

## El rol de las hormonas tiroideas sobre la expresión de cadherinas-cateninas en el cáncer de colon: alternativas terapéuticas

Izaguirre María Fernanda; Galetto, Carolina D.; Adur, Javier F.; Casco, Víctor H.

AUTORES: Facultad de Ingeniería; Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina. Ruta 11, km 10,5, Oro Verde, Entre Ríos, Argentina

ARK: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/erv2ntua8>

Contacto: [fernanda.izaguirre@uner.edu.ar](mailto:fernanda.izaguirre@uner.edu.ar) y/o [victor.casco@uner.edu.ar](mailto:victor.casco@uner.edu.ar)

### INTRODUCCIÓN

El cáncer colo-rectal (CCR) es la cuarta y tercera causa de muerte en el mundo y en Argentina, respectivamente (OMS, 2008; MINCyT, 2014). Por ello, el diagnóstico temprano y nuevas formas de tratamiento resultan esenciales para controlar la morbi-mortalidad de la enfermedad.

La molécula de adhesión intercelular E-cadherina y su molécula conectora al citoesqueleto de actina,  $\beta$ -catenina, son críticas en las transformaciones epitelio-mesénquima y en el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas colo-rectales. Por estas razones, el control de su expresión y actividad son claves en la regulación de proliferación, diferenciación, movilidad y agresividad de las células tumorales (Izaguirre y col. 2018; 2019).

Un número creciente de evidencias, sugieren el rol crítico de la señalización de las hormonas tiroideas (HTs) en el crecimiento y la homeostasis del sistema digestivo de vertebrados. Se ha demostrado que tanto el hiper- como el hipotiroidismo pueden constituir un factor de riesgo que promueve el desarrollo de CCR (L'Heureux y col., 2019), mostrando la intrincada influencia de las HTs en el control de esta patología. Este aparente rol crítico de la señalización de las HTs en el crecimiento y la homeostasis del sistema digestivo de vertebrados ha conducido a que numerosas líneas de investigación analicen su rol en la ocurrencia y progresión de los diferentes cánceres del aparato digestivo (Brown y col., 2013; Krasnin y col., 2019). A su vez, se trabaja a nivel mundial, en la implementación de una medicina translacional en la que se aplique quimioprevención al emplear tratamientos a largo plazo con agentes orales para retardar, prevenir o aún revertir el desarrollo de adenomas de colon.

Empleando modelos de anuros en desarrollo, cuya metamorfosis es altamente dependiente de las HTs, investigaciones de nuestro grupo demostraron que en estado fisiológico, los genes codificantes de E-cadherina y sus moléculas conectoras al citoesqueleto de actina  $\beta$  y  $\alpha$ -catenina, son genes de respuesta directa a la hormona 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3) (Izaguirre, 2003; Izaguirre y Casco, 2010; Galetto, 2016; Galetto y col., 2017).

A su vez, se encontró que el epitelio premetamórfico es reemplazado por epitelio posmetamórfico, concluyéndose que se producen intensos procesos de apoptosis, proliferación y diferenciación durante la remodelación metamórfica. Estos eventos involucran procesos de desensamblaje-reensamblaje de los contactos intercelulares y de las células con la matriz extracelular. Los cambios en la frecuencia de los tipos de uniones intercelulares se correlacionan con la remodelación de la barrera epitelial mediada por T3. Durante estos procesos se evidencia un significativo aumento de E-cadherina junto a Rap1 (pequeña proteína G Ras-like), mientras que el aumento de ocludina de uniones estrechas (TJs) es mínimo (Galetto y col., 2017; Izaguirre y col., 2018).

Li y col., (2010) han demostrado que Rap1 y E-cadherina exhiben interacciones funcionales, regulando la autorrenovación de células madre humanas (*human embryonic stem cells*, hESCs). Rap1 influencia indirectamente la pluripotencia de estas células, actuando sobre la vía de reciclaje endocítico involucrada en la formación y mantenimiento de la cohesión intercelular mediada por E-cadherina, la cual sería esencial para la formación de la colonia de células madre y su autorrenovación. En anuros, se postula que las células madre del epitelio adulto se originan del epitelio larval, cuando las células epiteliales larvales maduras se desdiferencian en células madre. Estos procesos serían inducidos directamente por las hormonas tiroideas y/o indirectamente a través del nicho de células madre formadas en la presencia de estas HTs (Izaguirre y Casco, 2016).

Analizando particularmente algunas proteínas pequeñas de unión a GTP (RhoA, Rac1, Cdc42 y Rap1), que guían la reorganización del citoesqueleto de actina y de los complejos adhesivos apicales, se encontró que los niveles de expresión de los genes *RAC1* y *RAP1* son fuertemente aumentados por T3 durante la remodelación metamórfica del tubo digestivo de *Xenopus laevis*. Mientras Rac1 principalmente media la reorganización de actina a las 24 h del tratamiento con T3 exógena, Rap1 lo hace recién a los 5 días del tratamiento con T3, coincidente con el clímax metamórfico. La transcripción de *RHOA* fue reprimida a los 5 días del tratamiento, mientras que la expresión de *CDC42* no se modificó significativamente por T3 (Galetto y col., 2017).

Otros autores, trabajando con modelos murinos, han arribado a conclusiones similares, proponiendo importantes roles en diferenciación versus proliferación celular y metástasis para estas moléculas. En ratones se ha demostrado el control génico directo de T3 sobre el gen de  $\beta$ -catenina (Plateroti y col., 2006; Sirakov y Plateroti, 2011), mientras que el control de la expresión superficial de E-cadherina sería mediado por el complejo formado por la unión de T3 a su receptor nuclear beta1 (T3-TR $\beta$ 1) y el secuestro concomitante de  $\beta$ -catenina en los contactos adhesivos, disminuyendo su translocalización al núcleo y la activación de genes involucrados en la proliferación celular y metástasis. Adicionalmente, se ha demostrado que la inactivación de la desiodinasa 3 (Dio3) inactivante de T3, promueve la diferenciación y disminuye la proliferación celular (Dentice y col., 2012).

Así, este conjunto de datos posibilitó hipotetizar que la progresión tisular a un estado patológico hiperplásico e invasivo, involucraría la disminución o deslocalización de E-cadherina y translocalización nuclear de  $\beta$ -catenina, la cual activaría genes involucrados en proliferación celular y metástasis (Ozawa y col., 1990; Takeichi, 1991; Pokutta y col., 1994; Pertz y col., 1999; Luber y col., 2000; Simões-Correia y col., 2008). A su vez, los adenomas y carcinomas de colon evidencian una expresión aumentada de Dio3 (Kester y col., 2006; Dentice y col., 2012), lo que la torna un blanco local terapéutico de gran interés.

Con el fin de investigar el rol que ejercen las HTs sobre el sistema cadherinas-cateninas en el desarrollo y progresión tumoral de mamíferos, se diseñó un modelo experimental murino que contemplase el desarrollo de cáncer de colon en un período breve de tiempo y que reprodujese de manera similar el desarrollo del CCR humano (Tanaka, 2009; Bianchi y col., 2013; 2014). En paralelo a la inducción del CCR, algunos grupos de estos animales fueron sometidos al tratamiento hormonal oral con dosis de levotiroxina (L-T4), empleando los fármacos utilizados para el tratamiento del hipotiroidismo humano.

Entre las hipótesis de trabajo, se planteó que los niveles fisiológicos de la hormona tiroidea activa (T3) tanto extra- como intracelularmente regulan el estado de diferenciación del epitelio, aumentando la expresión y función de E-cadherina y disminuyendo por diferentes mecanismos la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina que promueve los procesos de proliferación celular.

Entre los antecedentes del tema se conoce que, la glándula tiroides secreta a la circulación sanguínea más pro-hormona tiroxina (T4) que T3 activa, siendo T4 activada a T3 en la circulación y en el interior celular, o bien desactivadas a T3 reversa (rT3) o a biyodotironina (T2), por la acción de diferentes desiodinasas (Dio). Intracelularmente, T3 y sus receptores (RTs) actuarán transcripcionalmente, modificando la expresión de genes blanco. Sin embargo, hoy se sabe que adicionalmente, los niveles de T4 circulante

son capaces de activar una ruta de señalización proliferante, empleando como receptor de membrana plasmática la integrina  $\alpha\beta3$  y activando la vía del factor angiogénico HIF-1 $\alpha$  (Izaguirre y col., 2018; 2019). Por lo tanto, la inactivación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina así como la de desiodinasa III (Dio3) y/o el receptor  $\alpha\beta3$ -integrina, emergen como interesantes blancos terapéuticos para el tratamiento del CCR.

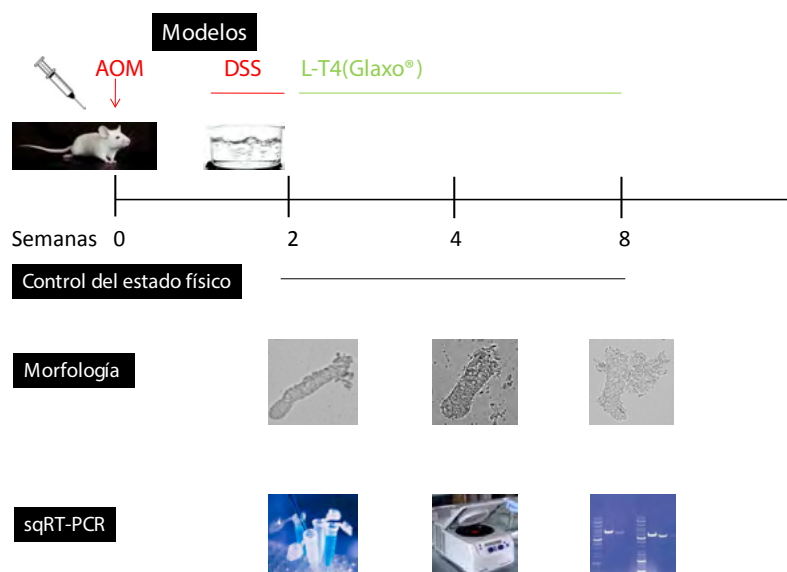
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se emplearon ratones macho adultos (*Mus musculus*) de la cepa BALB/c de 8 semanas de vida, que fueron adquiridos a las 6 semanas de edad en el Centro de Medicina Comparada (FCV-UNL-CONICET) y aclimatados y mantenidos en condiciones óptimas en el Bioterio de la Facultad de Ingeniería de la UNER, siguiendo las normativas de los Comités de Ética internacionales y de la UNER.

### Desarrollo del CCR y tratamiento hormonal con levotiroxina (L-T4)

El desarrollo del cáncer colo-rectal (CCR) fue inducido en ratones de 8 semanas de edad y de 20 a 30 g de peso (n=5 o n=6 por cada punto experimental), con una inyección intraperitoneal de azoximetano (AOM) (10 mg/Kg) al inicio del experimento (t=0). A la semana de la inyección, se les suministró sulfato sódico de dextrano (DSS) (2% p/vol) en el agua de bebida durante 7 días. La inducción y el seguimiento se realizaron de acuerdo con Corpet y Pierre (2003); Tanaka (2009) y Bianchi y col. (2013, 2014) (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema que representa los modelos experimentales implementados y los estudios realizados para evaluar cada uno de los puntos experimentales. Los animales fueron sacrificados y estudiados: (I) previo a tratamientos (control t0), (II) a las 2, 4 y 8 semanas de la aplicación de tratamientos (AOM+DSS y AOM+DSS+L-T4). El colon fue disecado y sus criptas aisladas, analizadas y seccionadas ópticamente por microscopía de campo amplio. En segmentos seriados del colon se realizaron RT-sqPCR- para analizar la expresión de 20 moléculas de interés.

En paralelo, algunos grupos de animales fueron simultáneamente tratados oralmente con L-T4. El efecto de las HTs sobre el desarrollo tumoral fue analizado en grupos de ratones tratados con AOM+DSS, a los que se les suministró levo (L)-tiroxina comercial (Glaxo®) (L-T4) durante 3 o 7 semanas a una concentración de 0,2  $\mu$ g/Kg de peso (Iishi y col., 1993), siguiendo las recomendaciones de Zhang (2011). Los animales fueron sacrificados y analizados cumplidas las semanas 4 y 8, posinyección (Figura 1).

Para la realización de los estudios morfométricos y moleculares, los ratones de cada punto experimental fueron sacrificados por dislocación cervical. En cada animal fueron disecados 2,5 cm del colon distal, la materia fecal eliminada y lavado profusamente en PBS 1X frío. Cada segmento del colon fue subdividido en segmentos de menor tamaño, (I) congelado en N<sub>2</sub> líquido para extracción de ARN total, (II) fijado en Carnoy para los estudios de inmunofluorescencia y (III) sumergidos, en solución de disgregación para aislar criptas, que se fijaron en paraformaldehído. Toda la manipulación de los segmentos de colon fue realizada en soluciones frías. Para los estudios morfológicos y de inmunohistoquímica el material fue fijado durante 2 hs. a temperatura ambiente y almacenado a 4 °C hasta su uso (Figura 1).

### **Evaluación anátomo-patológica del colon distal**

El análisis morfológico del colon distal fue realizado empleando un protocolo de aislamiento de criptas de colon distal y evaluación microscópica de criptas individuales (Figura 1) de acuerdo a Tan y col. (2013) con modificaciones.

Para el aislamiento de criptas, el colon fue incubado con 500 µl de solución de disgregación fresca (9 mM EDTA + 300 mM β-mercaptoetanol en PBS 1X), durante 30 min a 4°C. Descartado el sobrenadante, el tejido fue lavado con PBS frío. El sobrenadante fue descartado, adicionándose 500 µl de PBS frío con agitación vigorosa se aislaron criptas, que se concentraron por centrifugación por 5 min a 34 g. El sobrenadante fue descartado y las criptas fijadas en 50 µl de Karnovsky 2% durante 2 hs a temperatura ambiente. Las criptas fueron montadas en 1 gota de la suspensión entre porta- y cubreobjetos. Las imágenes fueron observadas y registradas con el microscopio Olympus IX83, provisto de una cámara digital Hamamtsu ORCA-FLASH 2.8 y procesadas con el software *cellSens Dimension*.

El efecto proliferativo inducido por AOM+DSS y el efecto pro-diferenciante de L-T4, fue evaluado por morfometría de las criptas del colon distal. Para ello, fueron registrados la longitud del eje ápico-basal y el diámetro de cada cripta, utilizando el software ImageJ 1.51 (NIH, USA).

### **Análisis molecular de la progresión tumoral y del tratamiento con L-T4**

Para evaluar las cascadas de señalización involucradas en los estadios temprano y avanzado del desarrollo CCR murino y el efecto del tratamiento hormonal con L-T4, se aplicaron técnicas cuantitativas de biología molecular que dieran cuenta de la expresión de los genes de las principales moléculas involucradas en la cascada de señalización HTs—E-cadherina—cateninas, así como indicadores del estado tumoral (Tabla 1).

Para ello, se extrajeron los ARN totales de las muestras guardadas en N<sub>2</sub> líquido y se aplicó sqPCR-. Se analizaron moléculas involucradas en la vía de señalización HTs—E-cadherina—cateninas: E-cadherina, β-catenina, α-catenina, p120-catenina y β-actina; moléculas involucradas en la remodelación del citoesqueleto y las uniones adherentes, tal como pequeñas GTPasas (Rap, Cdc42, Rac1, Rho); mediadores de la función tiroidea (RTα, RTβ, desiodinasas Dio1, Dio2 y Dio3). A su vez, se evaluó la expresión de los marcadores de proliferación celular ciclina D1 y PCNA, los marcadores de diferenciación de linaje intestinal isomaltasa-sacarasa y fosfatasa alcalina (Dentice y col., 2012) y la expresión de mediadores de agresividad tumoral (Baba y col., 2010; Dentice y col., 2013), tal como el receptor integrina α53 modulado principalmente por T4 (Davis y col., 2008) y el factor de transcripción angiogénico HIF1A (subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia).

