes de cadherina E de la epidermis dorsal cefálica de *Rhinella arenarum*. (a-e) Las imágenes de MDD claramente muestran que cadherina E aumenta en los límites celulares cambiando de un patrón punteado a continuo durante el desarrollo con mayor densidad de señal en las punta. Estadios 17 (a), 19 (b), 25 (c), 35 (d) y 40 (e). Todos los stacks incluyen dos capas celulares. (f-g) Larvas tratadas con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , mostrando progresiva disminución dependiente del tiempo de la expresión de cadherina E. (h-i) Expresión 2D de  $\beta$ -catenina en la epidermis dorsal cefálica de las larvas control (h) y tratadas con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (i) Epidermis de larva de estadio 35, mostrando que  $\beta$ -catenina desaparece de los límites celulares y aumenta a nivel citoplasmático y nuclear, sugiriendo un rol de señalización. Las líneas representan: ejes x (green), y (blue), and z (red).

Gracias a este modelo se demostró que durante la morfogénesis epitelial en condiciones normales se producen cambios en los patrones espacio-temporales de la expresión de cadherina E, correlacionados con el incremento de esta molécula, así como del número de células con geometría hexagonal y por ello, estabilizantes de la arquitectura epitelial (Izaguirre y colaboradores, 2010).

Cuando se alteran los niveles de fosforilación de las proteínas de los complejos de unión, se produce una drástica pérdida de cadherina E y de  $\beta$ -catenina en los contactos célula-célula y el incremento citoplasmático y nuclear de  $\beta$ -catenina en las células epidérmicas, sugiriendo la activación de la ruta de señalización nuclear mediada por  $\beta$ -catenina (Figura 7). Sorprendentemente, no se detectan cambios en la forma celular o en la arquitectura de la piel (Figura 8), sugiriendo que la cadherina E epidérmica estaría involucrada en la señalización celular más que en el mantenimiento de los contactos intercelulares durante el mantenimiento de la arquitectura epitelial *in vivo*.



**FIGURA 8.** Secciones sagitales de la piel de larvas de estadio 35 tratadas con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (a) y control (b) de *Rhinella arenarum*. No se detectaron cambios morfológicos después del tratamiento con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Azul de toluidina. **A:** células apicales; **CI:** células claras; **C:** colágeno; **M:** melanóforo; **V:** vasos sanguíneos.

Esta hipótesis es también soportada por los estudios realizados *in vivo* por Tunggal y colaboradores (2005). Este grupo ha reportado que la inactivación del gen de cadherina E en ratones, produce muerte perinatal debido a la incapacidad para mantener una barrera acuosa epidérmica funcional, a la vez que revelaron que algunos componentes claves de las uniones ocluyentes estaban inadecuadamente localizados, resultando en una arquitectura alterada de estas uniones, así como de la resistencia epidérmica. Sin embargo, los desmosomas se formaron normalmente y no se detectaron defectos obvios en los contactos celulares. Estos resultados sugieren que cadherina E sería requerida específicamente para la formación de las uniones ocluyentes pero no para la de otros contactos, hipotetizando que *in vivo* esta molécula estaría involucrada en mecanismos de señalización más que en la formación de los contactos intercelulares (Tunggal y col., 2005).

En una tercera etapa, para correlacionar los estudios morfométricos realizados con estudios moleculares, se aplicaron técnicas de retrotranscripción y amplificación de ADNcopia (ADNc) por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y *western blotting*, para determinar los niveles de expresión de los ARNm de cadherina E y  $\beta$ -catenina y de sus proteínas, respectivamente. Para ello, se realizó el análisis de las secuencias de los genes de cadherina E y  $\beta$ -catenina para posteriormente diseñar *primers* específicos para cuantificar la expresión de ARNm (qRT-PCR) (Galletto y col., 2012).

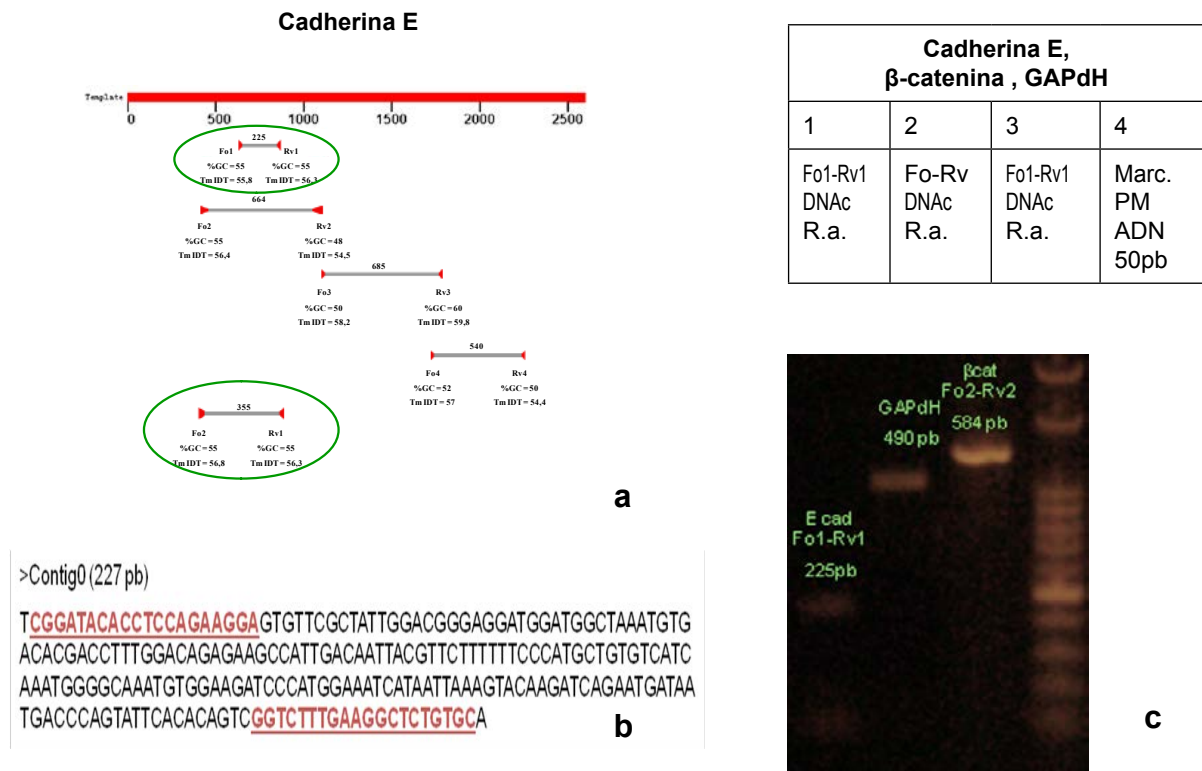
El análisis de las secuencias nucleotídicas de las moléculas bajo estudio se realizó comparando 8 vertebrados: *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Bos taurus* y *Homo sapiens*. Para ello, se realizaron alineamientos locales con MegaBLAST empleando como "query" las secuencias de cadherina E y  $\beta$ -catenina de *Xenopus laevis*, enfrentándolas con la base de datos nucleotídicas completa del NCBI y alineamientos múltiples entre las especies citadas más arriba mediante el software T-Coffee. Analizando regiones de conservación y organización de las secuencias, se diseñaron *primers* manualmente y con el software Primer-BLAST (Ye y col., 2012), tomando de referencia las secuencias de *Xenopus laevis*. A partir del ARN extraído de *Rhinella arenarum*, tanto de especímenes adultos como larvales, se realizaron RT-PCR (Tabla 4).

**TABLA 4.** Primers diseñados que amplificaron cadherina E y  $\beta$ -catenina y que permitieron cuantificar (celeste) la expresión en *Rhinella arenarum*.

Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon size	Tm	Ta exp
$\beta$ cat Fo1	GATCTAATGGAGCTGGACATGGC	584	57.6	56
$\beta$ cat Rv1	CGAACTATAGCAGACACCATCTG			
<i>R.a</i> $\beta$ cat Fo1	TGGGCAGTTTGCAATGACCAGA	322	59	58
<i>R.a</i> $\beta$ cat Rv1	ACGCATAATAGCATGGCGGGAA		59.3	
Cadherina E Fo1	CGGATACACCTCCAGAAGGA	225		56
Cadherina E Rv1	GCACAGAGCCTTCAAAGACC			
GAPdH Fo	CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	490		58
GAPdH Rv	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG			

**Aislamiento, secuenciación y caracterización de ARNm de cadherina E de *Rhinella arenarum***

Se amplificó y secuenció un fragmento de ADNc de 225 pb, proveniente de estómago de animales adultos, resultante de emplear *primers* diseñados sobre las secuencias de *X. laevis* (Tabla 4, Figura 9).

**FIGURA 9.** Aislamiento, amplificación y caracterización del ARNm de cadherina E de *Rhinella arenarum*. (a) Conjunto de primers diseñados y utilizados para amplificación de cadherina E. En verde los primers que lograron amplificar algún fragmento de los ARNm. (b) Gel de electroforesis mostrando los fragmentos amplificados. (c) Secuencia obtenida del fragmento de 225 pb.

A pesar de que el análisis de alineamiento local muestra que la secuencia de 185 pb de cadherina E de *Rhinella arenarum* tiene una identidad del 100% con la secuencia codificante completa del ARNm de *Xenopus laevis* y del 76% con los de rata y ratón (Figura 10), luego de diseñar nuevos *primers* específicos de *Rhinella arenarum* (Tabla 4) para cuantificar el ARNm de cadherina E, no se logró amplificarlos durante el del desarrollo de esta especie.