Como indicadores moleculares de progresión tumoral se consideraron los aumentos en la expresión de Dio3, β-catenina y HIF1A, así como la disminución de E-cadherina (Dentice y Salvatore, 2011; Baba y col., 2010; Dentice y col., 2013; Izaguirre y col., 2019). En el estudio fueron analizados los perfiles de expresión de 20 moléculas (Tabla 1).

La cuantificación de la expresión génica por sqRT-PCR, fue realizada de acuerdo con la metodología implementada por Galetto y col. (2017). Los ARN totales del colon distal de cada uno de los 5 o 6 rato-

nes por punto experimental, fueron aislados con columnas del *GeneJET kit* (Thermo Scientific, Vilnius, Lituania).

Posteriormente, el tejido fue resuspendido en 50  $\mu$ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La calidad de ARN fue chequeada por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y la concentración y pureza fueron medidos por espectrometría UV a 260 y 280 nm, respectivamente. Las moléculas de ADN copia (cDNA) fueron obtenidas a partir de 5  $\mu$ g de ARN total, empleando un kit de retrotranscripción (RT) (Thermo Scientific Inc., Maryland, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR fueron realizadas a partir de 2,5  $\mu$ l de cDNA, 1  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos específicos de los ADNc amplificados (Tabla 1), 0,8 mM dNTPs y ADN polimerasa (Fermentas International Inc., Vilnius, Lituania) hasta un volumen final de 25  $\mu$ l. Los ciclos de PCRs se iniciaron calentando a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min y se corrieron 30 ciclos de: desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 seg, hibridación a  $58^{\circ}\text{C}$  (dependiendo del oligonucleótido) por 35 seg, elongación a  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 min y elongación final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Como control interno fue empleado ARNm de microglobulina  $2\beta$  (M2 $\beta$ ) de expresión constitutiva en colon murino (Dydensborg y col., 2006; Kheirleiseid y col., 2010).

Los *primers* fueron diseñados en base a las secuencias depositadas en el GenBank y chequeadas para corroborar que no existieran amplicones de auto- o heterodímeros o estructuras secundarias (Tabla 1). Los niveles de ARNm del colon murino distal fueron establecidos por coamplificación de cada gen de interés con B2M, y visualizados en geles de agarosa al 2,5%, teñidos con bromuro de etidio. Las bandas de ADNc fueron visualizadas en un transiluminador UV Spectroline TE-312S (Spectronics Corporation, Westbury, NY) y registradas con una cámara digital.

<b>Tabla 1. Lista de primers empleados para cuantificación de ARNm de <i>Mus musculus</i></b>				
Molécula	primer	Tm IDT	Longitud	Tamaño pto
B2M (control interno)	CCGCCTCACATTGAAATCCAAATG	60	24	579
	CACAGTGACAGACTTCAATTAGGC	60	24	
Marcadores de uniones adherentes				
E-cadherina	ACGGAGGAGAACGGTGGTCA	60	20	264
	TCGCTGCCTTCAGGTTTTCA	60	21	
-catenina	TGGCCTCTGATAAAGGCAACTG	60	22	373
	CAGCCTCCTTGCTCTGAGCA	60	20	
-catenina	TGAGTTCATCGACGCCTCCC	60	20	480
	TCTGGGCAATGGTCTGCGAT	60	20	
p-120 catenina	GTGGTTCTCCAGAGGGAAAAAGC	59	23	297
	ACTCGCTCATGCTCACTCGT	59	20	
b actina	CAGCCTCCTTCTGGGTATGGA	59	23	362
	GCAGCTCAGTAACAGTCCGC	59	20	
Marcadores de regulación de la organización del citoesqueleto y uniones adherentes				
Rap1	ACACTGCAGGAACCGAGCAAT	60	21	405
	GCTGCTGCTGACTTCAGGTCT	60	21	
Cdc42	GTGAAAGAAAAGTGGGTGCCTGA	58	23	285
	CCTGCGGCTCTTCTTCGGTT	60	20	
Rac1	AGG GGC AAA GAC AAG CCG AT	60	20	254
	ACAGCACCGATCTCTTTCGC	58	20	
RhoA	GTGGCGGATATCGAGGTGGA	59	20	299
	TCAGGTTTTACCGCTCCTGC	60	21	

Marcadores de señalización tiroidea				
RTa	GCTGCTAATGTCAACAGACCGC		22	269
	GCGGACCCTGAACAACATGC		20	
RTb var 1 y 2	GCTAATGTCTTCAGATCGCCCAG	58	23	211
	GGGGCACTCCACCTTCATGT	60	20	
Dio1	GCC TCC ACA GCC GAT TTC CT	60	20	264
	GCCAGCTTTACCCTTGTAGCA	58	21	
Dio2	CTCCTAGATGCCTACAAACAGGTTA	56	25	360
	GTCCTCTTGTTCCGGTGCT	60	20	
Dio3	CACAGCTCGGACTTGTGGC	59	20	331
	GGAACCCAGAGCACTCTCCC	60	20	
Marcadores de proliferación celular				
PCNA	TGAACCTCACCAGCATGTCCA	59	21	226
	GCAAATTCACCCGACGGCAT	59	20	
Ciclina D1	TCATCAAGTGTGACCCGGACTG	59	22	217
	CCACTACTGGTGGCTCCCG	60	20	
Marcadores de diferenciación celular				
Isomaltasa-sacarasa	GGATTCCAATATGTGCGTTATGG	54	23	400
	CTCTGGAAGCGTTAACAGCTTC	56	22	
Fosfatasa alcalina intestinal	TGCAAGGACATCGCCACTCA	59	20	193
	CATACCGGGCTCCCTGATGC	60	20	
Marcadores de agresividad tumoral				
Integrina av	ACGTCCTCTACAAGCTCGGC	59	20	319
	CCATCCACGAGAGGGCATGT	60	20	
HIF1A	TAGGATGAGTTCTGAACGTCGAAA	56	24	206
	TGTCTAGACCACCGGCATCC	59	20	

La intensidad de las bandas de ADNc de cada calle del gel, fueron cuantificadas con el software ImageJ y calculados sus coeficientes de intensidad. Los valores de los animales del grupo control fueron considerados arbitrariamente como 1.

En ratones, los genes *CTNNB1* y *THRB* son genes de respuesta directa a la hormona T3, por lo que pueden emplearse como controles regulatorios positivos si su expresión aumenta (Plateroti y col., 2006; Sirakov y col., 2011, 2012).

### Análisis estadístico

Se analizaron uno de los bioensayos, cada una conformada por el colon distal proveniente de ratones control al t0, ratones tratados con AOM+DSS de 4 y 8 semanas de desarrollo y ratones tratados con AOM+DSS+L-T4 (tumoral tratado con L-T4) de 4 y 8 semanas de tratamiento.

Las diferencias de medias de longitud y diámetro de las criptas fue realizado con el Software GraphPad Instat® 3.10, aplicando un análisis múltiple ANOVA de una vía, con un test de Tukey-Kramer a posteriori.

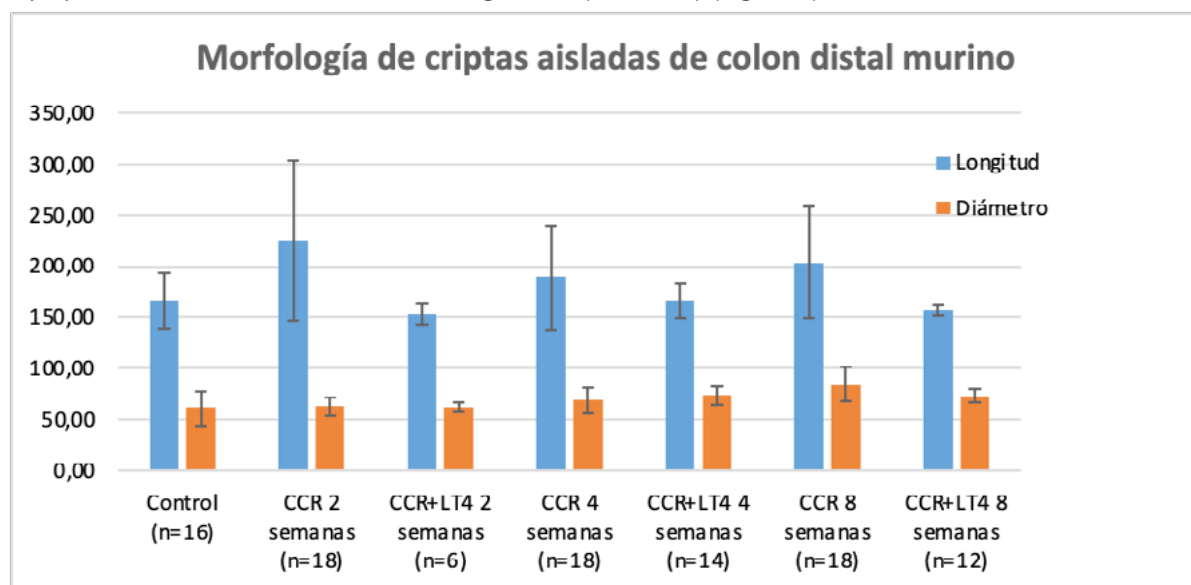
Las diferencias de expresión molecular mayores al 50% (control vs tratados) fueron considerados fisiológicamente significativas (Buchholz y col., 2007; Fay y Gerow 2013). Las diferencias entre medias fueron evaluadas de acuerdo con Fay y Gerow (2013). Los valores de abundancia de transcritos fueron empleados para calcular intervalos de 95% de confianza (CIs), para cada tasa de ARNm problema/ARNm

control t0. Los datos se muestran como gráficos de barra en los que se representan intervalos de 95% de confianza (CIs) de la expresión de genes diana de los animales tratados versus animales control a t0 (cada nivel de expresión a su vez se calculó relativo al gen *B2M* de referencia). Debido a que algunos genes bajo evaluación fueron indetectables durante los bioensayos (enzima isomaltasa-sacarasa), los CIs fueron representados relativos a un valor arbitrario de (1), considerado el valor de inicio de los bioensayos, siguiendo el método aplicado por Galetto y col. (2017).

## RESULTADOS

### Morfología de las criptas del colon distal durante la progresión tumoral

Para evaluar el efecto proliferativo y displásico inducido por AOM+DSS, así como el efecto del tratamiento con L-T4 durante la progresión tumoral, se registraron medidas de la longitud del eje ápico-basal y del diámetro de cada cripta aislada, a partir de las imágenes digitales obtenidas con el microscopio Olympus IX83, utilizando el software ImageJ 1.51 (NIH, USA) (Figura 3).



**Figura 3.** Gráfica de barras que representa las variaciones en la longitud y diámetro de las criptas, en los diferentes puntos y réplicas experimentales. Las diferencias entre media fueron consideradas no significativas.

La evaluación histológica del colon distal reprodujo el tiempo de aparición, número y tipo de tumores de colon distal en las réplicas realizadas y la morfología de las criptas individuales (Figura 4).

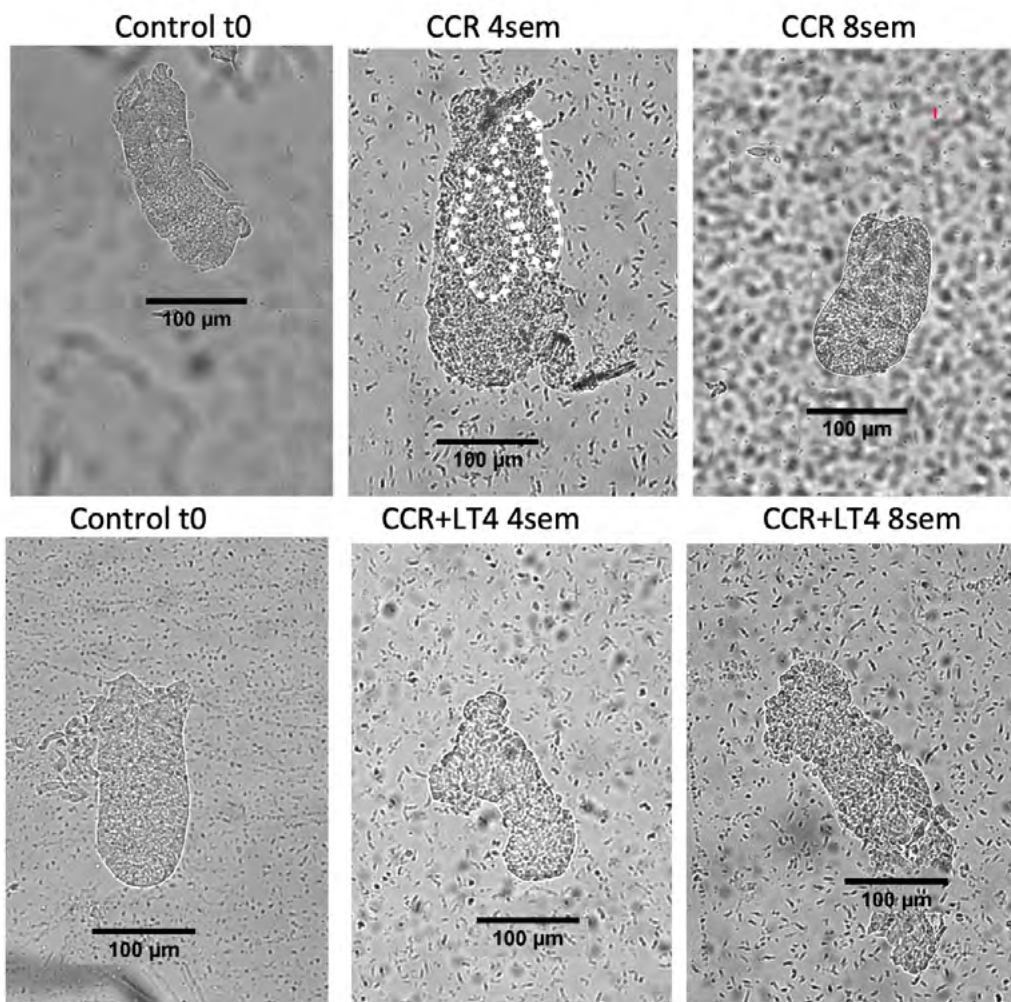
El análisis estadístico de comparaciones múltiples de medias de Tukey-Kramer no mostró diferencias significativas de los cambios de longitud, aunque se observó una tendencia de aumento del eje ápico-basal con el progreso del CCR en el tiempo (Figura 3). En cuanto al diámetro de las criptas del colon distal, el comportamiento observado fue similar que el de la longitud, aunque la magnitud del aumento fue menor. A diferencia de la longitud, la cual fue máxima a las 2 semanas de los bioensayos, la tendencia de aumento del diámetro fue máxima a las 8 semanas de desarrollo del CCR.

El tratamiento hormonal con L-T4 no provocó variaciones significativas de longitud y diámetro y la incidencia fue mayor en la longitud que en el diámetro. Sin embargo, puede observarse una tendencia al descenso en la longitud del eje ápico basal y una notable disminución en la variabilidad de los datos. Esta tendencia fue muy inferior en el diámetro y solo pudo detectarse un ligero descenso en la 8<sup>va</sup> semana de tratamiento.



### Análisis molecular durante la progresión tumoral

Los niveles de expresión de todas las moléculas evaluadas fueron registrados y analizados en segmentos completos del colon distal de los diferentes puntos experimentales



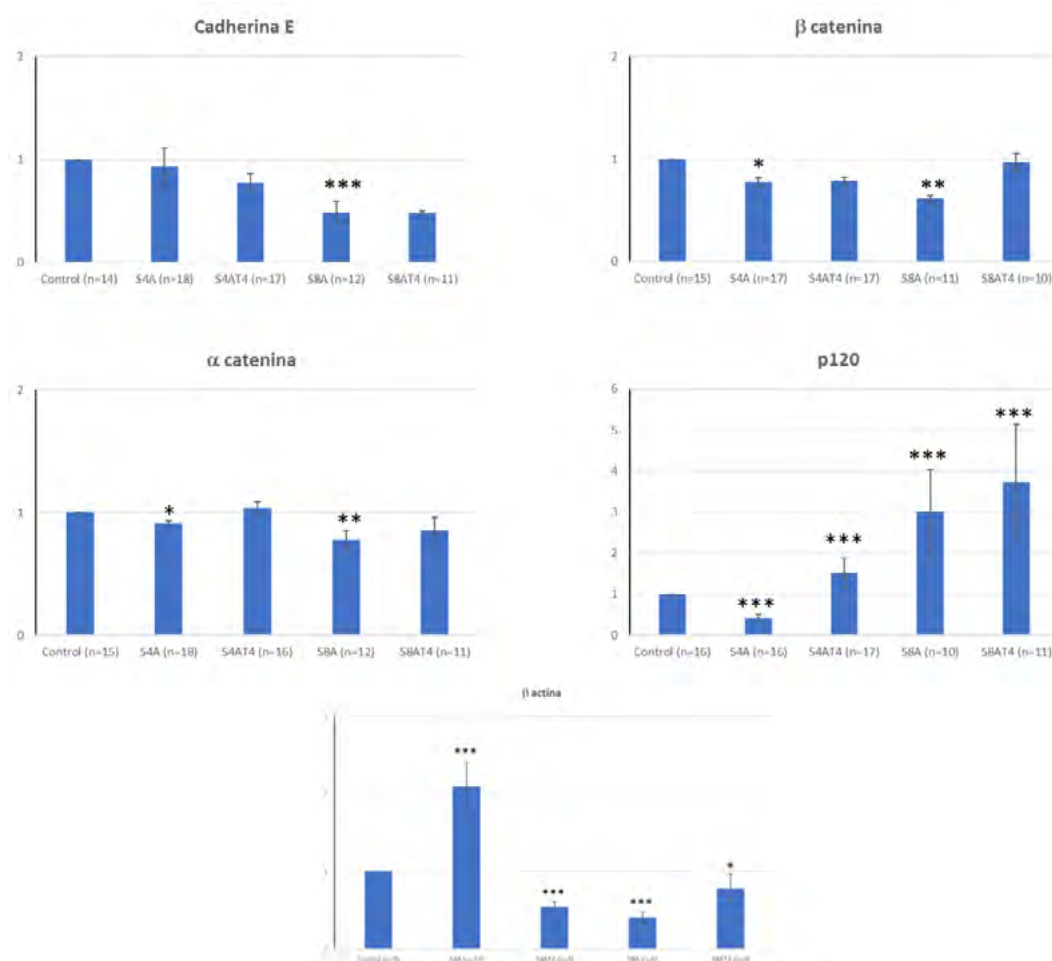
**Figura 4.** Criptas aisladas del colon distal de ratones control (t0), tratados con AOM+DSS e inducidos a desarrollar CCR de 4 y 8 semanas y tratados con AOM+DSS+hormona LT4. La diversidad morfológica se observa en todos los puntos experimentales, por lo que se han seleccionado las imágenes más representativas. La línea punteada señala el crecimiento de una nueva cripta, presumiblemente desde la región apical de la cripta progenitora. Desde la semana 4 de transformación celular se observa crecimiento gran cantidad de criptas cortas a distintas alturas de la cripta original y pérdida de la morfología normal de las criptas. Barra = 100 µm.

### MOLÉCULAS DE UNIONES ADHERENTES



El modelo experimental claramente muestra que la expresión de *CADH1* desciende marcadamente y muy significativamente a las 8 semanas de inducción tumoral. Si bien la media de la expresión baja ligeramente a las 4 semanas del CCR, la dispersión de los datos evidencia cambios no significativos respecto al control normal (Figura 5).

Contrariamente a lo que se reporta en la mayoría de los tipos de cáncer, los niveles de ARNs de  $\beta$ -catenina descendieron durante el desarrollo del CCR. Mientras descendieron significativamente a las 4 semanas de desarrollo tumoral al compararlo con el control a t0, a las 8 semanas cayeron muy significativamente (Figura 5).



**Figura 5.** Niveles de expresión génica de E-cadherina, b-catenina, a-catenina, p120-catenina y b-actina relativos al grupo control inicial, en colon distal de *Mus musculus* Balbc con CCR de 4 y 8 semanas (S4A, S8A) y con CCR de 4 u 8 semanas y tratamiento durante 3 o 7 semanas con L-T4 (S4AT4, S8AT4). Los niveles de ARNm se determinaron por sqRT-PCR y se normalizaron en relación con los niveles del grupo control. 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 (\*significativa; \*\*muy significativa; \*\*\*extremadamente significativa). El gen constitutivo M2B fue empleado como control interno y normalizador de cada reacción de sqRT-PCR.

El descenso en los niveles de expresión de *CTNNA1* fue menos marcado en la 8<sup>va</sup> semana comparado con el de *CTNNB1*, pero fue significativo en la 4<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup> semana (Figura 5).

La expresión de *CTNND1* mostró un comportamiento dual con el desarrollo tumoral. Mientras que en la 4<sup>ta</sup> semana sus niveles descendieron en forma extremadamente significativa, en la 8<sup>va</sup> semana sus niveles se dispararon marcadamente, aunque exhibieron gran dispersión de valores (Figura 5).

Las uniones adherentes epiteliales estabilizadas dependen de la conexión de las E-cadherinas transmembrana y las cateninas a cinturones citoesqueléticos de actina. En el modelo experimental, los niveles de expresión de *ACTB* evidenciaron un comportamiento dual, aunque antagónico con *CTNND1*. Así, sus niveles aumentaron a más del doble y con extrema significatividad en la 4<sup>ta</sup> semana, mientras que descendieron a menos de la mitad y extrema significatividad en la 8<sup>va</sup> semana (Figura 5).

#### **PEQUEÑAS GTPAsas QUE INTERVIENEN EN UNIONES ADHERENTES Y EL CITOESQUELETO DE ACTINA**

Los niveles de expresión de *RAC1* descendieron muy significativa- y significativamente a las 4 y 8 semanas respectivamente, comparados con los del control al inicio de los ensayos (Figura 6).

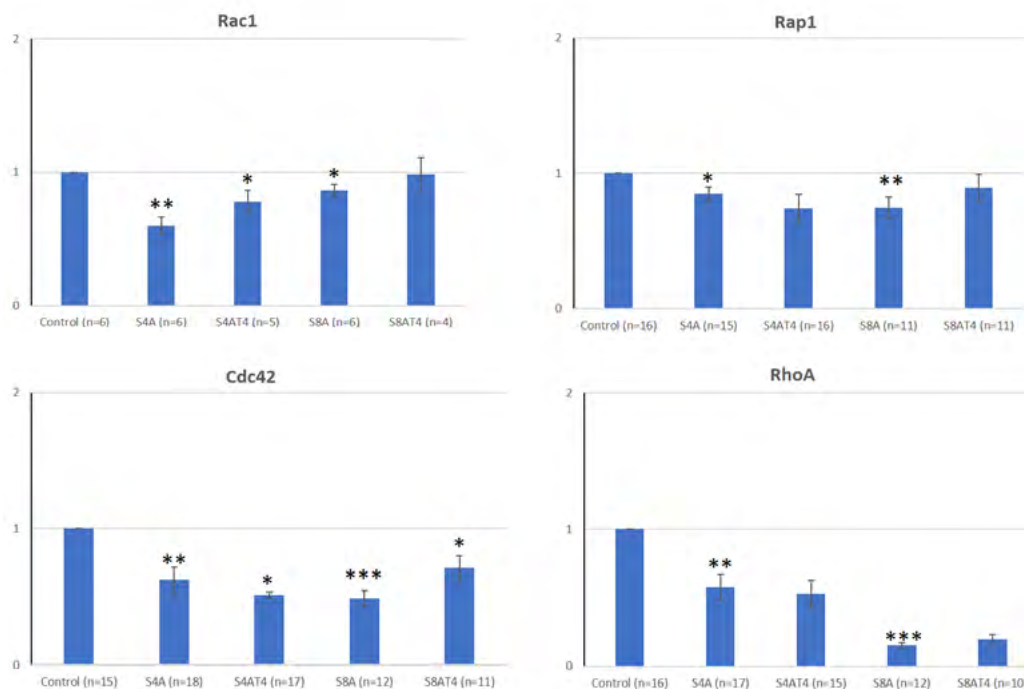
Los niveles de expresión de *RAP1* también descendieron, aunque en forma significativa y muy significativamente en las 4<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup> semana respectivamente (Figura 6).

Los niveles de expresión de *CDC42* y *RHOA* descienden marcada- y muy significativamente con el desarrollo tumoral, siendo más profundo el descenso para *RHOA*, fundamentalmente a la 8<sup>va</sup> semana cuando la diferencia se hace extremadamente significativa (Figura 6).

#### **MARCADORES DE SEÑALIZACIÓN POR HORMONAS TIROIDEAS**

Los niveles de ARNm del receptor alfa de hormonas tiroideas ( $RT\alpha$ ) disminuyen con el desarrollo tumoral, tornándose muy significativa en la 8<sup>va</sup> semana (Figura 7). En contraste, la expresión del *THRB* mostró un comportamiento algo antagónico durante el desarrollo tumoral. Mientras que en la 4<sup>ta</sup> semana se verifica un leve aumento de los niveles medios, aún cuando la diferencia respecto al control no es significativa, en la 8<sup>va</sup> semana sus niveles disminuyen significativamente (Figura 7). La expresión del gen *DIO1* codificante de la enzima integral de membrana plasmática Dio1, activante de T4 a T3 disminuye significativa- y muy significativamente en las semanas 4<sup>ta</sup> y 8<sup>va</sup>, respectivamente (Figura 7). En contraste, el comportamiento de los niveles de expresión del gen *DIO2* codificante de Dio2 intracelular y activante de T4 a T3, fue opuesto. Se produjo un aumento extremadamente significativo a las 4 semanas de desarrollo tumoral, aunque su expresión fue muy variable. A las 8 semanas se verificó una tendencia promedio al aumento sobre el control, aunque los cambios no fueron significativos (Figura 7).

La expresión del gen *DIO3* codificante de Dio3 inactivante de T4 a rT3 y de T3 a T2, aumentó muy significativamente durante el desarrollo tumoral, mostrando un comportamiento muy similar a las 4 y 8 semanas (Figura 7).

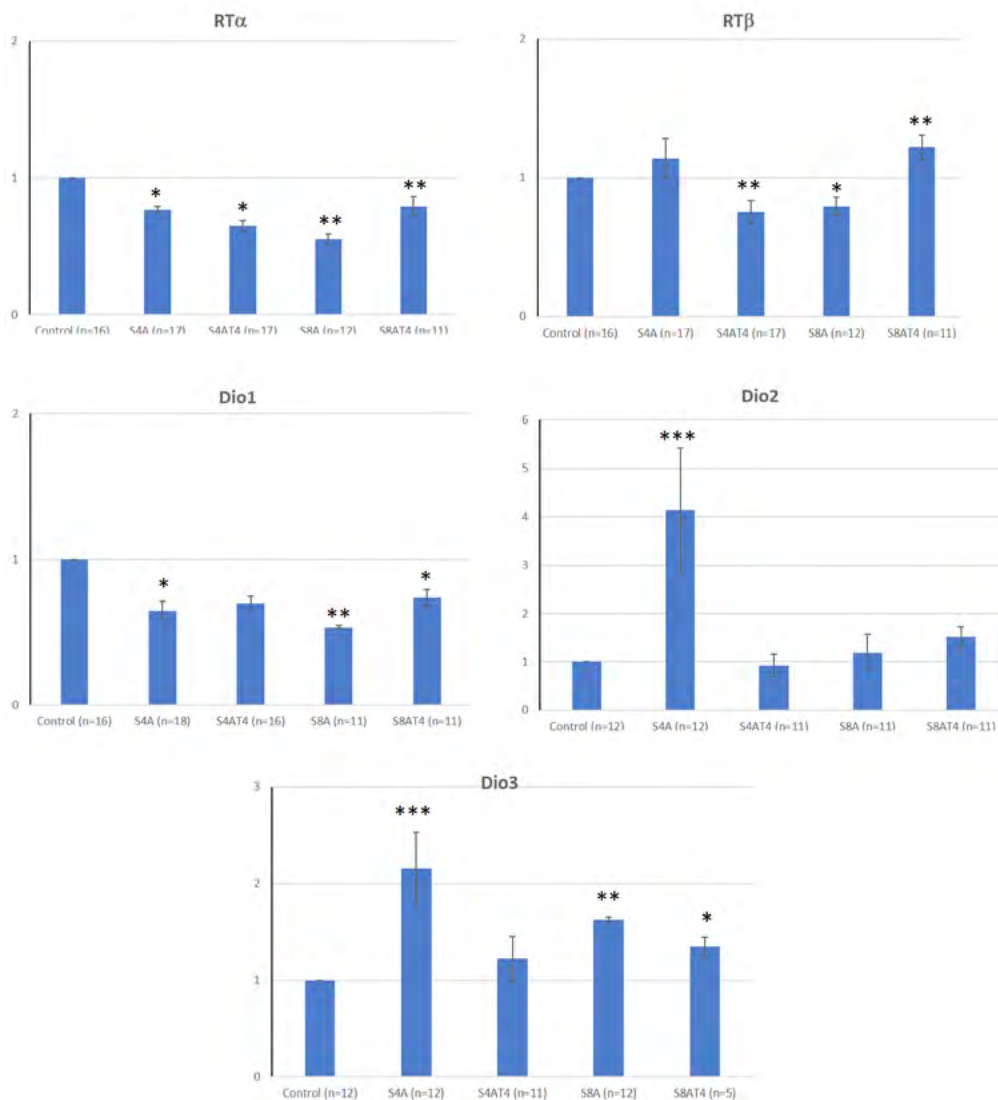


**Figura 6.** Niveles de expresión génica de las pequeñas GTPasas RhoA, Rac1, Cdc42 y Rap1, relativos al grupo control inicial, en colon distal de *Mus musculus* Balbc con CCR de 4 y 8 semanas (S4A, S8A) y con CCR de 4 y 8 semanas y tratamiento durante 3 o 7 semanas con L-T4 (S4AT4, S8AT4). La expresión de Rac1 resultó detectable solo en el bioensayo3. Los niveles de ARNm se determinaron por sqRT-PCR y se normalizaron en relación con los niveles del grupo control. 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 (\*significativa; \*\*muy significativa; \*\*\*extremadamente significativa). El gen constitutivo M2B fue empleado como control interno y normalizador de cada reacción de sqRT-PCR.

### MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Es reconocido que los ambientes tumorales se caracterizan por aumentar a nivel celular la proliferación, supervivencia y movilidad, así como por disminuir la diferenciación y la muerte. Por ello, se evaluaron la proliferación, la diferenciación y marcadores de movilidad celular.