### Descriptions

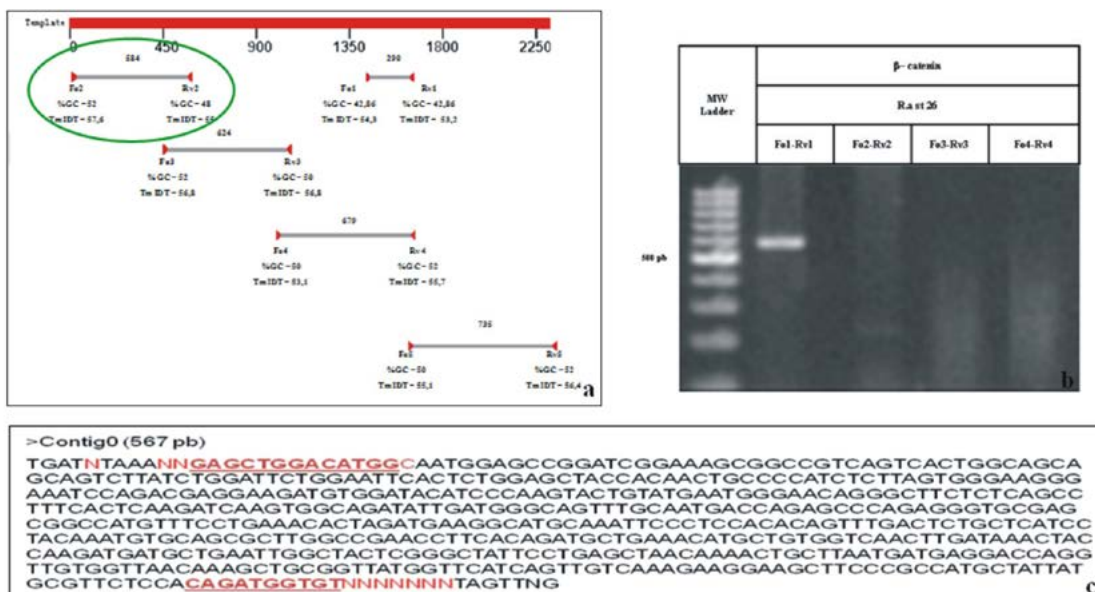
Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [X](#) PubChem BioAssay  
Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">NM_001172232.1</a>	<i>Xenopus laevis</i> cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (cdh1), mRNA (LOC4708.1;XLU04708) <i>Xenopus laevis</i> E-cadherin mRNA, complete cds	407	407	99%	2e-111	100%	<a href="#">UG</a>
<a href="#">NM_021334.1</a>	<i>Rattus norvegicus</i> cadherin 1 (Cdh1), mRNA (cd) (AB017696.1) <i>Rattus norvegicus</i> mRNA for E-cadherin, complete cds	134	134	92%	2e-29	76%	<a href="#">UEG</a>
<a href="#">NM_009864.2</a>	<i>Mus musculus</i> cadherin 1 (Cdh1), mRNA	132	132	79%	7e-29	76%	<a href="#">UEG</a>
<a href="#">XM_001377858.1</a>	PREDICTED: <i>Monodelphis domestica</i> similar to uvomorulin (LOC100027800), mRNA	129	129	92%	8e-28	73%	<a href="#">G</a>
<a href="#">XM_001497018.2</a>	PREDICTED: <i>Equus caballus</i> similar to CDH1 protein (LOC100068844), mRNA	107	107	97%	3e-21	70%	<a href="#">G</a>
<a href="#">NM_004360.3</a>	<i>Homo sapiens</i> cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (CDH1), mRNA	95.1	95.1	78%	2e-17	71%	<a href="#">UEG</a>

**FIGURA 10.** Análisis de identidad de la secuencia del ARNm de cadherina E con las regiones codificantes completas de los ARNm de otras especies. Observe la identidad del 100% con la secuencia de *Xenopus laevis* y del 76% con rata y ratón. Solo se muestran los resultados relevantes.

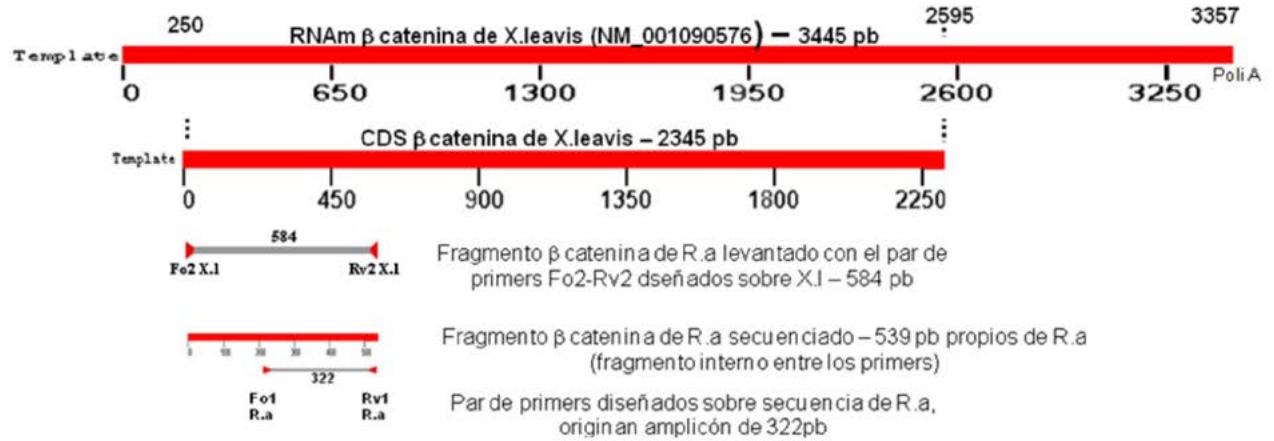
### Aislamiento, secuenciación y caracterización de ARNm de $\beta$ -catenina de *R. arenarum*

A partir del empleo de múltiples *primers* diseñados sobre la secuencia *X. laevis* se amplificó y secuenció un fragmento de ADNc de 584 pb (Tabla 4, Figura 11).



**FIGURA 11.** Aislamiento, amplificación y caracterización del ARNm de  $\beta$ -catenina de *R. arenarum*. (a) Conjunto de primers diseñados y utilizados para amplificación de  $\beta$ -catenina. En verde los primers que lograron amplificar algún fragmento de los ARNm. (b) Gel de electroforesis mostrando los fragmentos amplificados. (c) Secuencia de nucleótidos obtenida por secuenciación del fragmento de 584 pb amplificado por PCR.

A partir de esta secuencia obtenida y con el objetivo de cuantificar la expresión de ARNm durante el desarrollo, se diseñaron nuevos primers específicos de  $\beta$ -catenina de *Rhinella arenarum* (Tabla 4) y al amplificar el ARNm, se obtuvo un fragmento específico de *Rhinella arenarum* de 322 pb (Figura 12).



**FIGURA 12:** Resumen de las etapas seguidas durante la secuenciación de  $\beta$ -catenina de *Rhinella arenarum*.

El alineamiento local de la secuencia de 539 pb de  $\beta$ -catenina de *R. arenarum* con la base de datos no redundante de nucleótidos del NCBI, muestra que esta región tiene una identidad del 85 % para el ARNm de  $\beta$ -catenina de *Xenopus laevis* (Figura 13).

```
>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 ATGGAGCCCGATCGGAAAGCGGCCGTCAGTCACCTGGCAGCAGCAGTCTTATCTGGATTCT 62
Sbjct 289 ATGGAGCCAGACCGAAAGGCAGCAGTGAGCCACTGGCAGCAGCAGTCTTACCTGGATTCT 348

Query 63 GGAATTCACCTCTGGAGCTACCACAACCTGCCCATCTCTTASTGGGAAAGGAAATCCAGAC 122
Sbjct 349 GGGATTCATCTCTGGAGCAACCCACACAGCACCATCTTTGAGTGGCAAAAGGAAACCCAGAG 408

Query 123 GAGGAAGATGTGGATACATCCCAAGTACTGTATGAATGGGACAGGGCTTCTCTCAGCCT 182
Sbjct 409 GATGAAGATGTGGATACCAACCAAGTTTTGTATGAGTGGGACAGGGCTTCTCTCAGTCC 468

Query 183 TTCACTCAAGATCAAGTGGCAGATATTGATGGGCACTTTGCAATGACCAGAGCCAGAGG 242
Sbjct 469 TTCACTCAAGATCAAGTGGCTGATATTGATGGCCAGTATGCCATGACAAGAGCCAGAGA 528

Query 243 GTGGCAGCGGCCATGTTTCCTGAAACACTAGATGAAGGCATGCAAAATCCCTCCACACAG 302
Sbjct 529 GTTCGTGTGCAATGTTCCAGAAACCCCTTGATGAAGGCATGCAAGTTCCATCCACACAA 588

Query 303 TTGACTCTGCTCATCTACAAAATGTGCAGCGCTTGGCCGACCTTCACASATGCTGAAA 362
Sbjct 589 TTGACTCTGCACACCCCAACAAAATGTGCAACGTTTAGCAGAGCCTTCCASATGCTCAAA 648

Query 363 CATGCTGTGGTCAACTTGATAAACTACCAAGATGATGCTGATTGGCTACTCGGGCTATT 422
Sbjct 649 CACGCTGTGGTCAACTTGATCAATTACCAGGATGATGCTGATTGGCCACTCGAGCAATC 708

Query 423 CCTGAGCTAACAAAACCTGCTTAATGATGAGGACCAGGTTGGTGTAAACAAAGCTGCGGTT 482
Sbjct 709 CCCGAGCTGACGAAACTGCTTAATGACGAGGACCAGGTTGAGTAAACAAAGGCTGCTGTA 768

Query 483 ATGGTTTCATCAGTTGTCAAAGAAGGAAGCTTCCCGCCATGCTATTATGCGTTCTCCA 539
Sbjct 769 ATGGTTTCACCAGCTGTCAAAGAAGGAAGCCTCACGCCATGCTATAATGCGCTCACCA 828
```

**Figura 13.** Análisis de identidad de BLASTn de la secuencia del ARNm de  $\beta$ -catenina de *Rhinella arenarum* con las región codificante ubicada entre 289-825 pb del ARNm de *Xenopus laevis*.

Se sabe que el ADNc de  $\beta$ -catenina de *Xenopus laevis* tiene 3445pb (Mc Crea et al., 1997), con un 5' UTR de 249 bp y un 3' UTR de 850 bp, una secuencia codificante que abarca la región de 250-2595 bp y codifica una proteína de 781 aminoácidos. La comparación del ARNm de  $\beta$ -catenina de varias especies evidencia que poseen el mismo tamaño de región codificante pero difieren en sus tamaños de los 5' UTR y 3' UTR.

Aislamiento, secuenciación y caracterización de ARNm de Glyceraldehyde-3-Phosphate-dehydrogenase (GAPdH) de *Rhinella arenarum*.

Para aumentar la confiabilidad de la RT-PCR en la cuantificación (qRT-PCR) (Freeman et al., 1999) de los ARNm de las moléculas bajo estudio durante el desarrollo del tracto digestivo de *R. arenarum*, se utilizó como control endógeno GAPdH. Esta se expresa constitutivamente en muchos tejidos (Mori et al., 2008) y permite comparar los niveles de ARNm de los genes de interés con los del control que no varía con el desarrollo de *R. arenarum*. Amplificamos y secuenciamos un fragmento de 490 pb del ADNc de GAPdH de *R. arenarum* (Figuras 9&14).

```
>Contig0 (500pb)
NNNNGGTCATCCATGACAACCTTTGGTATCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATCAC
TGCCACSCAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTC
TCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGC
TGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGAC
CTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGT
CGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC
AACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCCTTT
GTCAAGCTCATTTCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGNNN
```

**FIGURA 14.** Secuencia de nucleótidos obtenida del fragmento amplificado por PCR de GAPdH de *R. arenarum* (primers empleados en rosa).