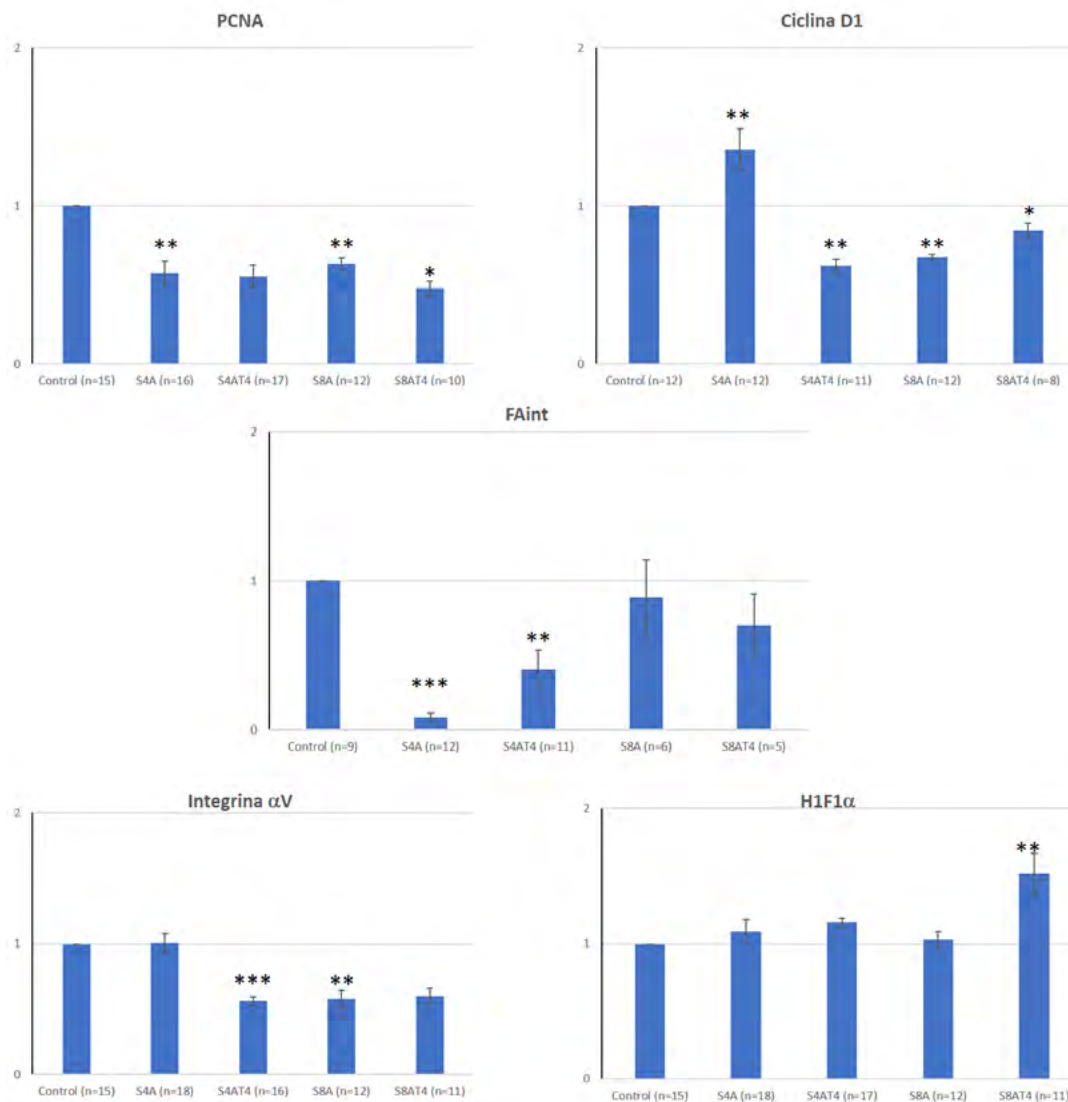
Llamativamente, la expresión del marcador de proliferación celular *PCNA*, mostró una disminución muy significativa y de similar magnitud a las 4 y 8 semanas de desarrollo tumoral, al compararlos con los controles a t0 (Figura 8). Por su parte, la expresión del gen *CCND1* codificante de ciclina D1, otro marcador de proliferación celular, mostró un aumento muy significativo a las 4 semanas del CCR, mientras que en la 8<sup>va</sup> semana sus niveles descendieron muy significativamente, respecto al control a t0 y los de la 4<sup>ta</sup> semana (Figura 8).



**Figura 7.** Niveles de expresión génica (ARNm) de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de HTs y desiodinasas responsables del metabolismo de HTs. Los niveles de ARNm se determinaron por sqRT-PCR y se normalizaron en relación con los niveles del grupo control. 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 (\*significativa; \*\*muy significativa; \*\*\*extremadamente significativa). El gen constitutivo M2B fue empleado como control interno y normalizador de cada reacción de sqRT-PCR.

### MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR INTESTINAL

Para intentar responder a la hipótesis de que las hormonas tiroideas tienen un efecto pro-diferenciante, se analizó la expresión de un marcador de diferenciación celular. La expresión del gen *ALPI* codificante de la enzima fosfatasa alcalina intestinal fue dispar entre semanas de tratamiento, mostró un descenso extremadamente significativo a las 4 semanas del CCR, mientras que evidenció una disminución en los niveles medios a la 8<sup>va</sup> semana, aunque la diferencia respecto al control no fue significativa (Figura 8).



**Figura 8.** Niveles de expresión génica (ARNm) de marcadores moleculares de proliferación celular (PCNA y ciclina D1), de diferenciación celular (fosfatasa alcalina intestinal, FAint) y de agresividad tumoral (receptor de membrana con dominio de unión a HT (subunidad  $\alpha 5$  de la integrina  $\alpha v 3$ ) y factor de angiogénesis (HIF1A, *Hypoxia-inducible factors*). Los niveles de ARNm se determinaron por sqRT-PCR y se normalizaron en relación con los niveles del grupo control. 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 (\*significativa; \*\*muy significativa; \*\*\*extremadamente significativa). El gen constitutivo M2B fue empleado como control interno y normalizador de cada reacción de sqRT-PCR.

### MARCADORES DE AGRESIVIDAD TUMORAL

En la búsqueda de indicadores adicionales que mostrasen la progresión tumoral en estadios más agresivos de la patología, se analizaron las expresiones de los genes *HIF1A* y *ITGAV* codificantes de un factor angiogénico y de una integrina que promueve la movilidad celular de los tumores y que suele aumentar en diversos estados neoplásicos.

La expresión de *ITGAV* codificante de la subunidad  $\alpha v$  de la integrina  $\alpha v \beta 3$  mostró disminución muy significativa recién en la 8<sup>va</sup> semana del desarrollo tumoral. Por su parte, la expresión *HIF1A* codificante del factor angiogénico HIF-1A aumentó significativamente en la semana 4 del desarrollo tumoral (Figura 8).

## **Análisis molecular del efecto de L-T4 exógena durante la progresión tumoral**

### **MOLÉCULAS DE UNIONES ADHERENTES**

El tratamiento hormonal con levotiroxina sugiere un ligero efecto represor de L-T4 sobre el gen *CDH1* codificante de E-cadherina en la 4<sup>ta</sup> semana del bioensayo, aunque las diferencias no fueron significativas al comparar los resultados con el tejido de CCR en la misma semana. En contraste, en la 8<sup>va</sup> semana no se verifican cambios respecto a su control de CCR de la misma semana (Figura 5).

A diferencia de la respuesta de *CDH1*, el tratamiento con L-T4 sobre el gen *CTNNB1* mostró un efecto regulador positivo en la 8<sup>va</sup> semana de los bioensayos, demostrando una diferencia muy significativa al compararlo con el tejido de CCR de esa semana (Figura 5).

En el caso de las cateninas  $\alpha$  y p120, el efecto del tratamiento con L-T4 exógena también generó efectos regulatorios positivos sobre los genes *CTNNA1* y *CTNND1*. Los niveles de ARNm de  $\alpha$ -catenina aumentaron ligera- y significativamente en la 4<sup>ta</sup> semana, mientras que en la 8<sup>va</sup> semana el incremento no fue significativo (Figura 5). Por su parte, los aumentos en los niveles de ARNm de p120-catenina en los animales tratados con L-T4 exógena fueron extremadamente significativos en la 4<sup>ta</sup> semana, mientras que en la 8<sup>va</sup> semana la gran dispersión de valores afectó la significatividad de la medida (Figura 5).

El tratamiento de animales con L-T4 sugiere un rol antagónico de esta hormona sobre el gen *ACTB* codificante de  $\beta$ -actina según la semana de progresión tumoral, ya que lo reprime en forma extremadamente significativa en la semana 4 y lo activa significativamente en la semana 8, aparentemente compensando los efectos tumorales (Figura 5).

### **PEQUEÑAS GTPasas QUE INTERVIENEN EN UNIONES ADHERENTES Y EL CITOESQUELETO DE ACTINA**

La influencia de L-T4 sobre la expresión de *RAC1* muestra un ligero efecto regulador positivo, que sólo fue significativo en la 4<sup>ta</sup> semana del bioensayo (Figura 6).

La respuesta de la expresión de *RAP1* al tratamiento con L-T4, mostró un comportamiento dual al analizar los valores medios por semana de tratamiento, aunque las diferencias fueron no significativas. Mientras los datos sugieren una tendencia represora a las 4 semanas, parece ser activadora a las 8 semanas del tratamiento (Figura 6). El comportamiento de *CDC42* fue similar al de *RAP1*, mostrando una tendencia represora en la 4<sup>ta</sup> semana, mientras que se produce un efecto regulador positivo, que aumentó significativamente los niveles de ARNm a las 8 semanas de tratamiento (Figura 6).

A diferencia de las otras pequeñas GTPasas, la expresión de *RHOA* no mostró cambios, sugiriendo independencia de L-T4. (Figura 6).

### **MARCADORES DE SEÑALIZACIÓN POR HORMONAS TIROIDEAS**

El tratamiento con L-T4 muestra un efecto regulador negativo significativo sobre el gen del  $RT\alpha$  a las 4 semanas de los bioensayos al compararlo con el tejido de CCR en la misma semana. Por el contrario, a las 8 semanas el efecto es regulador positivo y significativo (Figura 7).

En el caso del gen de RT, el tratamiento con L-T4 ejerce un control regulador positivo mostrando aumento de su expresión, aunque al borde de la significatividad a las 4 semanas de tratamiento. Este aumento se hace muy significativo a las 8 semanas, cuando se comparan los datos con los del tejido CCR de las mismas semanas (Figura 6).

La influencia de L-T4 sobre los genes *DIO* de las desiodinasas muestra un efecto regulador positivo sobre el gen *DIO1*, que se torna significativo recién en la 8<sup>va</sup> semana (Figura 6). Contrariamente, sobre el gen *DIO2*, el tratamiento con L-T4 reprime su expresión en forma extremadamente significativa a las 4 semanas de los bioensayos, mientras que no se generan cambios significativos a las 8 semanas (Figura 6). En el caso del gen *DIO3*, el tratamiento hormonal con L-T4 ejerció un efecto represor muy significativo a las 4 y 8 semanas de los bioensayos (Figura 6).

### **MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

El tratamiento con L-T4 muestra la represión del gen *PCNA*, cuyos valores se vuelven significativos en la 8<sup>va</sup> semana (Figura 8). En el caso de *CCND1* el comportamiento fue antagónico dependiendo la semana de progresión tumoral. Mientras que L-T4 reprime en forma extremadamente significativa en la 4<sup>ta</sup> semana, lo regula en forma positiva y significativamente en la 8<sup>va</sup> semana (Figura 8).

### **MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR INTESTINAL**

La expresión de *ALPI* fue estimulada significativamente por L-T4 en la 4<sup>ta</sup> semana, mientras que en la semana 8 se observa una tendencia a la represión, aunque no significativa (Figura 8).

### **MARCADORES DE AGRESIVIDAD TUMORAL**

El tratamiento hormonal con L-T4 mostró un efecto represor sobre el gen *ITGAV*, que a las 4 semanas resultó muy significativo, comparando con el colon tumoral. En la semana 8 los cambios no fueron significativos (Figura 8). Por el contrario, L-T4 regula positivamente al gen *HIF1A*, aunque los aumentos fueron muy significativos en la semana 4 de los bioensayos y solo mostró una tendencia a aumentar en la semana 8 (Figura 8).

### **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

#### ***Arquitectura de las criptas del colon distal durante la progresión tumoral y bajo influencia de L-T4***

El modelo de CCR murino empleado demuestra que los parámetros longitud y diámetro de las criptas, no serían buenos indicadores de los cambios sufridos en la arquitectura de la mucosa del colon durante la progresión tumoral y menos aún en etapas tempranas de la enfermedad. Entre la longitud y el diámetro, la longitud parece registrar las diferencias con mayor sensibilidad. Estos parámetros tampoco registran los cambios producidos por el tratamiento hormonal con L-T4.

A diferencia de la dificultad en encontrar un indicador arquitectónico y cuantificable de las criptas, que refleje los cambios durante la progresión tumoral y bajo el tratamiento hormonal, el análisis de la morfología de las criptas aisladas permite describir más certeramente la transformación. Claramente, al aumentar el crecimiento tumoral conforme se incrementa el tiempo de experimentación, se generan gran cantidad de criptas cortas a distintas alturas del eje mayor de la cripta original, lo cual repercute en una gran variabilidad en formas y tamaños en longitud y diámetro, más de lo habitual comparado con un colon distal normal. En humanos adultos se conoce que la renovación epitelial de la mucosa abarca 4 a 5 días (Sipos y col., 2005) y que la criptogénesis simétrica rara vez ocurre, tal como sucede en situaciones patológicas (Rubio y Schmidt, 2020).

#### ***Arquitectura molecular de la barrera epitelial del colon distal durante la progresión tumoral y bajo influencia de L-T4***

Nuestros estudios previos en anuros y en un complejo escenario metabólico, permitieron demostrar que E-cadherina,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina, así como Rac1 y Rap1, aumentan su expresión durante el desarrollo metamórfico del tracto digestivo gracias al rol regulatorio positivo de T3 (Izaguirre y Casco, 2010; Galetto et al., 2017). Asimismo, se demostró que E-cadherina,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina y la pequeña GTPasa Rac1, son genes de respuesta directa a T3 y por análisis bioinformático, se identificaron los elementos de respuesta directa a las HTs en sus genes (Galetto, 2016; Galetto y col. 2017). Morfológicamente, se demostró la influencia de la hormona T3 sobre el establecimiento de las uniones intercelulares epiteliales mediadas por E-cadherina, sus moléculas conectoras al citoesqueleto de actina,  $\beta$ - y  $\alpha$ -catenina y las pequeñas GTPasas Rac1 y Rap1 (Galetto, 2016; Galetto y col. 2017). Tempranamente (a las 24 hs), la remodelación del tracto digestivo de *Xenopus laevis* es globalmente dominada por la acción efectora de Rac1,



la cual promovería la iniciación y expansión de las uniones célula-célula epiteliales (Yamada y Nelson, 2007) y el establecimiento de los complejos de unión ápico-basales (uniones estrechas–uniones adherentes–desmosomas) mediado por la vía de señalización E-cadherina– $\beta$ -catenina– $\alpha$ -catenina y con posterioridad por ocludina–ZO. Con el avance de la metamorfosis (a los 5 días), el escenario tisular cambia y Rap1 parece ejercer el control de las uniones adherentes mediadas por contactos homotípicos E-cadherina–E-cadherina y la organización del epitelio, participando en la maduración y mantenimiento de las uniones célula-célula (Hogan y col., 2004) y la preservación de la arquitectura epitelial (Izaguirre y col., 2010; Izaguirre; Izaguirre y Casco, 2016; Galetto y col., 2017).

En mamíferos, Sirakov y col. (2012) demostraron que la señalización de HTs en el intestino de ratón está involucrada en el desarrollo, la homeostasis y la susceptibilidad al cáncer. Como se dijo previamente, las HTs actúan a través de sus TRs para activar o reprimir la transcripción de genes blanco. Sin embargo, al conducir investigaciones *in vitro* e *in vivo* con ratones APC-mutados, estos investigadores obtuvieron algunos resultados contradictorios y una gran complejidad regulatoria de vías de señalización interrelacionadas. A estas dificultades se suma el hecho de que la interpretación de los resultados de un análisis comparativo de la expresión génica en tumores completos puede verse obstaculizada por la heterogeneidad clonal de los mismos. Por ello, estos autores proponen que dependiendo del contexto de las lesiones tumorales intestinales, el TR $\alpha$ 1 remodela su función e induce eventos genómicos y no genómicos específicos. Sirakov y col. (2012) sugieren que en condiciones fisiológicas, los TR $\alpha$ 1 se unen a los TREs y regulan positivamente la expresión y estabilización de  $\beta$ -catenina y así contribuyen a mantener la homeostasis intestinal. Normalmente, TR $\alpha$ 1 se expresa en el núcleo de las células de la región inferior de las criptas del intestino delgado y del colon, donde se encuentran los nichos de células madre proliferantes. Por ello, su expresión es relativamente baja, en comparación con la masa celular de las criptas de la mucosa completa (Kress y col., 2010). En ratones transgénicos que sobreexpresan el TR $\alpha$ 1 (vil-TR $\alpha$ 1) en todas las células epiteliales intestinales, se produce un aumento y estabilización de la expresión de  $\beta$ -catenina, que lleva a la activación de la ruta WNT y la hiperproliferación de la mucosa. En ratones doblemente transgénicos para sobreexpresión de TR $\alpha$ 1 y APC (vil-TR $\alpha$ 1/Apc; APC: *Adenomatous Polyposis Coli*), la sobreexpresión y estabilización de  $\beta$ -catenina y de Tcf4 fue muy superior y se cree sería la responsable del cambio en la unión de TR $\alpha$ 1 desde los TREs a los WREs (*WNT response element*). De esta manera, la vía de señalización de HTs podría inducir la vía de señalización WNT, promoviendo la activación y/o la aceleración del proceso tumorigénico. La proteína APC es codificada por un gen supresor tumoral, que juega un importante papel en la supresión tumoral porque controla la frecuencia con la que una célula se divide (Hankey y col., 2018).