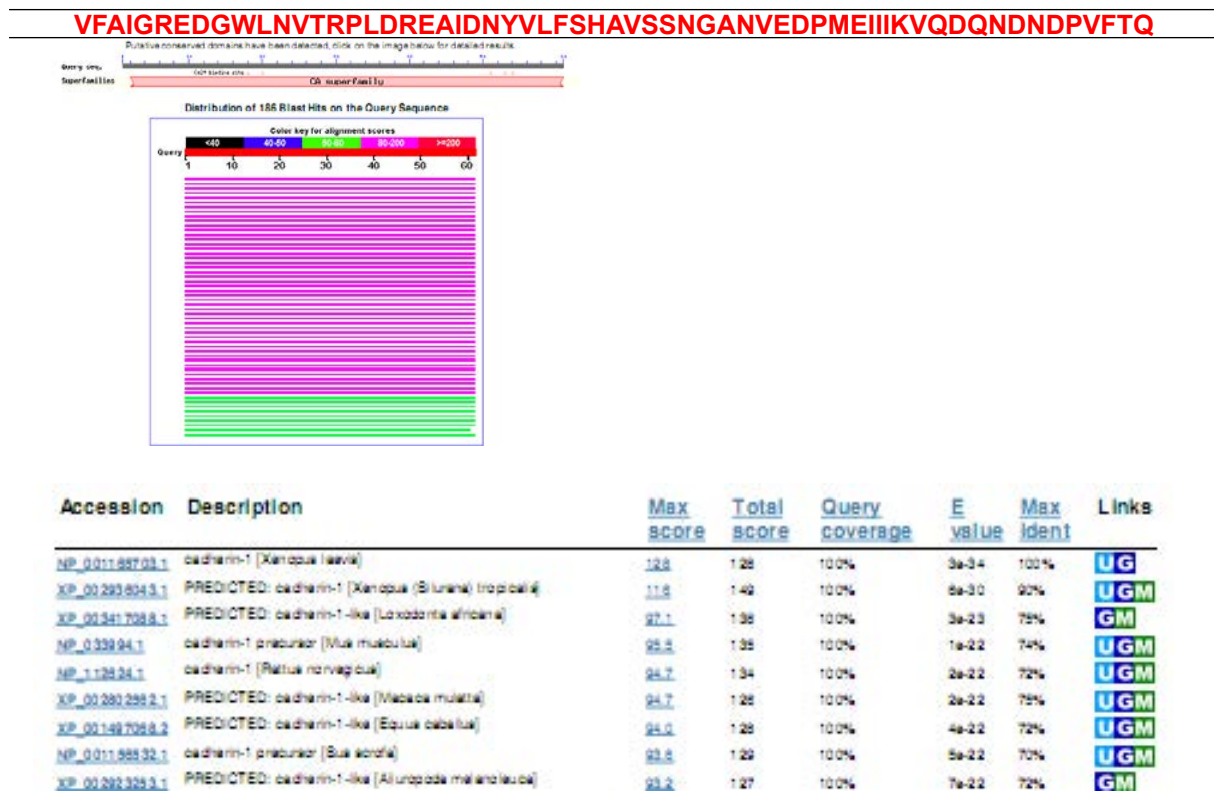
## Caracterización de las proteínas cadherina E, $\beta$ -catenina y GAPdH de *Rhinella arenarum*

### Cadherina E

Empleando herramientas bioinformáticas (*software* Chromas Pro 1.41, Technelysium Pty. Ltd.) se realizó una búsqueda de los posibles marcos de lectura en el fragmento de 185 pb de cadherina E aislado, obteniéndose la predicción de un fragmento funcional de 61 aminoácidos. El análisis de esta secuencia de *Rhinella arenarum* con la base de datos del REFseq muestra una identidad del 100% con cadherina E de *Xenopus laevis* (Figura 15).

Paralelamente, con el objetivo de reconocer los cambios evolutivos adoptados por cadherina E, a la vez que mejorar la búsqueda de sus ARNm en nuestro modelo, se realizó un profundo análisis bioinformático de la subfamilia de cadherinas C-1 a la que pertenece (Takeichi et al., 2000; Gumbiner, 2000; Hulpiau and van Roy, 2009) y se estableció un modelo filogenético con las secuencias conocidas.





**FIGURA 15.** En el recuadro superior, la secuencia del segmento de 75 aa de cadherina E, predicho a partir del fragmento de 227 pb. En la imagen del medio, parte de los resultados de su alineamiento con la base de datos del NCBI. En la imagen inferior, detalle de la identidad del 98% con la secuencia de cadherina E de *X. laevis*.

Para este análisis, se utilizaron el dominio extracelular de longitud completa y el dominio citoplasmático de los miembros de la Familia C-1 (Tabla 5), empleando el algoritmo filogenético Maximum Likelihood (ML) (Hasenahuer y col., 2013). En este estudio filogenético se obtuvieron las secuencias FASTA de proteínas homólogas de los miembros de cadherinas C-1 de *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Rata norvegicus* (Rn), *Bos taurus* (Bt), *Gallus gallus* (Gg), *Danio rerio* (Dr), *Xenopus laevis* (Xl) y *Xenopus tropicalis* (Xt), de UniProtKB [<http://www.uniprot.org/>]. Los dominios extracelular (EC) y citoplasmático (CD) fueron editados y analizados por separado, empleando el software MEGA5 (Tamura et al., 2011), se descartaron las secuencias incompletas y se analizaron finalmente un total de 145 secuencias. El alineamiento múltiple de las secuencias de EC y CD fue realizado con el servidor web MUSCLE [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>], utilizando los parámetros por default.

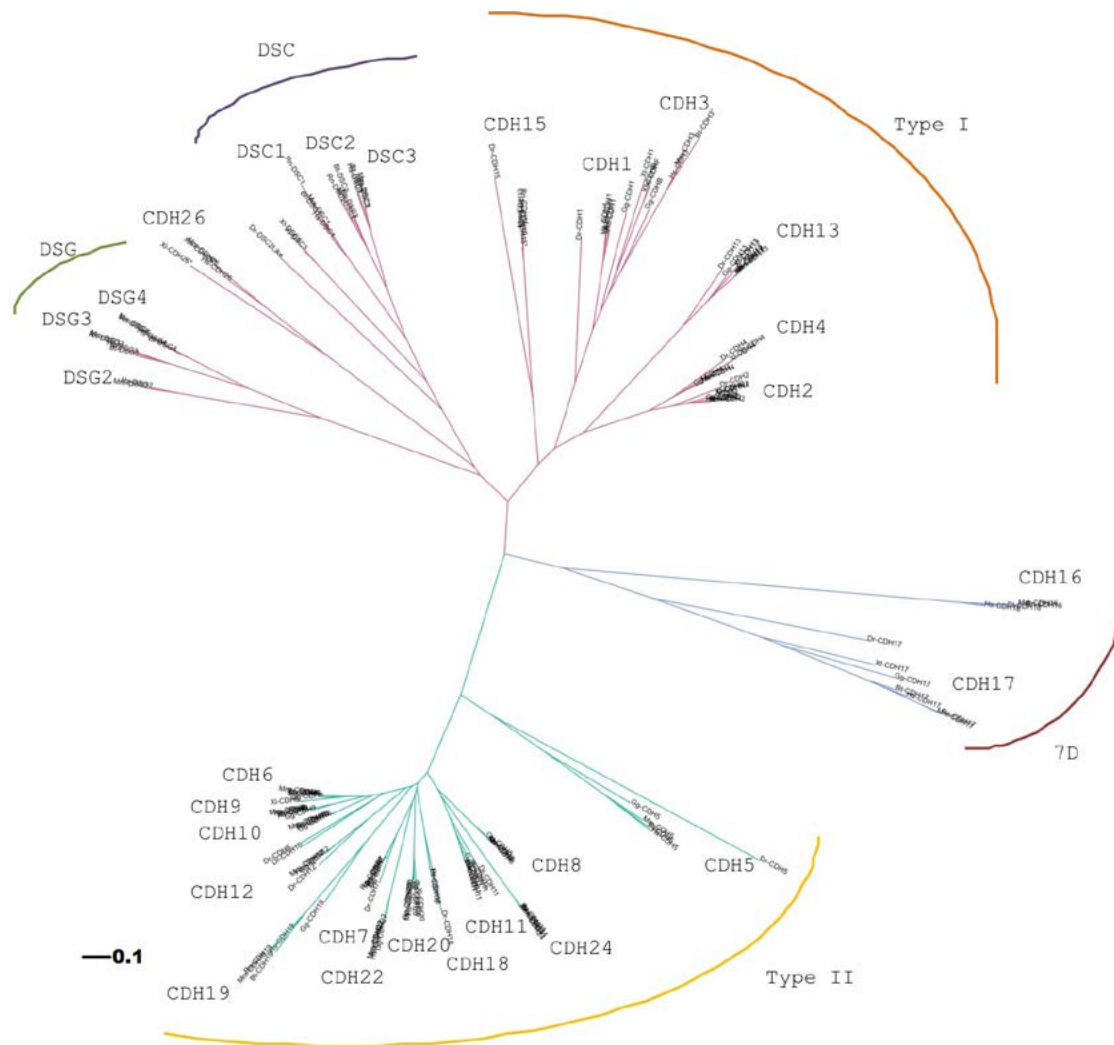
Debido a la gran variabilidad de los CDs de los miembros de la familia-C1 se analizaron y construyeron árboles de éstos por separado, agrupándolos en cuatro familias (CDs tipo I, CDs tipo II, CD desmogleinas y CD desmocolinas). Dado que CDH13 carece de CD, CDH26 queda sola y no comparte significativa similitud de su CD con otros miembros y 7D posee un CD muy corto, sus árboles no fueron construidos. Los cinco alineamientos (EC y 4 CDs) fueron manualmente inspeccionados y corregidos cuando fue necesario, teniendo en cuenta la información de la estructura y dominios conservados. Se evaluaron las regiones gap, eliminando aquellas que eran ambiguas.

**TABLA 5.** Miembros de la familia C-1 de cadherinas (basada en Choi et al., 1990; Herzberg et al., 1991; Hulpiau and van Roy, 2009).

<b>Subfamilia</b>	<b>Miembros</b>
<b>Tipo-I</b>	CDH1 ( <i>epithelial E-cadherin</i> ), CDH2 ( <i>neural N-cadherin</i> ), CDH3 ( <i>placental P-cadherin</i> ), CDH4 ( <i>retinal R-cadherin</i> ), CDH15 ( <i>muscular M-cadherin</i> ), CDHXB ( <i>Xenopus blastomere cadherin</i> ), CDHC/EP ( <i>C, cleavage/EP cadherin of Xenopus laevis</i> ).
<b>Tipo-II</b>	CDH5 ( <i>vascular-endothelial VE-cadherin</i> ), CDH6 ( <i>kidney K-cadherin</i> ), CDH7, CDH8, CDH9 ( <i>T1-cadherin</i> ), CDH10 ( <i>T2-cadherin</i> ), CDH11 ( <i>osteoblastic OB-cadherin</i> ), CDH12 ( <i>brain BR-cadherin o N-cadherin-2</i> ), CDH18, CDH19, CDH20, CDH22, CDH24
<b>Desmocolinas</b>	DSC1, DSC2, DSC3
<b>Desmogleinas</b>	DSG1, DSG2, DSG3, DSG4
<b>7D</b>	CDH16: <i>Ksp-cadherin</i> , CDH17: <i>liver-intestine LI-cadherin</i>
<b>CDH13</b>	<i>truncated T- or heart H-cadherin</i>
<b>CDH26</b>	CDH26

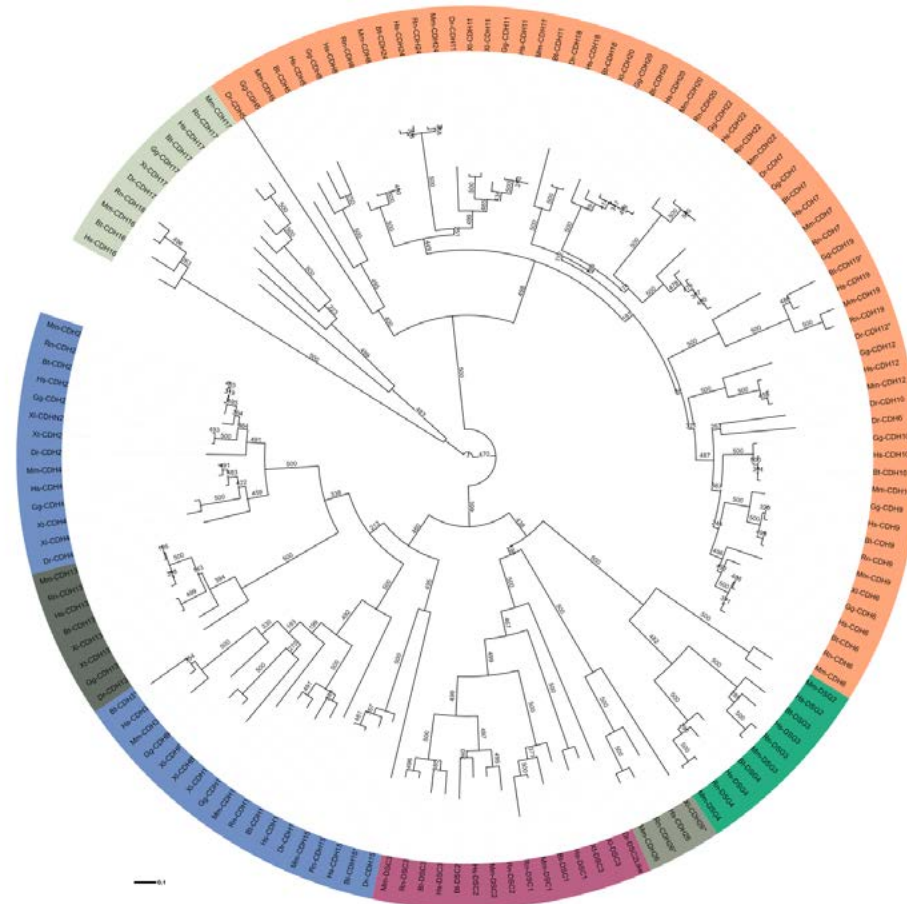
Las cadherinas 7D fueron consideradas como out-group para cada uno de los árboles de EC, debido a que algunos autores proponen que ellos tienen un ancestro común a todas las cadherinas C-1, pero que han divergido de ellos adquiriendo dos ECs extra después de eventos de duplicación, tornándose un grupo separado (Jung et al., 2004). DSG1 no fue incluida en el análisis de EC, debido a que posee una repetición EC5 mucho más corta y diferente de otros miembros C-1; aunque fue incluida para la construcción del árbol basado en CD. Los alineamientos múltiples formateados en PHYLIP fueron testeados con ProTest (Abascal et al., 2005), obteniéndose como modelos de evolución más adecuados los LG+I+G para EC y JTT+G para todos los CDs. Estos modelos fueron utilizados para inferir los árboles por el método de Maximum Likelihood con el software PhyML3.0 (Guindon and Gascuel, 2003) y validación estadística de los árboles basados en EC por 500 réplicas de bootstrap no-paramétrico, mientras que 1.000 réplicas para los árboles basados en CD, debido al número de moléculas evaluadas. En ambos casos, se seleccionó el método BioNJ para calcular el inicio del árbol optimizado, seleccionando 20 categorías gamma.

El árbol filogenético basado en EC muestra una gran divergencia que organiza a las moléculas en tres grupos principales: cadherinas tipo II; cadherinas tipo I, desmocolinas, desmogleinas y CDH13; y CDH16 y CDH17. (Figura 16). Las proteínas putativas no caracterizadas se agruparon como se esperaba, confirmando su ortología con las secuencias bien identificadas (Figuras 16 & 17).



**FIGURE 16.** Árbol sin raíz de la familia de cadherinas C-1. Las ramas fueron coloreadas de acuerdo al patrón de agrupamiento.

Gracias al análisis del dominio extracelular completo de los miembros de la familia C-1, encontramos un resultado interesante, que CDH13 que ha sido clasificada como un grupo solitario (Hulpiau and van Roy, 2009) pertenecería a la familia de cadherinas tipo I, compartiendo un ancestro común con CDH2 y CDH4. Debido a que el dominio EC-1 difiere del de otros miembros de cadherinas C-1, el análisis basado en ese único ectodominio la ubicó como un grupo aislado. Nuestro análisis evidencia que en contraste a EC1, el resto de sus ectodominios (EC2-EC5) son más similares a las cadherinas tipo I. En apoyo de esta hipótesis se ha encontrado que mientras CDH13 carece del residuo Trp2 y se cree que dimeriza a través de una interface de dímero-X; se sabe que CDH1 también puede formar estos dímeros, cuando la interface de intercambio de cadenas está alterada de alguna manera (Nagar et al., 1996). Esta evidencia sugiere que CDH13 se separó de CDH2 y CDH4, perdiendo su CD y cambiando aminoácidos involucrados en el intercambio de cadenas. Además, el árbol filogenético claramente muestra ECs mucho más conservados entre cadherinas tipo II que entre otros miembros de C-1 (Figura 16, ver longitud de las ramas).



**FIGURA 17:** Árbol circular con raíz, basado en la secuencia EC, de los miembros de cadherinas de la familia C-1. Sobre las ramas se han consignados los valores de bootstraps. Los asteriscos (\*) muestran las proteínas putativas. Las líneas punteadas señalan la filogenia de cadherina E.

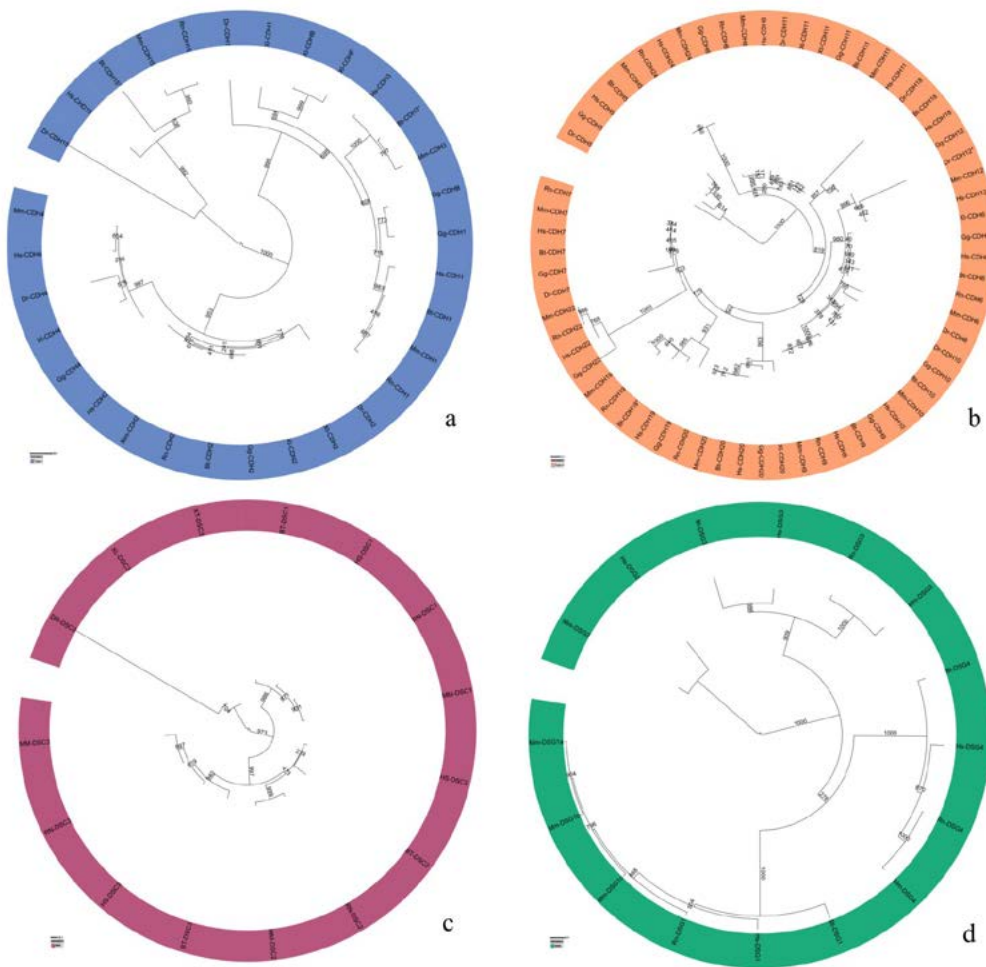
Si bien DSG1 fue excluida en el análisis de EC, el análisis de su CD muestra que tiene un ancestro común con DSG4 (Figuras 17 & 18c), confirmando los resultados de otras investigaciones (Hulpiau and Van Roy, 2009).