En nuestro modelo experimental, el tipo de mutaciones y disfunciones génicas específicas, generadas por el AOM+DSS no han sido caracterizadas, por lo que las inferencias realizadas a partir de los resultados obtenidos abordarían las acciones combinadas de la disfunción de diversos genes.

Tomados en conjunto todos los resultados, se advierte la complejidad del sistema bajo estudio y la incidencia diferencial sobre cada tipo de gen, tanto durante la transformación celular como durante el tratamiento hormonal.

### **Expresión de las moléculas involucradas en la arquitectura y función de las uniones adherentes y mantenimiento del epitelio del colon, durante la progresión tumoral**

Entre las conclusiones más sobresalientes puede señalarse que, durante la progresión tumoral, la expresión de las moléculas constituyentes de las uniones adherentes sufre una multiplicidad de cambios. Los niveles de expresión de E-cadherina descienden sustancialmente a partir de la 8<sup>va</sup> semana de la transformación tisular, lo cual sugiere la producción de mutaciones inactivantes y/o actividad de represores sobre el gen *CDH1* (Izaguirre y col., 2019). A su vez, la expresión de  $\beta$ -catenina también disminuye en forma significativa y muy significativa a las 4 y 8 semanas del CCR. Se han registrado diferentes com-

portamientos de la expresión del gen *CTNNB1*, el cual dependería sensiblemente del genotipo tumoral y de la edad de los animales (Sirakov y col., 2012).

La homeostasis intestinal resulta de una compleja regulación cruzada de rutas de señalización, por lo que su alteración induce tumorigénesis intestinal. Entre las rutas involucradas se ha demostrado que los TR $\alpha$ 1 activan y actúan sinérgicamente con la vía WNT, induciendo proliferación celular de las criptas y promoción de tumorigénesis. Se ha verificado que TR $\alpha$ 1 interactúa físicamente con el complejo  $\beta$ -catenina-Tcf4 en el núcleo de células intestinales normales. Trabajando con diferentes mutantes se verificó que los niveles aumentados de los complejos  $\beta$ -catenina-Tcf4 en tumores de ratones doble mutantes vil-TR $\alpha$ 1/Apc bloquean la actividad transcripcional de TR $\alpha$ 1, impidiendo su unión a las secuencias de ADN blanco, para ser reclutado en genes blanco de WNT (Sirakov y col., 2012). Mientras que los ratones vil-TR $\alpha$ 1 mutantes presentan hiperproliferación en sus criptas intestinales y una baja tasa de desarrollo de adenomas en intestino delgado y colon, los ratones mutantes vil-TR $\alpha$ 1/Apc desarrollan una elevada tasa de adenocarcinomas en el intestino delgado y en el colon comparados con los Apc mutantes. A su vez, en estos mutantes la aparición de los tumores y su progresión a invasividad también están aceleradas; así como su actividad WNT. A nivel molecular, se observaron incrementos o disminuciones tanto en la expresión de genes de respuesta directa a TR $\alpha$ 1, tales como *CTNNB1* y *SFRP2* (Plateroti y col., 2006; Kress y col., 2009b), como de respuesta indirecta a TR $\alpha$ 1, tales como *CCNB1* y *CDC2A* (Kress y col., 2009b), dependiendo los genotipos y la edad de los mutantes. En los mutantes vil-TR $\alpha$ 1 aumentaron los niveles de expresión de *Ctnnb1* y *Sfrp2*, comparado con los ratones *wild type* (WT), mientras que en la mucosa normal o tumoral de ratones Apc mutantes, los niveles de ARNm de *Ctnnb1* disminuyeron ligeramente o no cambiaron para *Sfrp2*. En contraste, en los ratones doble mutantes vil-TR $\alpha$ 1/Apc, la regulación positiva de ambos genes se vio atenuada y los niveles de ARNm de *CTNNB1* no cambiaron mientras que los de *Sfrp2* disminuyeron en los tumores. En el caso de los genes de respuesta indirecta a TR $\alpha$ 1, la sobreexpresión de TR $\alpha$ 1 aumentó los niveles de ARNm de *CCNB1* y *CDC2A*, independiente de la mutación de Apc (Sirakov y col., 2012).

La comparación de nuestros resultados con los encontrados en los trabajos del grupo de Plateroti, plantean la necesidad de identificar las mutaciones originadas en nuestro modelo experimental que permitan comprender las rutas de señalización afectadas. Sin embargo, a la luz de éstos podemos sugerir que principalmente estaría afectado el funcionamiento del gen APC.

Perfiles de expresión similares a *CTNNB1* se detectaron para el gen *CTNNA1*, codificante de  $\alpha$ -catenina, una proteína que conecta el complejo de membrana E-cadherina- $\beta$ -catenina al citoesqueleto de actina. Los niveles de ARNm disminuyeron significativamente desde la semana 4, profundizándose el efecto en la semana 8.

A diferencia de *CTNNB1* y *CTNNA1*, el comportamiento de la expresión de *CTNND1*, codificante de la proteína p120-catenina fue antagónico dependiendo del estado tumoral. Mientras que sus niveles de expresión disminuyeron muy significativamente en la semana 4 del CCR, aumentaron marcadamente a las 8 semanas de la progresión tumoral. El principal rol de p120-catenina, es la estabilización de E-cadherina en la membrana plasmática, evitando su endocitosis (Hoshino y col., 2005). Disociada de las uniones adherentes, p120-catenina modula la actividad de la familia de GTPasas Rho (Anastasiadis, 2007; Hatzfeld, 2007). Se ha reportado que en tumores humanos, p120-catenina asociada a la ruta de señalización Kaiso (Park y col., 2005), puede ser afectada en diferentes formas, tal que pueden expresarse variantes de *splicing* alternativo (Aho y col., 1999). Por otro lado, al disminuir E-cadherina de las uniones adherentes, la liberación de p120-catenina y su translocación al núcleo podría reprimir su expresión en etapas tempranas del CCR, que luego podría aumentar exageradamente al ser regulada indirectamente para intentar compensar la pérdida de E-cadherina.

La proteína p120-catenina es un miembro de la familia de proteínas Armadillo, que estabiliza los complejos adhesivos cadherinas-cateninas en la membrana plasmática, pero tiene también roles adi-

cionales en el citoplasma (regulación de la actividad de pequeñas GTPasas) y el núcleo. Mecanismos de empalme alternativo de sus pre-ARNm y múltiples sitios de fosforilación generan complejidad adicional a su funcionamiento. Su pérdida total, su atenuación o su errónea localización celular se correlaciona con la progresión de diferentes tipos de tumores humanos (van Hengel y van Roy, 2007).

Se sabe que la *down-regulation* de E-cadherina en cáncer puede resultar en la redistribución de p120-catenina en el citoplasma y/o translocación nuclear y que la pérdida de p120-catenina o su localización citoplasmática altera la homeostasis tisular y promueve metástasis en forma independiente a su rol en la adhesión. Particularmente, se ha detectado que la *down-regulación* de p120-catenina endógena en células mamarias cancerosas deficientes en E-cadherina previene el desarrollo de fenotipos migratorios (van Hengel y van Roy, 2007).

Sin embargo, la *down regulation* de p120-catenina en tumores no ha podido ser explicada completamente por inactivación génica, ya que se han reportado muy pocas mutaciones en el gen *CTNND1*, solo en cáncer de mama (Wood y col., 2012) y en la línea celular SW48 de carcinoma de colon (Iretton y col., 2002). Por ello, se piensa que otros mecanismos estarían involucrados, tales como *down regulation* transcripcional, modificaciones epigenéticas o silenciamiento mediado por microARNs, aunque hay escasos estudios que lo documenten. Se ha detectado que *CTNND1* es transcripcionalmente atenuado por la unión de FOXC2 a su promotor, en la línea celular NSCLC de cáncer de pulmón (Mortazavi y col., 2010). Un estudio de inmunodetección de p120-catenina en adenocarcinomas colo-rectales humanos registrar alteraciones de los patrones de expresión en el 86% de los casos y una pérdida total en el 18% de los casos. Esta última condición se correlacionó con estadios muy avanzados de enfermedad, metástasis en nódulos linfáticos y disminución en la sobrevida (Gold y col., 1998).

Trabajos recientes que emplean modelos de CCR humano *in vitro* e *in vivo* demuestran que el microARN miR-143-3p silencia directamente al gen *CTNND1*, así como la sobreexpresión de *CTNND1* contribuye a la proliferación, migración e invasión celular en CCR y su silenciamiento los efectos opuestos (Ding y col, 2019). Estos resultados sugieren que un mecanismo similar podría estar involucrado en el descenso de los niveles de expresión de p120-catenina registrados en el CCR de 4 semanas. Dado que los ensayos del grupo de Ding fueron realizados con líneas celulares de CCR humano, con xenotrasplantes de estas células en ratones y abarcaron 50 días de análisis, el comportamiento opuesto obtenido en nuestro modelo a las 8 semanas de desarrollo del CCR murino sugiere la existencia de otros mecanismos que se pondrían en juego con la progresión tumoral.

La formación y mantenimiento de las uniones adherentes dependen críticamente del citoesqueleto celular e influyen primariamente en el establecimiento de la polaridad de las células epiteliales y en la arquitectura epitelial. Dentro del citoesqueleto,  $\beta$ -actina es una de las isoformas más importantes en el mantenimiento de la polaridad ápico-basal de los epitelios, ya que lo vincula con los complejos proteicos adhesivos de membrana plasmática (Tanos y Rodriguez-Boulan, 2008; Dugina y col., 2009). La expresión de  $\beta$ -actina fue dual, dependiendo la semana de desarrollo del CCR. Mientras que los niveles de ARNm aumentaron en forma extremadamente significativa a las 4 semanas, disminuyeron muy significativamente en la 8<sup>va</sup> semana. Este patrón cambiante de expresión con la progresión tumoral probablemente esté relacionado con la complejidad de la interconexión de vías de señalización regulatorias.

Se acepta que la geometría de actina-F es dinámicamente controlada por algunos miembros de la superfamilia Ras de pequeñas GTPasas, tales como RhoA, Rac1, Cdc42 y Rap1. Éstas se localizan en los contactos adhesivos basados en E-cadherina y así median los reordenamientos del citoesqueleto y la dinámica de superficie de E-cadherina durante el ensamblaje de las uniones adherentes (AJ), en los procesos de adhesión célula-célula y en los de compactación (Braga, 2000; Braga y Yap, 2005). En contraste a la activación de Rac1, Rap1 y Cdc42, la de Rho es reducida por la unión homofílica de E-cadherina (Kim y col. 2000; Noren y col. 2000, 2001; Lampugnani y col., 2002; Hogan y col., 2004). Se ha postulado que Cdc42 se activaría corriente abajo de Rap1 (Hogan y col., 2004). A su vez, Rap1 regula la red de señaliza-

ción de polaridad celular (Schwamborn y Püschel, 2004) y el fortalecimiento de las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular (Bos, 2005). Dado que se ha detectado que Rap1 puede competir por los efectores de Ras, es que puede oponerse a su potencial oncogénico (Kitayama y col., 1989). Se sabe que las modificaciones de las uniones adherentes y las transformaciones tisulares en un proceso tumoral van acompañadas de grandes modificaciones del citoesqueleto y de sus propiedades químico-mecánicas, conducidas por las pequeñas GTPasas (Tanos y Rodríguez-Boulan, 2008).

En nuestro modelo experimental los perfiles de expresión de las pequeñas GTPasas muestran descenso en sus niveles desde la semana 4, siendo muy similares los perfiles de Rap1 y Cdc42, lo cual resulta coincidente con la hipótesis de que la proteína Cdc42 se activa corriente abajo de Rap1. Mientras que para Rap1 y Cdc42 el descenso es mayor en la 8<sup>va</sup> semana, para Rac1 es menor respecto a la semana 4. Debido a que en estado fisiológico la activación de la proteína RhoA tiene un comportamiento opuesto al de Rac1, Rap1 y Cdc42, se podría pensar que el efecto en sus niveles de ARNm también sería opuesto a los de RhoA. Sin embargo, sus niveles descendieron en la semana 4 del CCR y en la semana 8, el efecto represor fue el mayor. Dado que la condición tumoral reprime la expresión de Rap1, entonces se anula el efecto antitumoral de esta molécula.

Adicionalmente, se considera a p120-catenina un modulador importante de las actividades de RhoA, Rac1 y Cdc42 (Grosheva y col., 2001; Anastasiadis, 2007) y de su transcripción génica (Daniel y Reynolds, 1999; Prokhortchouk y col., 2001; Kim y col., 2004; Park y col., 2005). Se ha propuesto que p120-catenina inhibe la actividad de RhoA y activa las de Rac1 and Cdc42 (Pieters, 2012)

### ***Expresión de las moléculas involucradas en la función y metabolismo de las hormonas tiroideas, durante la progresión tumoral***

La ruta de señalización canónica de las hormonas tiroideas (HTs) resulta de la interacción de la hormona tiroidea activa T3 con receptores nucleares de HTs (RTs) y la activación o represión de genes blanco. A su vez, la disponibilidad de T3 intracelular está bajo un estricto control por diversos puntos de chequeo, en el que intervienen transportadores de membrana específicos, RTs, correguladores de su transcripción y desiodinasas (Bianco y col., 2019).

La glándula tiroides de mamíferos secreta al plasma principalmente T4 y una proporción mucho menor de T3. T3, es la hormona biológicamente activa, ya que se une a los receptores TR $\alpha$  y TR $\beta$ , iniciando la señalización de HTs, que actúa en la regulación de genes blanco y otras vías metabólicas. En humanos la relación molar es de [11-15M T4:1M T3], dependiendo de la disponibilidad de yodo y de la presencia de patologías tiroideas.

Las enzimas desiodinasas (Dio) son puntos de control esenciales de la actividad tiroidea celular, ya que determinan tanto la activación como la desactivación intracelular de las HTs. Su expresión es tejido-específica y su actividad cambia en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas. Por ello, los niveles séricos de HTs no siempre son capaces de predecir lo que sucede a nivel tisular o local. Este control local de los niveles de HTs celulares es mediado por tres Dio, la tipo I (Dio1) y la tipo II (Dio2) que incrementan la actividad tiroidea celular convirtiendo la prohormona tiroxina (T4) inactiva a la hormona triyodotironina (T3) activa, mientras que la tipo III (Dio3) cataliza la inactivación fisiológica de las HTs convirtiendo T4 a T3 reversa inactiva (rT3) y la T3 a T2 (diyodotirosina) (Bianco y col., 2002; Dentice y Salvatore, 2011).

Dio1 es una enzima integral de membrana plasmática y es la principal responsable de los niveles plasmáticos de T3. Se cree que cumpliría un rol crítico en síndromes de enfermedades no tiroideas y en neoplasias (Maia y col., 1995). Dio2 es una enzima integral de la membrana del retículo endoplásmico, que posee elevada afinidad por T4, por lo que es la principal convertidora de T4 a T3 a nivel intracelular (Larsen et al., 1981). En contraste, Dio 3 que es una enzima integral de membrana plasmática e inactivante de T3, que reactiva su expresión en ciertos estados fisiopatológicos, tales como en la reparación

e inflamación de tejidos y en el cáncer (Li y col., 2001; Boelen y col., 2005; Kester y col., 2009; Dentice y col., 2007, 2012, 2014).