Aún cuando muchas columnas de datos tuvieron que ser removidas de los alineamientos, dejando solo los sitios homólogos, cada árbol de CD demuestra —a través de sus cortas distancias— que los CDs están más conservados en cada grupo de ortólogos que los ECs (Figuras 17 & 18).

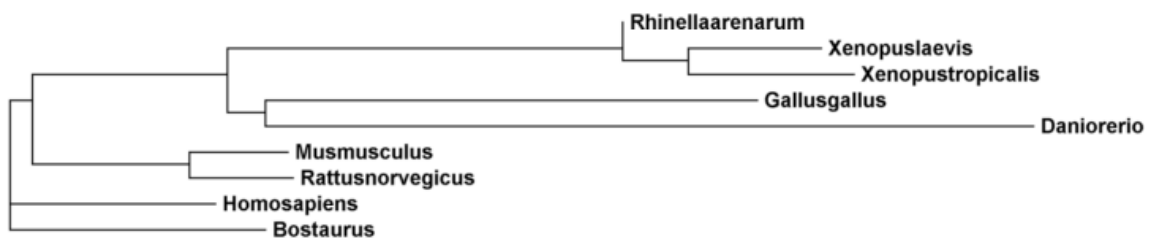
Si bien se observan muchas politomías no resueltas en los árboles, los patrones de agrupamiento general están conservados entre los árboles EC y CDs.

Analizando particularmente el curso evolutivo de cadherina E en los vertebrados en los modelos propuestos basados en EC y en CD, se sugiere una evolución separada de los dominios EC y CD. En forma coincidente, ambos árboles (Figuras 17 y 18a) muestran una aparición de esta molécula en *Danio rerio*, una modificación posterior en anfibios, aves y mamíferos. En estos grupos de especies es en donde se evidencia la mayor divergencia, puesto que si analizamos el dominio adhesivo tenemos a los mamíferos por un lado y a las aves y anfibios por otro, mientras que si analizamos el dominio citoplasmático regulador de la adhesión, aves y mamíferos se agrupan juntos y anfibios por otro lado.

Al evaluar filogenéticamente, por el fragmento aislado a partir de *Rhinella arenarum* se evidencia que la secuencia aislada de esta especie comparte un ancestro común con los anuros *X. laevis* y *X. tropicalis* (Figura 19).



**FIGURA 18:** Árboles circulares con raíz, basados en las secuencias CD de cadherinas tipo I (a), tipo II (b) DSC (c) y DSG (d), de los miembros de cadherinas de la familia C-1. Sobre las ramas se han consignado los valores de bootstraps.



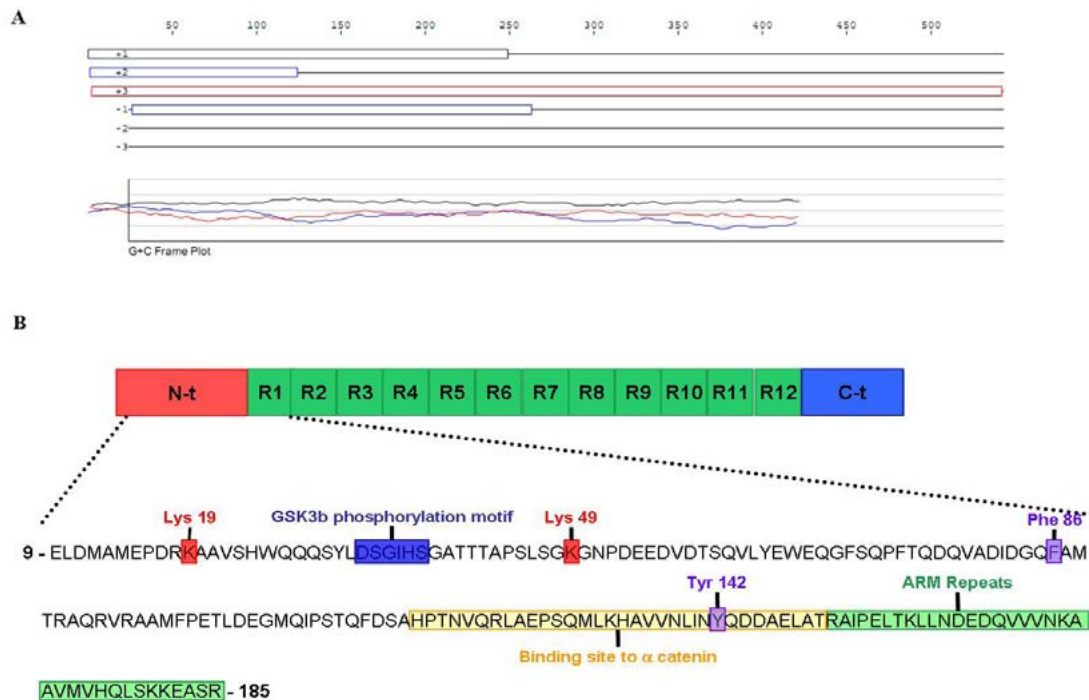
**FIGURA 19:** Cladograma, representando las relaciones filogenéticas de la secuencia de cadherina E aislada de *R. arenarum* con el resto de las especies estudiadas. Obtenido con ClustalW2, empleando el método de Neighbour-joining.

***β*-catenina**

El análisis de las *β*-catenina de ratón y humana evidencia que la proteína *β*-catenina está altamente conservada. Posee una región N-terminal de aproximadamente 130 aa, una región central de 550 aa, la cual contiene 12 repeticiones de 42 aa cada una, conocidas como repeticiones armadillo (arm) y una región C-terminal de 100 aa (Huber *et al.*, 1997; Xing *et al.*, 2007).

Cuando se analiza la secuencia de nucleótidos de 539 bp aislada de *Rhinella arenarum* se identifica un marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) y se predijo una secuencia de 177 aa (Figura 20). La comparación de esta secuencia de aa deducida bioinformáticamente, con las secuencias polipeptídicas completas de las bases de datos por BLASTp, muestra una identidad del 97% con *β*-catenina de *Xenopus laevis* (Figura 21).

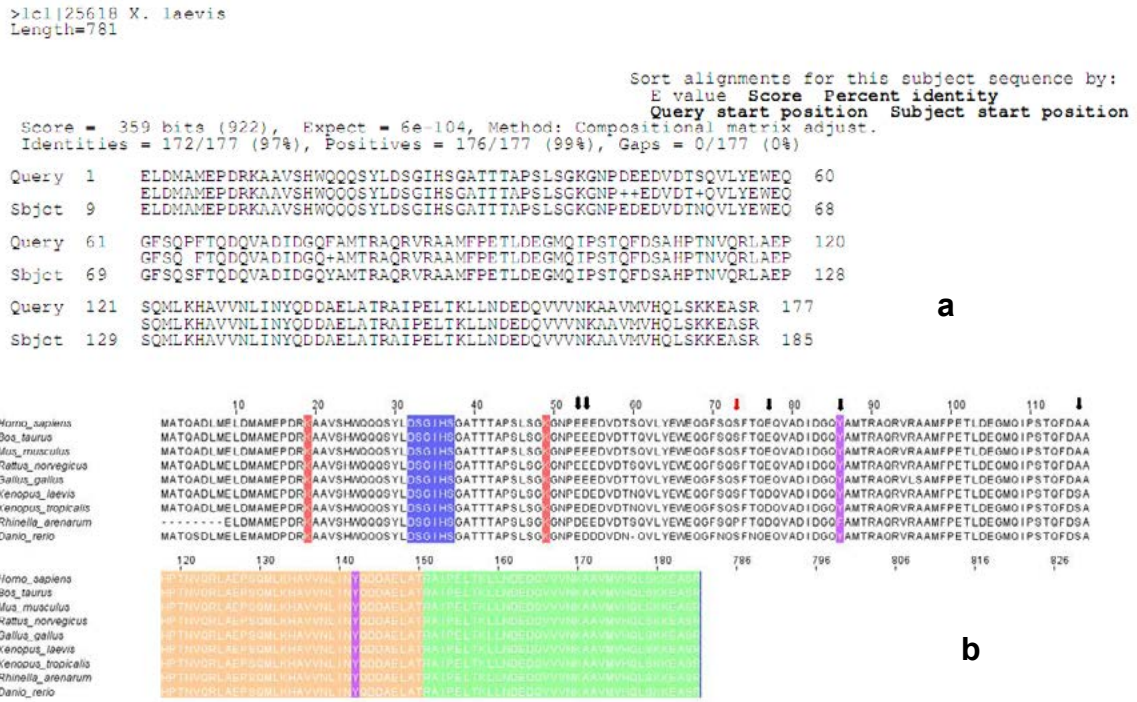
El fragmento de 177 aminoácidos (aa) de *β*-catenina de *Rhinella arenarum* abarca del residuo 9 al 185, exhibe 170 aa idénticos, 4 cambios conservativos (Glu-53→Asp, Glu-77→Asp, Tyr-86→Phe y Ala-116→Ser) y uno no-conservativo (Ser-73→Pro) con algunas de las secuencias de las especies estudiadas (Figura 21). El análisis en la Base de Datos del InterPro revela que este fragmento tiene rasgos característicos de una *β*-catenina. Entre ellos, posee un dominio armadillo-*like* con una repetición armadillo y se agrupa dentro de la familia de proteínas *β*-catenina (Figura 22).



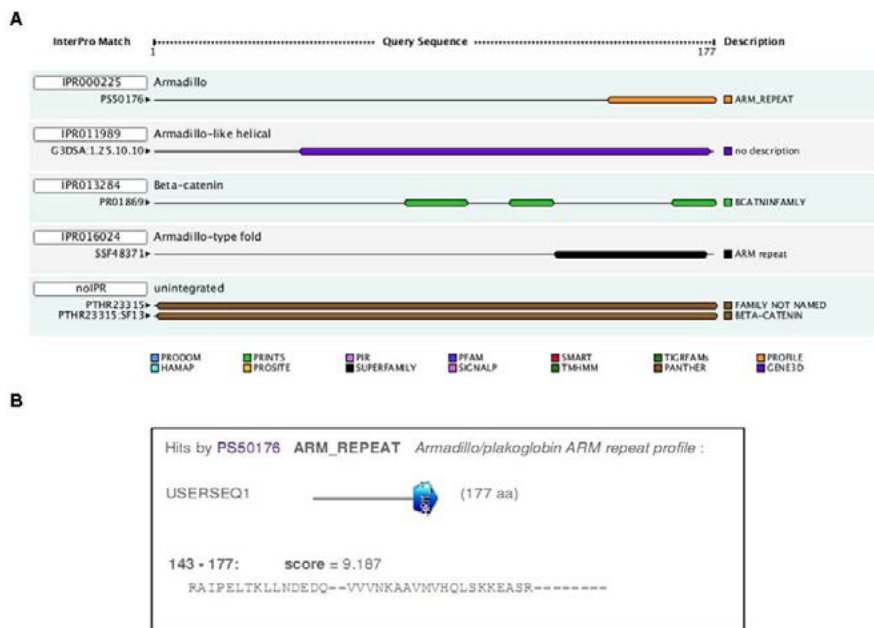
**FIGURA 20.** Secuencia de 177 aminoácidos deducida a partir del fragmento de ADNc 289-825de *Rhinella arenarum*.

**A)** Resultados de *Cromas Pro* software, mostrando los posibles marcos de lectura abiertos. **B)** Esquema que representa la estructura de una molécula de *β*-catenina típica de vertebrados, mostrando la porción N-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos (rojo), una región central de 550 aminoácidos con 12 repeticiones armadillo (arm) de 42 aminoácidos cada una (verde) y una región C-terminal de 100 aminoácidos (azul). Note, que la región amplificada corresponde a la secuencia de aminoácidos deducida a partir del fragmento de ADNc de 539 pb de *β*-catenina de *Rhinella arenarum* –desde el aminoácido 9 al 185– y que coincide con la porción N-terminal y la primera repetición arm. Los sitios de unión de efectores conocido han sido coloreados: ubiquitinación/acetilación Lys-19 y Lys-49; Phe86, probable sitio de interacción de cadherina E; Tyr-142 esencial para la interacción con  $\alpha$ -catenina y para la estabilización del complejo *β*-catenina– $\alpha$ -catenina.

En conclusión, esta secuencia (desde el aa 9 al 185) incluye casi completamente la región N-terminal y la primera arm de  $\beta$ -catenina. Ambas regiones son cruciales para mediar interacciones proteína-proteína, e incluyen el sitio de unión a  $\alpha$ -catenina, el residuo Tyr-142 muy conservado, los sitios Lys-19 y Lys-49 de ubiquitinación/acetilación y un motivo consenso para la fosforilación de la glicógeno sintasa kinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Por lo tanto, esta es una región que capacita a  $\beta$ -catenina para funcionar como una proteína de andamiaje de interacciones multiproteicas (Aberle et al, 1994; Hulsken et al., 1994; Pai et al., 1996; Fukata et al, 1999; Huber et al., 2001).



**FIGURE 21. (a)** Aliniamiento de la secuencia aislada de *R. arenarum* con la de  $\beta$ -catenina de *X. laevis*, con BLASTp. **(b)** Alineamiento múltiple entre la secuencia de  $\beta$ -catenina de *Rhinella arenarum* con la de otros vertebrados. Cambios de aminoácidos conservativos y no-conservativos se señalan con flechas negra y roja, respectivamente. Con cajas resaltadas en color se muestran los motivos consenso de glicógeno sintasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ , azul), de unión a  $\alpha$ -catenina (rosado) y la primera repetición armadillo (verde), de ubiquitinación/acetilación Lys-19 y Lys-49 (magenta), sitio probable Phe86 de interacción con cadherina E, Tyr-142 para interacción con  $\alpha$ -catenina y para la estabilización del complejo  $\beta$ -catenin- $\alpha$ -catenina (lila).



**FIGURE 22.** Dominios funcionales de la secuencia de aminoácidos deducida de 177 aa a partir del ADNc de  $\beta$ -catenina de *Rhinella arenarum*. A) Resultados del análisis con la base de datos InterPro, mostrando razgos característicos de -catenina. B) Detalle del hit Prosite, mostrando analogía con las repeticiones armadillo.

En la secuencia comprendida entre la región N-terminal y la primera repetición armadillo –aa 118 a 146– está el sitio de unión a  $\alpha$ -catenina (Aberle et al. 1994; 1996), la cual exhibe el 100% de conservación entre diferentes especies (Figura 21). Esta secuencia contiene al residuo Tyr-142, esencial para la interacción con  $\alpha$ -catenina (Aberle et al. 1996, Piedra et al., 2003) y para la estabilización del complejo  $\beta$ -catenina– $\alpha$ -catenina. Este residuo puede ser fosforilado y romper así la formación de este complejo, a través de las quinasas de tirosina Fer o Fyn (Pokuta et al., 2000; Piedra et al., 2003). Adicionalmente, aquí están los sitios altamente conservados para la regulación de la ruta de señalización Wnt que lleva a la degradación de  $\beta$ -catenina por la vía ubiquitina–proteosoma. Éstos son los sitios de ubiquitinación/acetilación Lys-19 y Lys-49 y un motivo consenso de fosforilación de GSK3 $\beta$  (Figura 20) (Aberle et al., 1997; Wolf et al., 2002; Winer et al., 2006, Ge et al., 2009). Además del residuo Tyr-142, la región N-terminal de  $\beta$ -catenina de vertebrados posee otro residuo tirosina, Tyr-86, la cual cambia de manera conservativa a Phe en *Rhinella arenarum*. Los estudios de Roura y colaboradores (1999), empleando mutantes de Tyr-86→Phe demostraron la modulación de la unión de  $\beta$ -catenina a cadherin E *in vitro*, por fosforilación de tirosina. Estos autores detectaron que aunque Tyr-86 es un mejor sustrato para pp60c-src, este cambio resulta irrelevante para la interacción con cadherina E, ya que los mutantes de  $\beta$ -catenina Tyr-86→Phe se asocian a cadherina E con constantes de afinidad y asociación similares a los *wild-type*. Sin embargo, el rol de la fosforilación de esta tirosina no está clara, mientras que algunos estudios sugieren que su fosforilación en las proximidades del sitio de unión a  $\alpha$ -catenina disminuiría su unión (Hu et al., 2001), otros estudios realizados *in vitro* no pudieron demostrarlo (Piedra et al., 2003). Por otra parte, mientras que los cambios detectados en los residuos Glu-53→Asp y Glu-77→Asp podrían no afectar la función de  $\beta$ -catenina debido a sus propiedades similares, los cambios como Ser-73→Pro deberían investigarse.

Adicionalmente, se analizó el fragmento deducido de 165 aminoácidos de GAPdH de *Rhinella arenarum* y se realizó un alineamiento local con la base de datos Ref Seq, evidenciándose una identidad del 98% con la GAPdH de *Homo sapiens* (Figura 23).



>Contig0 (500pb)

**NNNNGGTCATCCATGACAACTTTGGTATCGTGAAGGACTCATGACCACAGTCCATGCCATCAC TGCCACSCAGAAGACTGTGGATGGCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGGGCTC TCCAGAATCATCCCTGCCCTCTACTGGCGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTATCCCTGAGC TGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGAC CTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGGCT CCGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC AACAGCGACACCCACTCCACCCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACCTT TCAAGCTCATTTCTGGTATGACAACGAATTTGGCTACAGCAACAGGGTGGTGNNN**

165 AA

**XVIHDFVGLMNTTVHAITAKTKVDGPGSKLWRDGRGALQNIIPASTGAAKAVGKVIPELN GKLTGMAFRVPTANVSVDLTCRLEKPAKYDDIKVVKOASEGPLKILGYTEHQVSSDFNS DTHSSTFDAGAGIALNDHFVKLISWYDNEFGYSNRVVX**

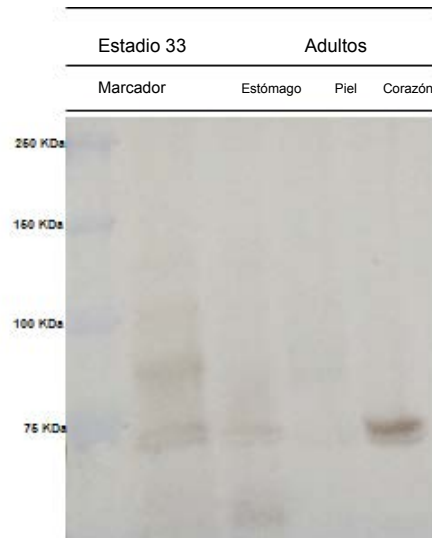
XP_001162023.1	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2 [Pan troglodytes]	337	337	98%	2e-91	UG
XP_001105471.1	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Macaca mulatta]	337	337	98%	2e-91	UG
NP_002037.2	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens] >ref XP_508955.1  PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 5 [Pan troglodytes] >ref XP_001162057.1  PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 3 [Pan troglodytes] >ref XP_001162096.1  PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 4 [Pan troglodytes]	337	337	98%	2e-91	UG
XP_001161823.1	PREDICTED: similar to aging-associated gene 9 protein isoform 1 [Pan troglodytes]	337	337	98%	2e-91	UG
XP_002759728.1	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Callithrix jacchus]	337	337	98%	2e-91	G
NP_001125767.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Pongo abelii]	332	332	98%	7e-90	G
NP_001029206.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Bos taurus] >ref XP_001252512.1  PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like isoform 2 [Bos taurus] >ref XP_002704509.1  PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like [Bos taurus]	324	324	98%	2e-87	G
NP_001127319.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Ovis aries]	323	323	98%	2e-87	G
NP_001166422.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Cavia porcellus]	323	323	98%	4e-87	G
XP_002750648.1	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like [Callithrix jacchus]	323	323	98%	4e-87	G
XP_002708267.1	PREDICTED: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like [Oryctolagus cuniculus]	322	322	98%	5e-87	UG
NP_001009307.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Felis catus]	322	322	98%	7e-87	G
NP_001003142.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Canis lupus familiaris]	322	322	98%	7e-87	UG
XP_001473793.1	PREDICTED: similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) isoform 1 [Mus musculus]	322	322	98%	1e-86	UG
XP_001476773.1	PREDICTED: similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) isoform 3 [Mus musculus]	322	322	98%	1e-86	UG
XP_001473821.1	PREDICTED: similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) isoform 2 [Mus musculus]	322	322	98%	1e-86	UG

**FIGURA 23.** En la imagen superior, secuencia de nucleótidos obtenido por secuenciación del fragmento amplificado por PCR de GAPdH de *R. arenarum* (primers empleados en rosa). En la imagen inferior, secuencia traducida con Chromas Pro1.41 de 165 aminoácidos. Análisis de identidad de la secuencia traducida a partir del fragmento amplificado de la GAPdH de *R. arenarum* con la base de datos del Ref Seq, evidenciándose una identidad del 98% con la GAPdH de *Homo sapiens*.