Sin embargo, en la actualidad, a nivel de humanos se plantea un esquema metabólico de las HTs algo más complejo. Dio1 es capaz de intervenir tanto en la activación como en la inactivación de las HTs. Se postula que el gen *DIO1* tendría un sesgo de control epigenético hacia la ruta de conversión T4 a T3 más que hacia la ruta T4-a-rT3, para generar niveles más altos de T3 en sangre. Esto sería debido a que *DIO1* tendría dos TREs sensibles a la hormona T3 (Maia y col. 2011). Este tipo de control promovería que la enzima Dio1 posibilite alcanzar niveles de T3 en la mitad superior del rango de referencia, en situaciones de sobreexpresión de *Dio3* o de represión de *Dio2*. Por su parte, la enzima Dio3 sería una proteína “bombero” encargada de proteger del exceso temporal de HTs, ya que en algunas circunstancias los niveles considerados “normales” pueden ser excesivos. Tal es el caso de la fase aguda del síndrome de enfermedad no tiroidea, cuando el cuerpo descarga rápidamente el suministro de T3 para reducir la tasa metabólica, pocas horas después de una lesión aguda, una cirugía cardíaca, un ataque cardíaco o un derrame cerebral. El gen *Dio3* es regulado epigenética- y positivamente en los tejidos cuando hay (I) exceso de T4 y/o T3, (II) hipoxia causada por flujo sanguíneo obstruido o disfunción pulmonar y (III) citoquinas inflamatorias. Antagónicamente, será reprimido cuando haya bajos niveles de T4 (especialmente en el hipotiroidismo) o el cuerpo deba reponer el estado de salud luego de una crisis o enfermedad no tiroidea que ha depletado T3 (Dentice y col., 2007; 2012; 2014).

Además de las acciones genómicas canónicas de las HTs, desde hace varios años se han demostrado diversas acciones no genómicas que no requieren la interacción directa de T3 con los receptores nucleares TR $\alpha$  y TR $\beta$  transcripcionalmente activos. Así, se logra un tiempo de respuesta muy rápido, en el orden de minutos, ya que la acción de las HTs resulta independiente de la expresión génica y de la síntesis de proteínas. Mientras que solo T3 es capaz de generar respuestas genómicas, los efectos no genómicos pueden ser desencadenados por T3 o T4 o incluso por T2. En la última década se han incrementado los descubrimientos de estas rutas no genómicas, cuyos sitios celulares de acción pueden ser tanto receptores o transportadores iónicos de la membrana plasmática, como componentes del citoesqueleto. A su vez, más recientemente, han aparecido numerosas evidencias que respaldan que existiría una conversación cruzada entre rutas genómicas y no genómicas. Se espera entonces, que el profundo conocimiento sobre esta regulación pueda ayudar a comprender enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, inmunes y tumorales. Ciertamente, estos nuevos abordajes de estudio han ayudado a comprender la contribución de las acciones no genómicas de las HTs en la angiogénesis y supervivencia celular en el cáncer (Incerpi y col., 2018).

En nuestro modelo experimental de CCR, la expresión de Dio1 disminuye muy significativamente a las 4 y 8 semanas de desarrollo tumoral, mientras que la de Dio2 aumenta drásticamente en la 4<sup>ta</sup> semana, mostrando solo una ligera tendencia a aumentar a las 8 semanas de progresión tumoral. La expresión de Dio3, también se incrementa en forma extremadamente significativa en la 4<sup>ta</sup> semana y muy significativa a las 8 semanas. Estos resultados son coincidentes con ambientes tisulares ricos en HTs e hipóxicos (Dentice y col., 2007, 2012, 2014; Incerpi y col., 2018).

Se sabe que los niveles de expresión de Dio3 aumentan en el cáncer colo-rectal, aunque tiene una correlación negativa con el grado histológico de las lesiones, tal que desciende con el desarrollo de adenocarcinomas (Dentice y col., 2013), lo cual da cuenta del menor nivel de expresión verificado en la 8<sup>va</sup> semana. A su vez, se ha demostrado que la expresión de Dio3 está sujeta al control de varias moléculas y rutas de señales, todas las cuales se consideran fuerzas mayores para conducir la división celular y son las mediadas por HIF-1 $\alpha$ , Shh-Gli2, TGF- $\beta$  and Wnt- $\beta$ -catenina (Dentice y Salvatore, 2011).

Como se dijo previamente, los receptores nucleares de las hormonas tiroideas (RTs) son factores de transcripción, cuya actividad es modulada por la hormona tiroidea activa T3. A nivel del tracto gastrointestinal de mamíferos, el rol de estas rutas de señalización ha sido menos estudiado que en anuros. Sin

embargo, algunas investigaciones aportan evidencias de una gran conservación de estas rutas durante la evolución, para influenciar el desarrollo de estos órganos, así como la fisiología de las células madre (Sirakov y Plateroti, 2011; Izaguirre y Casco, 2016; Galetto y col., 2017).

La señalización de HTs regula la proliferación de las células progenitoras epiteliales intestinales durante la maduración posnatal tanto en anfibios como en mamíferos. Las HTs operarían sobre ciertos grupos de genes y vías de señalización blanco, aunque aún persisten algunas discrepancias en cuanto a las vías involucradas. Mientras que en el ratón, la proliferación celular involucraría principalmente la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, en *Xenopus* parecería no ser central (Sirakov y Plateroti, 2011). Todas las isoformas de RTs se expresan en las células epiteliales intestinales (Plateroti y col., 1999; 2001), pero las HTs vía RT $\alpha$ 1 controlarían los genes claves del ciclo celular y de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, estimulando la proliferación de las células epiteliales intestinales (Sirakov y Plateroti, 2011). Se ha propuesto además, que los genes de los RT $\alpha$  y RT $\beta$  no tienen redundancia funcional y que los RT $\Delta\alpha$  controlan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales negativa- e independientemente de las HTs, actuando sobre los genes *CDX1* y *CDX2*. A su vez, los efectos de cada isoforma de RT $\alpha$  dependen de la concentración relativa entre ellos. Mientras que los RT $\Delta\alpha$  son desestabilizados por RT y degradados, la respuesta de RT $\alpha$  a T3 es bloqueada por RT $\Delta\alpha$ . Adicionalmente se sabe que, la sobreexpresión del RT $\alpha$ 1 es un factor que acelera el crecimiento tumoral y los procesos de metástasis en modelos tumorales con APC mutado (Sirakov y Plateroti, 2011). En estudios posteriores, Sirakov y Plateroti (2012) confirman que RT $\alpha$ 1 activa y sinergiza la vía WNT, con lo que promueve la proliferación y la tumorigénesis intestinal.

El proceso de proliferación y maduración intestinal y su control homeostático por los factores de transcripción TH-RT $\alpha$ 1 en ratones, resulta de una regulación compleja de genes y vías de señal, que incluyen WNT, Notch and BMP (Kress y col., 2009a). En el intestino de mamíferos, RT $\alpha$ 1 es el responsable de unirse al elemento de respuesta a hormonas tiroideas TRE-int1 del gen *CTNNB1*, promoviendo su expresión y translocación nuclear para activar la proliferación celular vía el factor de transcripción TCF4. En paralelo, RT $\alpha$ 1 también estimula la expresión de los genes de proliferación celular *ciclina-D* y *c-myc* (Plateroti y col., 2006) y de genes mitocondriales para estimular el metabolismo (Wrtniak-Cabello y col., 2000).

En nuestro modelo experimental de CCR, la expresión del receptor RT $\alpha$  disminuye significativamente a las 4 semanas y aún más a las 8 semanas. En función de lo que se describió precedentemente, estos resultados podrían explicar que los marcadores de proliferación celular, PCNA y ciclina D1, estén mayoritariamente disminuidos en nuestro modelo experimental.

Por su parte, el receptor RT $\beta$ 1 muestra un comportamiento bastante antagónico a RT $\alpha$  en la 4<sup>ta</sup> semana de CCR, al aumentar significativamente, mientras que en la 8<sup>va</sup> semana desciende significativamente. Se sabe que el RT $\beta$ 1, que es el más ubicuo, se une a RXR $\beta$  y reprime la expresión del gen de  $\beta$ -catenina al unirse a su promotor (Guigon y col., 2010), antagonizando con la actividad de RT $\alpha$ 1 y evitando la proliferación celular mediada por  $\beta$ -catenina. A su vez, la expresión de RT $\beta$ 1 es estimulada por T3 (Ranjan y col., 1994; Shi y Ishizuya-Oka 1997; Bucholz y col., 2007). Si bien los niveles de expresión de RT $\alpha$  y  $\beta$ -catenina en la 4<sup>ta</sup> semana de CCR disminuyeron, detectamos un aumento muy significativo de los ARNm de ciclina D1. Por ello, el aumento de los niveles de RT $\beta$  a 4 semanas del desarrollo del CCR, podría deberse a un intento celular de contrarrestar el efecto proliferativo que inducirá la ciclina.

### **Expresión de moléculas involucradas en la proliferación y diferenciación celular, durante la progresión tumoral**

El análisis de la proliferación de las células colónicas arrojó poca luz sobre el comportamiento tisular, ya que la expresión de PCNA disminuyó significativamente durante el desarrollo tumoral. En contraste, los niveles de ARNm de ciclina D1 aumentaron o disminuyeron muy significativamente a las 4 y 8 semanas del CCR, respectivamente.

Mientras se detectaron marcadores de proliferación (ciclina D1) en la 4<sup>ta</sup> semana del CCR, el marcador de diferenciación celular intestinal fosfatasa alcalina intestinal, disminuyó en forma extremadamente significativa y se recuperó en la 8<sup>va</sup> semana, coincidiendo con el descenso de ciclina D1 en la 8<sup>va</sup> semana.

### **Expresión de moléculas indicadoras de agresividad tumoral**

En contraste, los resultados hallados con los marcadores de malignidad tumoral fueron más interesantes. Los niveles de ARNm del factor angiogénico HIF-1A aumentaron ligera- pero significativamente en la 4<sup>ta</sup> semana, mientras que los de la integrina- $\alpha\beta$ 3 disminuyeron muy significativamente en la 8<sup>va</sup> semana.

El HIF1 (*Hypoxia-inducible factor 1*), es un factor de transcripción maestro que induce la transcripción de los genes involucrados en el metabolismo de las células madre. La adaptación celular a la hipoxia mediada por HIF1 en los tejidos, es un requisito para mantener la pluripotencia y la supervivencia de las células madre sometidas a condiciones de hipoxia. La actividad de HIF1 es estrictamente controlada por su subunidad alpha, HIF1 $\alpha$ /HIF1A. En nuestro modelo experimental, la 4<sup>ta</sup> semana de desarrollo del CCR parece ser metabólicamente más exigente y por ello aumentar la neovascularización.

Los tumores sólidos suelen poseer áreas hipóxicas, donde la tasa de proliferación de células tumorales supera la de neoformación de vasos sanguíneos. En estos contextos hipóxicos la angiogénesis suele estar relacionada a la vía de señalización mediada por HIF-1, la cual incluye las subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ . En condiciones fisiológicas, HIF-1 $\alpha$  es reconocida por el factor supresor de tumor von Hippel-Lindau (pVHL) y marcada para su degradación en la vía dependiente de ubiquitina. En contraste, en condiciones hipóxicas HIF-1 $\alpha$  no es reconocida por pVHL y por ello se acumula y dimeriza con HIF-1 $\beta$ , para translocar al núcleo. En el interior nuclear, HIF-1 $\alpha$  transcribe varios genes con múltiples efectos señalizadores. Mientras que HIF-1 $\beta$  se expresa constitutivamente, HIF-1 $\alpha$  solo se expresa y es regulada dependiente de los niveles de O<sub>2</sub> (Hitada y col., 2003). La privación de O<sub>2</sub> incrementa la señalización nuclear de HIF-1 $\alpha$ , la cual induce que las células tumorales experimenten un “switch” adaptativo para señalización angiogénica, metabolismo glucolítico (efecto Warburg) y subsiguiente micro metástasis. La adquisición tumoral de esta capacidad para responder al estrés micro ambiental puede conducir a su vez, a la resistencia tumoral a las terapias disponibles. Por ello, se considera que los niveles elevados de HIF-1 $\alpha$  probablemente incrementen el crecimiento tumoral, su vascularización y metabolismo glucolítico anaeróbico, reflejando el desarrollo de tumores clínicamente más agresivos, debido a la asociación con mutaciones del gen p53, cuyos fenotipos celulares evaden el arresto del ciclo celular y la apoptosis. Por estas razones, se ha sugerido que la expresión de HIF-1 $\alpha$  sería un marcador clínico de enfermedad agresiva, pobre pronóstico y resistencia a los tratamientos en diversos cánceres, incluyendo el CCR (Baba y col., 2010), que podrían involucrar interacciones tumor-estroma basadas en hipoxia.

En nuestro modelo experimental, el análisis de los ARNms de la subunidad  $\alpha$ v de la integrina- $\alpha\beta$ 3 muestra un cambio 8<sup>va</sup> semana de CCR, mostrando un descenso muy significativo. La integrina  $\alpha\beta$ 3 es un receptor específico de membrana de THs. Cuando T4 se une a él con mayor afinidad que T3, causa la activación de la cascada de señalización proliferante MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que actúa fosforilando proteínas que modificarán la expresión génica, al aumentar la expresión de ciclinas (Davis y col., 2008). Además, MAPK activada por HTs puede translocalizarse al núcleo e inducir fosforilación de los residuos de serina de los RTs, resultando en la inducción de angiogénesis o proliferación de células tumorales (Davis y col., 2000). Los genes blancos de los RTs-fosforilados incluyen los factores de transcripción p53, STAT1a y STAT3 (Lin y col., 1999). A su vez, MAPK-activa modulará el potencial de membrana al regular canales iónicos, activando las bombas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y de Ca<sup>+2</sup> o regulando componentes del citoesqueleto de actina anclados a la membrana celular (Klein y Ojama, 2001).



### **Influencia de la hormona L-T4 en la expresión de las moléculas involucradas en la arquitectura y función de las uniones adherentes y mantenimiento del epitelio del colon, durante la progresión tumoral**

El tratamiento hormonal con L-T4, en paralelo con la progresión tumoral, demostró efectos muy selectivos dependiendo del gen estudiado. Así, se observó un efecto represor incremental de L-T4 sobre el gen *CDH1*, de la 4<sup>ta</sup> a 8<sup>va</sup> semana de los bioensayos. En contraste a *CDH1*, el efecto transcripcional de L-T4 fue el opuesto para el gen *CTNNB1*, mostrando un control regulatorio positivo que llevó los niveles de ARNm a valores normales a las 8 semanas de tratamiento. Estos resultados son concordantes tanto con la activación de una ruta de señal genómica, la cual depende de la conversión intracelular de T4 a T3: RT $\alpha$ 1-T3  $\rightarrow$  *CTNNB1*  $\rightarrow$   $\beta$ -catenina  $\rightarrow$  translocación nuclear  $\rightarrow$  TCF4  $\rightarrow$  proliferación celular (Plateroti y col., 2006), como con la activación de una ruta no genómica y mediada por la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3-T4  $\rightarrow$  MAPK  $\rightarrow$  *CTNNB1*  $\rightarrow$   $\beta$ -catenina  $\rightarrow$  translocación nuclear  $\rightarrow$  TCF4/LEF  $\rightarrow$  proliferación celular. En concentraciones fisiológicas, la unión de T4 a la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 induce su internalización por múltiples mecanismos, aún no completamente dilucidados. En el citosol, donde se disociaría la subunidad  $\beta$ 3 y la subunidad  $\alpha$ v se uniría a la kinasa ERK1/2 fosforilada, el complejo integrina  $\alpha$ v-ERK1/2 activado translocaría al núcleo para regular la transcripción vía la unión de otros factores de transcripción. Se desconoce aún de qué manera se activaría la expresión de  $\beta$ -catenina para promover la proliferación celular, aunque numerosas evidencias lo colocan en el centro del escenario molecular responsable de la progresión del CCR (extensamente revisado en Yang y col., 2021). Otro de los mecanismos propuestos y demostrados en otros tipos de cáncer, plantean la siguiente secuencia de señales: vía integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3/PI3K/Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenina (Yi y col., 2016). Comportamientos similares, mostraron los genes *CTNNA1* y *CTNND1*. Sin embargo, el efecto regulatorio positivo de L-T4 fue significativo en la semana 4 del CCR para *CTNNA1*, mientras que fue extremadamente significativo para *Ctnnd1*, también en la 4<sup>ta</sup> semana. Los complejos adhesivos son funcionales si están conectados al citoesqueleto de actina. Por lo que el análisis mostró que la hormona L-T4 produjo efectos antagónicos sobre el gen *ACTB* y opuestos a los sucedido sin tratamiento hormonal. Mientras que se detectó un efecto regulatorio fuertemente represor a las 4 semanas, el mecanismo fue ligeramente activador aunque significativo a las 8 semanas.