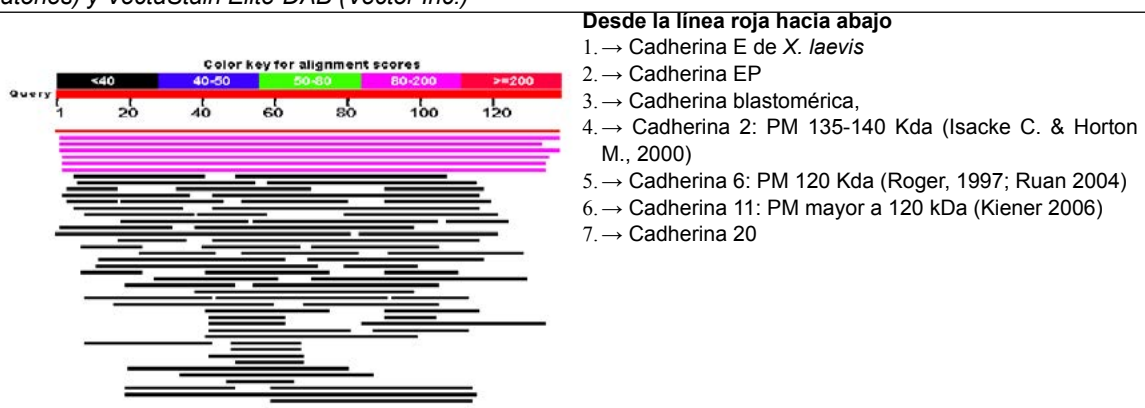
### Análisis de la expresión de cadherina E y $\beta$ -catenina durante el desarrollo metamórfico del tracto digestivo de *Rhinella arenarum*

Si bien en el presente trabajo se detectó el ARNm de cadherina E en estómagos de animales adultos, por *western blotting* cadherina E fue detectada en el estadio 33 de *R. arenarum* (Figuras 9 & 24), por lo que serán necesarios futuros ajustes técnicos tendientes a aumentar la sensibilidad de la detección durante el desarrollo de esta especie.

A nivel proteico, la inmunodetección simultánea de cadherina E con otras proteínas muestran la necesidad de analizar la presencia de otras isoformas de cadherina E. Por ello, para avanzar en este análisis, se realizó un alineamiento local (BLASTp) de la secuencia de aminoácidos reconocida por el Ac monoclonal empleado (735-883aa) con la base de datos de RefSeq de *Xenopus laevis* (Figura 25). Los resultados sugieren la posibilidad de estar inmunodetectando otras cadherinas.

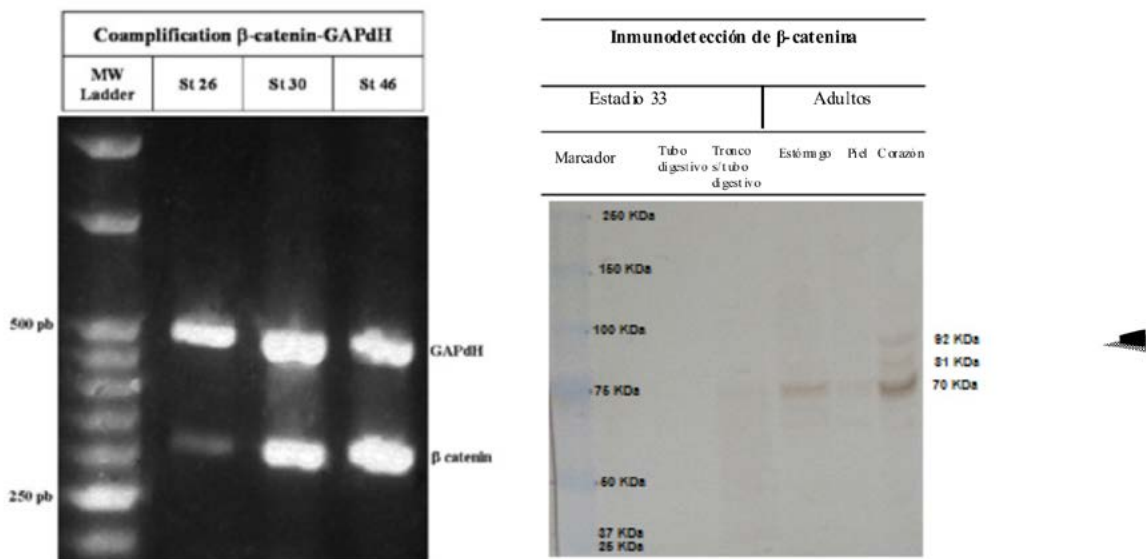


**FIGURA 24.** Expresión de cadherina E en *R. arenarum*, analizada por western blotting. Obsérvese la débil banda de 120 kDa detectada en el estadio 33. Inmunodetección con anti-cadherina E monoclonal (clon 36, Transduction Laboratories) y VectaStain Elite-DAB (Vector Inc.)



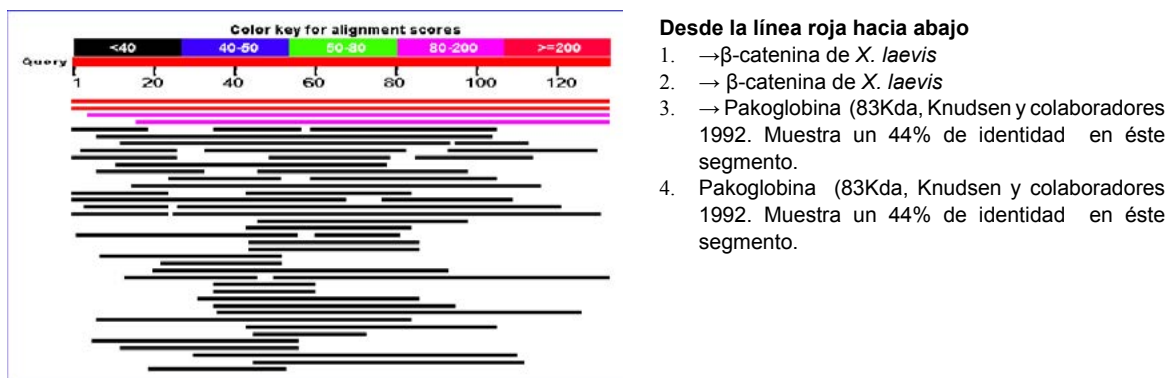
**FIGURA 25.** Alineamiento local con BLASTp de la secuencia de aminoácidos reconocida por el Ac monoclonal empleado (735-883aa) con la base de datos de RefSeq de *Xenopus laevis*.

El análisis de la expresión de los ARNm de  $\beta$ -catenina por qRT-PCR confirma el incremento de expresión de sus proteínas desde el estadio 26 hacia el 46 durante el desarrollo metamórfico del tracto digestivo de *Rhinella arenarum*, obtenido por estudio de IHQ cuantitativa (Figuras 6 & 26a). En contraste, una débil señal de 92 kDa a nivel cardíaco fue detectada por *western blotting*, sugiriendo problemas de sensibilidad. Es interesante resaltar que el patrón de inmunolocalización se estableció empleando un anticuerpo policlonal de conejo, cuyo inmunógeno fue la región N-terminal correspondiente a los residuos 6-138 de  $\beta$ -catenina de *Xenopus laevis* (cortesía de Dr. Pierre McCrea, MD Anderson Cancer Center, University of Texas), demostrando adicionalmente el alto grado de conservación en la secuencia de  $\beta$ -catenina entre vertebrados.



**FIGURA 26.** (a) Expresión de ARNm de  $\beta$ -catenina durante el desarrollo del tracto digestivo de *Rhinella arenarum*. Se verifica un importante incremento desde el estadio 26 al 30. Gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Patrón de PM de 50 pb (Fermentas). (b) Expresión de  $\beta$ -catenina en *R. arenarum*, analizada por western blotting. Obsérvese la banda de 92 kDa detectada a nivel del corazón adulto. Inmunodetección con anti- $\beta$ -catenina policlonal (cortesía del Dr. Pierre McCrea, MD Anderson Cancer Center, University of Texas) y VectaStain Elite-DAB (Vector Inc.)

Al igual que para cadherina E, además de inmunodetectar  $\beta$ -catenina, con el Ac de McCrea también se inmunodetectaron otras proteínas en los extractos, con pesos moleculares por debajo de 92 kDa. Por ello, será necesario investigar a futuro la presencia de otras isoformas. Para avanzar en este análisis, se realizó un alineamiento local (BLASTp) de la secuencia de aminoácidos reconocida por el Ac policlonal empleado (6-138aa) con la base de datos de RefSeq de *Xenopus laevis* (Figura 25).



**FIGURA 25.** Alineamiento local con BLASTp de la secuencia de aminoácidos reconocida por el Ac policlonal empleado (6-138aa) con la base de datos de RefSeq de *Xenopus laevis*.

Los resultados sugieren que el Ac empleado, puede estar reconociendo adicionalmente, plakoglobina de *R. arenarum* a 83 kDa, mientras que la proteína detectada a 70 kDa podría ser una isoforma de  $\beta$ -catenina ó de plakoglobina.

Los trabajos futuros que darán continuidad al presente proyecto estarán encaminados a complementar los hallazgos obtenidos y completar el aislamiento y caracterización de las secuencias completas de los ADNc de *R. arenarum*. También se intentará aumentar la sensibilidad de nuestras técnicas y establecer la ruta del control del sistema cadherina E-cateninas por la actividad de las hormonas tiroideas.