Adicionalmente al rol de  $\alpha$ -catenina en la conexión de los complejos de unión adherente con el citoesqueleto de actina, esta catenina regula el tráfico vesicular intracelular asociada con el complejo dinactina (Lien y col., 2008), la dinámica de actina (Benjamin y col., 2010) y la proliferación celular, actuando como supresor de tumores (Schlegelmilch y col., 2011; Silvis y col., 2011). Algunos estudios sugieren que  $\alpha$ -catenina secuestra a Yap1 en el citosol, el coactivador transcripcional de la vía de señalización Hippo, involucrada en la proliferación epitelial y con ello en el tamaño de los órganos. Yap1 se localiza constitutivamente en el núcleo de células proliferantes, mientras que se ubica en el citoplasma de células no-proliferantes. La vía de señal Hippo está involucrada en la autorrenovación y diferenciación de las células madre de los tejidos de invertebrados a vertebrados mamíferos (Schlegelmilch y col., 2011; Silvis y col., 2011). Estas evidencias permiten hipotetizar, que al disminuir E-cadherina con la progresión tumoral, las cateninas asociadas a las uniones adherentes en disminución quedan libres en el citosol. De esta manera  $\alpha$ -catenina disminuiría el secuestro de Yap1, el cual translocaría al núcleo para activar la vía de señal Hippo proliferante. A su vez, el tratamiento hormonal con L-T4 ejercería un control génico de *CTNNA1*, aumentando su expresión. Mientras que nuestras investigaciones demostraron la presencia de TRE y un control regulatorio positivo directo de T3 sobre el gen *CTNNA1* en *Xenopus laevis* (Galletto y col., 2017), no se han realizado investigaciones en mamíferos que demuestren tal efecto. En nuestro conocimiento, la presente investigación constituiría el primer reporte sobre un control regulatorio positivo de las HTs sobre *Ctnna1* de mamíferos. Sin embargo, serán necesarias más investigaciones para determinar si el control sería ejercido en forma directa o indirecta y si sería por el metabolismo de L-T4 a T3a. Un contexto similar se presenta con p120-catenina, la cual al translocar al núcleo por descenso en las uniones adherentes promovería proliferación, migración e invasión celular en CCR (Ding y col., 2019).

A su vez, no se han encontrado reportes que analicen el rol de las HTs sobre *CTNND1* en mamíferos. Por todo ello, las rutas de control de HTs sobre los genes *CTNNA1* y *CTNND1* representan un interesante campo de análisis futuro.

Dado que no se produjo un control regulatorio positivo de L-T4 sobre *CDH1* para promover la formación de uniones adherentes y con ello, la inhibición por contacto de la proliferación celular, puede sugerirse que los efectos regulatorios positivos sobre *CTNNB1*, *CTNNA1* y *CTNND1*, promoverían los procesos de proliferación, migración y metástasis, potenciando otras rutas de señal a las mediadas por los cadhesomas.

El efecto dual, represor o activador, del tratamiento hormonal con L-T4 durante la progresión tumoral también fue evidente para las pequeñas GTPasas Rac1, Rap1, RhoA y Cdc42. Particularmente, L-T4 ejerce un control regulatorio positivo sobre *RAC1* a las 4 y 8 semanas, aunque los incrementos de ARNm fueron significativos solo en la 4<sup>ta</sup> semana. Este efecto activador de L-T4, fue opuesto al producido por la condición tumoral. En contraste, *RAP1* no parece responder al control hormonal de L-T4 en el colon murino tumoral, ni siquiera tardía- e indirectamente, tal como sucede en el tracto digestivo de *Xenopus laevis* (Galetto y col., 2017). Los niveles de ARNm de RhoA tampoco cambian con este tratamiento hormonal, solo que en este caso el resultado es coincidente con los reportados por Galetto y colaboradores (2017). Por su parte, el tratamiento con L-T4 reprimió -aún más que la condición tumoral- al gen *CDC42* en la 4<sup>ta</sup> semana, mientras que los activó muy significativamente en la 8<sup>va</sup> semana, sugiriendo la existencia de rutas de control cruzadas sobre este gen.

### ***Influencia de la hormona L-T4 en la expresión de las moléculas involucradas en la función y metabolismo de las hormonas tiroideas, durante la progresión tumoral***

Como se describió precedentemente, los efectos celulares y tisulares de las HTs son mediados, en general, por las concentraciones relativas de T4 superficial y de T3 intracelular, dependientes de las actividades de desiodinasas, así como del efecto transcripcional represor de los RT $\alpha$  o el efecto transcripcional activador de los RT $\beta$ . El tratamiento con L-T4, activó o amplificó la expresión de *DIO1*, la cual controla la conversión de T4 a T3 plasmática, sugiriendo un control de retroalimentación positiva, que permitiría disminuir los niveles de T4 plasmáticos y aumentar la disponibilidad de T3 para ingresar a las células. En el caso de la enzima intracelular Dio2, la hormona L-T4 produce una represión extremadamente significativa en la 4<sup>ta</sup> semana, sugiriendo la activación de un circuito de retroalimentación negativa, para controlar los niveles de T3 intracelular en un rango normal. Con efectos menos intensos pero de igual dirección que para *DIO2*, L-T4 ejerce un efecto represor sobre *DIO3* a las 4 y 8 semanas de progresión tumoral. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los tumores de colon se han desarrollado en un ambiente eutiroideo o ligeramente hipertiroideo, que podría estar actuando fundamentalmente a través de acciones genómicas mediadas por T3.

En relación con los RTs, el tratamiento con L-T4, reprimió o activó significativamente la expresión de *THRA* y *THRB*, a las 4 y 8 semanas, respectivamente. Aunque en diferente magnitud, L-T4 produjo el mismo efecto para ambos genes. Estos efectos fueron opuestos a los producidos por la progresión tumoral del modelo de estudio. Tomados juntos, estos resultados sugieren que los ambientes celulares eutiroideos o ligeramente hipertiroideos (ricos en hormona T3), reprimirían la expresión de los RTs, intentando morigerar los efectos transcripcionales proliferativos.

Algunas investigaciones han demostrado que la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina afecta directamente la señalización de HTs en las células de cáncer de colon, por un mecanismo dual convergente (Dentice y col., 2012). Así,  $\beta$ -catenina regula negativamente la expresión de Dio2, activante de T4 a T3 y positivamente la de Dio3, inactivante de T4 a TrT3 y de T3 a T2. Durante la maduración del epitelio intestinal de mamíferos, la enzima Dio3 se expresa principalmente en las células proliferativas de las regiones basales y primer tercio de las criptas, disminuyendo gradualmente hasta tornarse casi indetectable en la zona apical de

la vellosidad, donde se encuentran las células epiteliales diferenciadas (Dentice y col., 2013). Este patrón de expresión se correlaciona con el correspondiente al gen *THRA* ( $RT\alpha$ ) (Kress y col., 2010) y está asociado con la tasa de proliferación de las células precursoras de amplificación en tránsito. En contraposición a lo esperado, la expresión de *Dio3* se correlaciona negativamente con el grado histológico de la lesión, expresándose en altos niveles en los adenomas y disminuyendo en estados más avanzados y proliferantes del cáncer de colon (Dentice y col., 2012). Un subgrupo de células madre cancerosas (*cancer stem cells*, CSCs), sería responsable del inicio, organización y mantenimiento de los tumores colo-rectales (Dhawan y col., 2011). En nuestro modelo experimental los niveles de *Dio3* incrementan mucho a las 4 semanas y aunque permanecen aumentados respecto al t0, exhiben un descenso notorio a las 8 semanas respecto a los tumores de 4 semanas, coincidiendo con lo reportado por Dentice y col. (2012).

En los últimos años se ha avanzado en la comprensión de algunos mecanismos moleculares que ponen al descubierto el complejo control tiroideo a nivel intestinal murino (para más detalles, ver Sirakov y col., 2012; Dentice y col., 2012). En las células intestinales murinas, el receptor  $TR\alpha 1$  se une al intrón 1-TRE (TRE-int1) del gen  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), aumentando su expresión vía la unión de T3. En paralelo,  $TR\alpha 1$  regula positivamente los genes que controlan la proliferación celular, tales como ciclina-D y c-myc, los cuales a su vez, son blanco de la señal Wnt/ $\beta$ -catenina. Adicionalmente, el aumento de  $\beta$ -catenina/Tcf4, reduce la actividad transcripcional de  $TR\alpha 1$  sobre sus genes blanco. Por otra parte, la transrepresión del gen *CTNNB1* es mediada por la unión de los complejos  $TR\beta$ -RXR a los elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TREs) del promotor.

### **Influencia de la hormona L-T4 en la expresión de moléculas involucradas en la proliferación y diferenciación celular, durante la progresión tumoral**

Si bien era esperable que en un estado tumoral la proliferación celular estuviese notablemente aumentada, en el presente modelo experimental solo se detectó un moderado aumento de expresión de *CCND1*, pero no de *PCNA* en la 4<sup>ta</sup> semana del CCR. Como mostramos precedentemente, nuestro modelo tumoral cursa con represión de *CTNNB1*, *THRA*, *PCNA* y *CNND1*, excepto por el aumento de los niveles de expresión de ciclina D en la 4<sup>ta</sup> semana del CCR y de *THRA* en la 8<sup>va</sup> semana, que sugieren baja proliferación celular de la mucosa del colon. Al tratar los animales con L-T4, los efectos fueron diferentes para ambos marcadores y en función de la semana de progresión tumoral. Mientras L-T4 ejerció un control fuertemente represor sobre *CCND1* en la 4<sup>ta</sup> semana, el efecto fue activador en la 8<sup>va</sup> semana. En el caso de *PCNA*, su expresión fue reprimida por L-T4 en la semana 8 de progresión tumoral. Como se sabe, *CCND1* tiene una regulación multifactorial muy compleja (Witzel y col., 2010), que dan cuenta de resultados opuestos según la semana del bioensayo analizada. Por un lado, se ha encontrado en líneas celulares que el complejo  $RT1$ -T3 inhibe la transcripción de ciclina D1 vía la transactivación de  $\beta$ -catenina-sitio 1 Tcf/Lef, el cual es positivamente regulado por la vía de señalización Wnt (Natsume y col., 2003). Por otro lado, trabajando con líneas celulares y ratones transgénicos, se encontró que los  $RT\beta$  mutantes no unidos a ligandos actúan vía la ruta señal Ciclina D1/ Kinasa Dependiente de Ciclina/ Retinoblastoma/E2F y promueven tumorigénesis *in vivo* (Furumoto y col., 2005).

En el caso de *PCNA*, los estudios de Davis y col. (2006) mostraron que T4 actúa sobre el receptor de superficie integrina  $\alpha v\beta 3$ , el cual activa la ruta de señal MAPK, provocando la acumulación de *PCNA* nuclear y la síntesis de ADN, lo que lleva al aumento de proliferación de células de glioblastoma humano.

El tratamiento con L-T4 produjo un aumento muy significativo de los niveles de expresión de fosfatasa alcalina intestinal en la 4<sup>ta</sup> semana del CCR, pero tendió al descenso en la 8<sup>va</sup> semana de progresión tumoral. Estos resultados sugieren que en las etapas más tempranas del desarrollo tumoral, la hormona T4 promueve la expresión de marcadores de diferenciación de enterocitos, soportando la hipótesis aquí planteada. Malo y colaboradores (2004) demostraron que el promotor del gen *ALPI* posee un TRE que une al  $RT\beta 1$  con mínima afinidad, mientras que no une al  $RT\alpha 1$  ni al  $RXR\alpha$ . Sin embargo, en presencia

del heterodímero RT-RXR $\alpha$  éste se une a IAP-TRE. Si bien no pudieron dilucidar completamente el mecanismo de activación, demostraron que T3 induce un efecto regulador positivo de la expresión de ALPI.

### **Influencia de la hormona L-T4 en la expresión de moléculas indicadoras de agresividad tumoral**

Se detectó un claro efecto represor de L-T4 sobre el gen de la subunidad *ITGAV*, aunque solo en la 4<sup>ta</sup> semana del CCR, lo que sugiere una disminución de los efectos no genómicos de las HTs vía este receptor. A través de la detección de los ARNm de esta subunidad, estamos suponiendo *ITGB3* se expresa en igual magnitud. Si bien se ha establecido la asociación entre el cáncer colo-rectal humano y la hiperexpresión de *ITGAV* (Linhares y col., 2015), nuestro modelo de CCR mostró un descenso importante en su expresión a las 8 semanas de progresión tumoral. A su vez, el tratamiento con T4 incrementó la expresión del gen en la semana 4 del modelo, disminuyendo la agresividad de las células tumorales.

Mientras que se han establecido rutas no genómicas de señalización mediadas por T4 (Davis y col., 2008) y T3 (Flamini y col., 2017) sobre el receptor de superficie celular integrina  $\alpha v \beta 3$ , tanto de células normales como cancerosas. Como comentamos previamente, cuando T4 se une a él activa la cascada de señalización proliferante MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que actúa fosforilando proteínas que modificarán la expresión génica, al aumentar la expresión de ciclinas (Davis y col., 2008). Si además MAPK activada por HTs transloca al núcleo, induce fosforilación de los residuos de serina de los RTs, resultando en la inducción de angiogénesis o proliferación de células tumorales (Davis y col., 2000). Si en cambio, T3 se une a este receptor ubicado en ciertas células cancerosas induce la fosforilación de la cascada Src/FAK/PI3K y promueve la movilidad de las células cancerosas (Flamini y col., 2017). Por el contrario, no se han encontrado investigaciones que analicen el rol de las hormonas tiroideas en la expresión de este receptor, marcando la importancia de los aportes de la presente investigación, así como mostrando la necesidad de futuros estudios en este campo.

En contraste con los resultados obtenidos con integrina  $\alpha v \beta 3$ , el presente modelo demostró un rol pro-angiogénico de esta hormona, al ejercer un efecto regulador positivo sobre el gen *HIF1A*, el cual resultó de mayor magnitud en la 8<sup>va</sup> semana de tratamiento. Estudiando la activación de HIF-1 dependiente de T3 en células cancerosas de hígado, riñón y pulmón, se encontró que T3 aumenta los niveles de ARNm y proteína de la subunidad HIF-1 $\alpha$  en pocas horas vía la activación del heterodímero RT $\beta$ -RXR $\alpha$ . T3 no tiene un efecto directo en la transcripción de HIF-1 $\alpha$ , sino que indirectamente al unirse al complejo RT $\beta$ -RXR $\alpha$ , estimula la expresión del factor de la leucemia hepática (*LEF*), el cual incrementará la expresión de HIF-1 $\alpha$  (Otto y Fandrey, 2008).