## Bibliografía

- Abascal F, Zardoya R, Posada D 2005. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21:2104-2105.
- 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, 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 a-catenin. *J. Biol. Chem.* 271, 1520-1526.
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A and Kemler R (1997) b-catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *EMBO J.*, 16 (13): 3797–3804.
- Adur JF y Schlegel JO (1997). Diseño, desarrollo y construcción de un sistema de avance micrométrico para microscopios fotónicos. Tesis de Grado (Inédita), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.
- Adur J (2006). Determinación de las propiedades ópticas de un sistema de epifluorescencia y su utilización en estudios de microscopía cuantitativa de 3D. Tesis de Maestría (Inédita). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.
- Adur JF, Diaz-Zamboni JE, Vicente NB, Izaguirre MF, and Casco VH (2007). Digital deconvolution microscopy: development, evaluation and utilization in 3D quantitative studies of E-cadherin expression in skin of *Bufo arenarum* tadpoles. In: *Modern Res. Educational Topics Microsc.* Méndez-Vilas A, Díaz J (eds.). Spain, pp. 906-916.
- Barrington, E. W. (1946). The Delayed Development of the Stomach in the Frog *Rana temporaria* and the Toad *Bufo bufo*. *Zoological Society of London*, 116: 1-21.
- Bhat, M. K.; Parkinson, C.; McPhie, P.; Liang, C. M. and Cheng, S. Y. (1993). Conformational changes of human beta 1 thyroid hormone receptor induced by binding of 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195: 385-392.
- Brown, D. D. (1997). The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94: 13011-13016.
- Chaparro, J. C; Pramuk, J. B. and Gluesenkamp, A. G. (2007). A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica*, 63: 203-212.
- Choi Y S, Sehgal R, McCrear 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.
- Derby, A. (1970). Inhibition of thyroxine-induced tail resorption in vitro by pituitary grafts from different stages of metamorphosis. *J. Exp. Zool.*, 17: 319-328.
- Diaz-Zamboni JE (2004). Software para usuarios de microscopios de desconvolución digital. Tesis de Grado (Inédito), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina.
- Diaz-Zamboni JE, Paravani EV, Adur JF, and Casco VH (2007). Implementation of an iterative deconvolution algorithm and its evaluation on three-dimensional images of fluorescence microscopy. *Acta Microsc.* 16: 8-15.
- Diaz-Zamboni JE, Adur JF, Vicente N, Fiorucci MP, Izaguirre MF, and Casco VH (2008). 3D automatic quantification applied to optically sectioned images to improve microscopy analysis. *Eur J Histochem.* 52: 115-126.
- Dodd, M. H. I. and Dodd, J. M. (1976). The biology of metamorphosis. In "Physiology of the Amphibia", B. Lofts (Ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599.
- Etkin, W. (1968). Hormonal control of amphibian metamorphosis. In *Metamorphosis, a Problem in Developmental Biology*, W. Etkin and L. I. Gilbert (Eds.), Appleton, New York, pp. 313-348.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE 1999 Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotech* 26:112-22, 124-5.

- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itou, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., and Kaibuchi, K. (1999) Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of the interaction of IQGAP1 and b-catenin. *J. Biol. Chem.*, 274, (37), 26044-26050.
- Galetto C. D.; Izaguirre, M. F.; Bessone, V. & Casco, V. H. (2012) Isolation and nucleotide analysis sequence of the of *Rhinella arenarum*  $\beta$ -catenin: An mRNA and protein expression study during the larval stages of the digestive tract development. *Gene* 511, 256-264.
- Galton, V. A. (1984). Putative nuclear triiodothyronine receptors in tadpole erythrocytes: regulation of receptor number by thyroid hormone. *Endocrinology*, 114: 735-742.
- Galton, V. A. and St. Germain, D. L. (1985). Putative nuclear triiodothyronine receptors in tadpole erythrocytes during metamorphic climax. *Endocrinology*, 116: 99-104.
- Galton, V. A. (1989). The role of 3,5,3'-triiodothyronine in the physiological action of thyroxine in the premetamorphic tadpole. *Endocrinology*, 124: 2427-2433.
- Ge X., Jin Q., Zhang F., Yan T., and Zhai Q. (2009) PCAF Acetylates  $\alpha$ -catenin and improves its stability. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 20, 419-427.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183-190.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696-704.
- Gumbiner BM 2000. Regulation of Cadherin Adhesive Activity. *J Cell Biol.* 148: 399-403.
- Hasenahuer MA, Casco VH and Izaguirre MF. (2013) New footprints into metazoan C-1 family cadherin evolution. *Online Journal of Bioinformatics*, 14 (1): 76-95.
- Hu, P., O'Keefe E. J., and Rubinstein D. S. (2001) Tyrosine phosphorylation of human keratinocyte b-catenin and plakoglobin reversibly regulates their binding to E-cadherin and b-catenin. *J. Invest. Dermatol.* 117:1059-1067.
- 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. and Weis, W. I. (2001) The structure of the b-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by b-catenin. *Cell* 105, 391-402.
- Hulpiau P, van Roy F 2009 Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(2):349-69.
- Hulsken, J., Birchmeier, W. and Behrens, J. (1994) E-cadherin and APC compete for the interaction with  $\beta$ -catenin and the cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, Volume 127, Number 6, Part 2, 2061-2069.
- Isacke CM and Horton MA (2000). *The adhesion molecule.* Academic press USA. ISBN 0-12-356505-7 149-210.
- Izaguirre, F; Peralta Soler, A.; Lajmanovich, R. and Casco, V. H. (2001b).  $\alpha$ -Catenin expression in the digestive tract of metamorphosing *Hyla nana* tadpoles (Anura, Hylidae): an immunohistochemical study. *Amphibia-Reptilia*, 22: 256-261.
- Izaguirre, M. F.; García-Sancho, M. N.; Miranda, L. A.; Tomas, J.; Casco, V. H. (2008). Influence of thyroid hormones on the expression of cell adhesion molecules in the developing kidney of *Bufo arenarum* tadpoles. *Brazilian Journal of Biology*, 68 (3): 631-637.
- Izaguirre MF, Casco VH (2010). T3 regulates E-cadherin, and  $\beta$ - and  $\alpha$ -catenin expression in stomach during metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum*. *Biotech. Histochem* 85: 305-323.
- Izaguirre, M. F.; Larrea, D.; Adur, J. F.; Diaz-Zamboni, J. E.; Vicente, N.; Galetto, C. D. and Casco, V. H. (2010). E-cadherin role in epithelial architecture maintenance. *Cell Communication and Adhesion*, 17 (1): 1-12.
- Jung R, Wendeler MW, Danevad M, Himmelbauer H, Gessner R 2004 Phylogenetic origin of LI-cadherin revealed by protein and gene structure analysis. *Cell Mol Life Sci* 10:1157-66.
- Kawahara, A.; Baker, B. S. and Tata, J. R. (1991). Developmental and regional expression of thyroid hormone receptor genes during *Xenopus* metamorphosis. *Development*, 112: 933-943.
- Kiener H P, Lee DM, Agarwal SK and Brenner B. (2006) Cadherin-11 induces rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes to form lining layers in vitro. *American Journal of Pathology*, Vol. 168, No. 5.

- Knudsen KA and Wheelock MJ. (1992) Plakoglobin, or an 83-kD Homologue from beta catenin, Interacts with E-cadherin and N-cadherin. *The Journal of Cell Biology*, Volume 118, Number 3, 671-679.
- Leloup, J. and Buscaglia, M. (1977). La triiodothyronine: hormone de la métamorphose des amphibiens. *C. R. Acad. Sci.*, 284: 2261-2263.
- McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. (1991) A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*, 254: 1359-61.
- Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV 2008 Both  $\beta$ -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *The Prostate* 68: 1555-1560.
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM. 1996 Structural basis of calcium-induced Ecadherin rigidification and dimerization. *Nature* 380:360-4.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1956). Normal table of *Xenopus laevis*. North Holland Publishing, Amsterdam.
- Pai, L. M., Kirkpatrick, C., Blanton, J., Oda, H., Takeichi, M. and Peifer, M. (1996) *Drosophila*  $\beta$ -catenin and E-cadherin bind to distinct regions of *Drosophila* armadillo. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 271-50, 32411-32420.
- Peltzer PM, Lajmanovich RC, Sanchez LC, Attademo AM, Junges CM, Bionda CL, Martino AL and Bassó A (2011). Morphological abnormalities in amphibian populations from the mid-eastern region of Argentina. *Herpetological Conservation and Biology* 6(3): in press.
- Piedra J., Miravet S., Castano J., Palmer H.G., Heisterkamp N., Garcia de Herreros A., Dunach M. (2003). p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate  $\beta$ -catenin Tyr-142 phosphorylation and b-catenin a-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 23: 2287-2297.
- Pokutta S, Weis WI. (2000). Structure of the dimerization and b-catenin-binding region of a-catenin. *Mol Cell*, 533-543.
- Regard, E. (1978). Cytophysiology of the amphibian thyroid gland through larval development and metamorphosis. *Int. Rev. Cytol.*, 52: 81-118.
- Roger P, Ewing CM, Robinson JC, Marshall FF, Johnson KR, Wheelock MJ and Isaacs WB (1997). Cadherin-6, a Cell Adhesion Molecule Specifically Expressed in the Proximal Renal Tubule and Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 57: 2741-2748.
- Rosenkilde, P. and Ussing, A. P. (1996). What mechanisms control neoteny and regulate induced metamorphosis in urodeles. *Int. J. Dev. Biol.*, 40: 665-673.
- Roura, S., Miravet S., Piedra J., García de Herreros A., and Dunach. M. (1999) Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274:36734-36740.
- Ruan G (2004). Function of *Xenopus* Cadherin-6 in Neural Development. Doctoral Thesis, School of Chemistry and Biological Sciences, Karlsruhe University, Germany.
- Saxen, L.; Saxen, E.; Toivonen, S. and Salimaki, K. (1957a). Quantitative investigation on the anterior pituitary-thyroid mechanism during frog metamorphosis. *Endocrinology*, 61: 35-44.
- Saxen, L.; Saxen, E.; Toivonen, S. and Salimaki, K. (1957b). The anterior pituitary and the thyroid function during normal and abnormal development of the frog. *Ann. Zool. Soc. Zool. Bot. Fenn.*, 18: 1-44.
- Shi, Y. B.; Wong, J. and Puzianowska-Kuznicka, M. (1996). Thyroid hormone receptors: mechanisms of transcriptional regulation and roles during frog development. *J. Biomed. Sci.*, 3: 307-318.
- Shi (2000). *Amphibian Metamorphosis*, Wiley-Liss, John Wiley & Sons, Inc. (Eds.), New York, pp. 1-14.
- Stearns, S. C. (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *Bioscience*, 39: 436-445.
- 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 London B.* 355: 885-890.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* (submitted).

- Tata, J. R. (1968). Early metamorphic competence of *Xenopus* larvae. *Develop. Biol.*, 18: 415-440.
- Tata, J. R. (1996). Metamorphosis. In *Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*, L. I. Gilbert; J. R. Tata and B. G. Atkinson (Eds.), Academic Press, San Diego, 465-503.
- Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Günzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM (2005). E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J.*, 24: 1146-1156.
- White, B. A. and Nicoll, C. S. (1981). Hormonal control of amphibian metamorphosis. In *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology*, L. I. Gilbert and E. Frieden (Eds.), Plenum Press, New York, pp 363-396.;
- 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.
- 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.
- Xing Y., Ken-Ichi Takemaru K. I., Liu J., Berndt J. D., Zheng J.J., Moon R.T and Xu1 W. (2007) Crystal Structure of a Full-Length b-Catenin. *Structure* 16, 478–487.
- Yaoita, Y. and Brown, D. D. (1990). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Gene Develop.*, 4: 1917-1924.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13:134 .