Algunos resultados pueden interpretarse antagónicos a lo que sucede en anuros (Galletto y col., 2017), sin embargo, en los modelos experimentales de anuros se empleó T3 y en éstos L-T4. A la luz de la compleja regulación que involucra a las HTs (Kress y col., 2010; Hercbergs y col., 2018; Bianco y col., 2019), serán necesarios más estudios para clarificar el comportamiento de las HTs en la evolución del CCR.

A diferencia de nuestros modelos experimentales en anuros, en los cuales tratábamos, por inmersión, las larvas con la hormona activa T3, en el presente proyecto tratamos por vía oral a mamíferos adultos con levotiroxina (L-T4), la cual actúa superficialmente a través de mecanismos no genómicos, así como intracelularmente y por mecanismos genómicos al convertirse a T3 (Izaguirre y Casco, 2016; Izaguirre y col., 2018). En contraste al proceso fisiológico de maduración de la barrera epitelial del tracto digestivo inducido por T3 en anuros y ratones, en el que se produce una regulación positiva de *CADH1*, *CTNNB1*, *CTNNA1*, *RAC1* y *RAP1* (Sirakov y Plateroti, 2011; Izaguirre y Casco, 2016) (Tabla 3), en las presentes investigaciones, la influencia de T4 mostró un comportamiento atenuado sobre algunos de estos genes, aunque los mismos fueron evaluados en un ambiente fisiopatológico tumoral, en el cual no han sido caracterizadas las mutaciones generadas.

**Tabla 3.** Resumen de los resultados más relevantes obtenidos de la evaluación de la expresión génica del conjunto de moléculas analizadas.

Molécula	Anuros ( <i>X. laevis</i> , <i>R. arenarum</i> )	Mamíferos ( <i>Mus musculus</i> )	
	Tracto gastrointestinal normal + T3	Tumor colon	Tumor colon + L-T4
E-cadherina	↑	↓**	S/C
b-Catenina	↑	↓**	↑**
a-Catenina	↑	↓**	↑*
p120-Catenina	S/C	↓***4S y ↑***8S	↑**
b-Actina	N	↑***4S ↓***8S	↓***4S y ↑*8S
Rap1	↑	↓*	S/C
Rac1	↑	↓*	↑*
RhoA	↓	↓**	S/C
Cdc42	S/C	↓**	↓*4S y ↑*8S
RTa1	N	↓**	↓*4S y ↑**8S
RTb1	N	↑*4S y ↓*8S	↓**4S y ↑**8S
Dio1	N	↓**	↑*
Dio2	N	↑***	↓***
Dio3	N	↑***	↓**
PCNA	N	↓**	↓*
Ciclina D1	N	↑**4S ↓**8S	↓***4S y ↑*8S
FAi	N	↓***	↑**
Integrina avb3	N	↓**	↓***
HIF-1A	N	↑*	↑**

Referencias: aumento de los niveles de expresión (↑), disminución de los niveles de expresión (↓), niveles de expresión sin cambios significativos (S/C), No analizada (N), 4 semanas de bioensayo (4S), 8 semanas de bioensayo (8S). La significatividad de los valores de colon tumoral de 4 y 8 semanas se consigna comparados a los valores de los controles a t0, mientras que la de los animales tratados con T4 son relativos a los de la misma semana sin tratar hormonalmente.

Las expresiones de *CADH1* y *RAP1* no fueron modificadas significativamente por el tratamiento con T4, mientras que las de *CTNNB1* y *CTNNA1* y *RAC1 1* fueron reguladas positivamente. Mientras que en anuros, T3 no modificó la expresión de *CTNND1* ni de *CDC42* mientras que reprimió la de *RHOA* durante la metamorfosis del tracto digestivo (Galletto y col., 2017). En contraste, en la mucosa del colon tumoral murino, T4 ejerce un efecto regulatorio positivo sobre *CTNND1*, una represión o una activación de *CDC42* dependiendo del estadio tumoral y no modifica la de *RHOA*.

Mientras que en la tabla 3 se consignan en forma resumida el comportamiento de 20 moléculas involucradas en los procesos de adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, durante el desarrollo del CCR murino y bajo la influencia de la hormona T4, pueden extraerse conclusiones generales.

El CCR murino desarrollado por exposición a AOM+DSS reprimió fuertemente la expresión de *CDH1* y también las de *CTNNB1* y *CTNNA1*, lo cual puede afectar sustancialmente la configuración de las uniones adherentes mediadas por E-cadherina y el establecimiento y funcionalidad de la barrera epitelial (Izaguirre y Casco, 2016; Izaguirre y col., 2018; 2019). Paralelamente, reprimió tempranamente o estimuló más tardíamente la expresión de *CTNND1*. Este resultado es interesante, ya que se ha postulado que *CTNND1* puede funcionar como un oncogén o un gen supresor de tumor en diversos cánceres, regulando

varias rutas señal tales como MAPK, ROCK y la vía Wnt (Kourtidis y col., 2013; Schackmann y col., 2013), mecanismo que podría estar involucrado en promover la translocación al núcleo de p120-catenina para promover la proliferación, migración e invasión celular en CCR (Ding y col., 2019). Dependiendo el modelo de análisis y el tipo de cáncer, se ha detectado que la *up regulation* de CTNND1 es capaz de activar la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, promoviendo la proliferación celular y la metástasis. En otros casos su delección facilitaría la metástasis y la resistencia al anoikis, al activar rutas de señalización dependientes de receptores de factores de crecimiento. Particularmente, la *down regulation* de CTNND1 en el CRC se puede asociar con mayor patogenicidad y deterioro clínico, mientras que estudios de *knockdown* inhiben la proliferación, la migración y la invasión (revisado por Ding y col., 2019).

Un hecho de interés es que nuestro modelo tumoral provocó la represión de PCNA, cuyo producto es un marcador de proliferación celular y el tratamiento con T4 reprimió más aún su expresión, ejerciendo un rol anti-proliferativo. Sin embargo, un resultado muy diferente y antagónico al obtenido con PCNA se obtuvo con la expresión de CCND1, dependiendo del estadio tumoral y de la regulación hormonal, evidenciando la complejidad que existe en la regulación génica de esta ciclina (Witzel y col., 2010). El CCR también produjo represión de ALPI, sugiriendo un escenario anti diferenciante, el cual podría ser mitigado por el efecto regulatorio positivo ejercido por T4, fundamentalmente en etapas más tempranas del CCR.

Así como los resultados del análisis del colon tumoral sugieren un escenario de baja estimulación de la proliferación, la movilidad y agresividad celular mediada por integrina  $\alpha v \beta 3$  estaría reprimida o atenuada. Paralelamente, hemos demostrado que a pesar de ser la integrina  $\alpha v \beta 3$  un receptor de superficie celular T4 que activa mecanismos de proliferación celular, el gen de la subunidad integrina  $\alpha v$ , ITGAV, tendría elementos de control negativo para las HTs, capaces de contrarrestar los efectos no genómicos proliferativos. Finalmente, la hipoxia producida en nuestro modelo experimental solo estimuló levemente la expresión de HIF1A en etapas tempranas del CCR. Sin embargo, la acción de T4 regula positivamente este gen, favoreciendo la neovascularización y con ello el aporte nutricional, lo cual fue asociado con una aparente mejora en el estado clínico de los ratones comparado con los no tratados hormonalmente.

La cantidad y variedad de cascadas señal de regulación cruzada que presentan estos genes, indudablemente requerirán emplear más sistemas experimentales animales *in vivo*, que logren desentrañar su interdependencia.

## REFERENCIAS

- AHO S, Rothenberger K & Uitto J (1999). Human p120ctn catenin: tissue-specific expression of isoforms and molecular interactions with BP180/type XVII collagen. *J Cell Biochem* 73(3): 390-399.
- ANASTASIADIS PZ (2007). P120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochem Biophys Acta* 1773: 34-46.
- ANDERSON ARA, Chaplain MAJ & Rejniak KA (2007). Single-cell-based models in biology and medicine. *Mathematics and Biosciences in Interaction*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland.
- BENJAMIN JM, Kwiatkowski AV, Yang C, Korobova F, Pokutta S, Svitkina T, Weis WI & Nelson WJ (2010). AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 189: 339-352.
- BABA Y, Noshio K, Shima K, Irahara N, Chan AT, Meyerhardt JA, Chung DC, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S (2010). HIF1A overexpression is associated with poor prognosis in a cohort of 731 colorectal cancers. *Am J Pathol* 176(5): 2292-2301.
- BIANCHI M, Adur J, Izaguirre MF, Viale S, Cesar CL & Casco VH (2013). Endothelin-2 differential expression in normal and early-stages of colon cancer development. *J Cancer Therapy* 4: 26-33.
- BIANCHI M, Adur J, Ruff SY, Izaguirre MF, Carvalho HF, Cesar CL & Casco VH (2014). Mouse colorectal

- cancer an early detection approach using nonlinear microscopy. *Biomed Mater Eng* 24: 3419-3426.
- BIANCO AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ & Larsen PR (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23: 38-89.
- BIANCO AC, Dumitrescu A, Gereben B, Ribeiro MO, Fonseca TL, Fernandes GW & Bocco BMLC (2019). Paradigms of dynamic control of thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 40(4): 1000-1047.
- BOELEN A, Kwakkel J, Alkemade A, Renckens R, Kaptein E, Kuiper G, Wiersinga WM & Visser TJ (2005). Induction of type 3 deiodinase activity in inflammatory cells of mice with chronic local inflammation. *Endocrinology* 146: 5128-5134.
- BOS JL (2005). Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 17: 123-128.
- BRAGA V (2000). Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Exp Cell Res* 261: 83-90.
- BRAGA VM & Yap AS (2005) The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signaling. *Curr Opin Cell Biol* 17: 466-474.
- BROWN AR, Simmen RCM & Simmen FA (2013). The role of thyroid hormone signaling in the prevention of digestive system cancers. *Int J Mol Sci* 14: 16240-16257.
- BUCHHOLZ DR, Heimeier RA, Biswajit D, Washington T & Shi YB (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.
- CERNAT L, Blaj C, Jackstadt R, Brandl L, Engel J, Hermeking H, Jung A, Kirchner T & Horst D (2014). Colorectal cancers mimic structural organization of normal colonic crypts. *PLoS ONE* 9(8): e104284.
- CORPET D & Pierre F (2003). Point: from animal models to prevention of colon cancer. Systematic review of chemoprevention in min mice and choice of the model system. *Cancer Epidem Biomar Prev* 12: 391-400.
- DANIEL JM, Reynolds AB (1999) He catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol* 19: 3614-3623.
- DAVIS, PJ, Shih, A, Lin, HY, Martino, LJ & Davis, FB (2000). Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem* 275(48): 38032-38039.
- DAVIS FB, Tang HY, Shih A, Keating T, Lansing L, Hercbergs A, Fenstermaker RA, Mousa A, Mousa SA, Davis PJ & Lin HY (2006). Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res* 66(14): 7270-7275.
- DAVIS PJ, Leonard JL & Davis FB (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol* 29: 211-218.
- DENTICE M, Luongo C, Huang S, Ambrosio R, Elefante A, Mirebeau-Prunier D, Zavacki AM, Fenzi G, Grachtchouk M, Hutchin M, Dlugosz AA, Bianco AC, Missero C, Larsen PR & Salvatore D (2007). Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14466-14471.
- DENTICE M & Salvatore D (2011). Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol* 209: 273-282.
- DENTICE M, Luongo C, Ambrosio R, Sibilio A, Casillo A, Iaccarino A, Troncone G, Fenzi G, Larsen PR & Salvatore D (2012).  $\beta$ -Catenin regulates deiodinase levels and thyroid hormone signaling in colon cancer cells. *Gastroenterology* 143: 1037-1047.
- DENTICE M, Antonini A & Salvatore D (2013). Type 3 deiodinase and solid tumors: an intriguing pair. *Expert Opin Ther Targets* 17(11): 1369-1379.
- DENTICE M, Ambrosio R, Damiano V, Sibilio A, Luongo C, Guardiola O, Yennek S, Zordan P, Minchiotti G, Colao A, Marsili A, Brunelli S, Del Vecchio L, Larsen PR, Tajbakhsh S & Salvatore D (2014). Intracellular inactivation of thyroid hormone is a survival mechanism for muscle stem cell proliferation and lineage progression. *Cell Metab* 20: 1038-1048.



- DHAWAN P, Ahmad R, Srivastava AS & Singh AB (2011). Cancer stem cells and colorectal cancer: an overview. *Curr Top Med Chem* 11: 1592-1598.
- DING X, Du J, Mao K, Wang X, Ding Y, Wang F (2019). MicroRNA-143-3p suppresses tumorigenesis by targeting catenin- $\delta 1$  in colorectal cancer. *Onco Targets Ther* 12: 3255-3265.
- DUGINA V, Zwaenepoel I, Gabbiani G, Clément S & Chaponnier C (2009).  $\beta$ - and  $\gamma$ -cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Sci* 122(16): 2980-2988.
- DYDENSBERG AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E & Beaulieu JF (2006). Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(5): G1067-1074.
- KHEIRELSEID EA, Chang KH, Newell J, Kerin MJ & Miller N (2010). Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol Biol* 11, 12.
- KOURTIDIS A, Ngok SP & Anastasiadis PZ (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116: 409-432.
- FAY DS & Gerow K (2013). A biologist's guide to statistical thinking and analysis. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community 1-54 pp. doi/10.1895/wormbook.1.159.1. 39.
- FLAMINI MI, Uzair ID, Pennacchio GE, Neira FJ, Mondaca JM, Cuello-Carrión FD, Jahn GA, Simoncini T & Sanchez AM (2017). Thyroid hormone controls breast cancer cell movement via integrin  $\alpha V/\beta 3$ /SRC/FAK/PI3-Kinases. *Horm Canc* 8: 16-27.
- FURUMOTO H, Ying H, Chandramouli GV, Zhao L, Walker RL, Meltzer PS, Willingham MC, Cheng SY (2005). An unliganded thyroid hormone beta receptor activates the cyclin D1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma/E2F pathway and induces pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 25(1): 124-135.
- GALETTO CD (2016). Rol de la adhesión mediada por cadherina E. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
- GALETTO CD, Izaguirre MF & Casco VH (2017). In Vivo study of epithelial adhesion via E-cadherin- $\beta$ - and  $\alpha$ -catenin-small GTP-binding proteins under T3 regulation. *J Cell Signal* 2: 142.
- GLAZIER JA, Balter A & Poplawski NJ (2007). Magnetization to morphogenesis: a brief history of the Glazier-Graner-Hogeweg model. In: Anderson ARA, Chaplain MAJ, Rejniak KA, editors. *Single-Cell-Based Models in Biology and Medicine*. Birkhäuser-Verlag; Basel, Switzerland: p. 79.
- GOLD JS, Reynolds AB & Rimm DL (1998). Loss of p120ctn in human colorectal cancer predicts metastasis and poor survival. *Cancer Lett* 132: 1-2.
- GROSHEVA I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (2001) p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114: 695-707.
- GUIGON CJ, Kim DW, Zhu X, Zhao L & Cheng SY (2010). Tumor suppressor action of liganded thyroid hormone receptor beta by direct repression of betacatenin gene expression. *Endocrinology* 151: 5528-5536.
- HANKEY W, Frankel WL & Groden J (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev* 37(1): 159-172.
- HATZFELD M (2007). Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et Biophysica Acta* 1773(1): 69-77.
- HERCBERGS A, Mousa SA, Leinung M, Lin HY & Davis PJ (2018). Thyroid hormone in the clinic and breast cancer. *Hormones and Cancer* 9: 139-143.
- HOGAN C, Serpente N, Cogram P, Hosking CR, Bialucha CU, Feller SM, Braga VM, Birchmeier W & Fujita Y (2004). Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol Cell Biol* 24(15): 6690-6700.
- HOSHINO T, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Kimura T & Takai Y (2005). Regulation of E-cadherin endocyto-

- sis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn. *J Biol Chem* 280(25): 24095-24103.
- IISHI I, Tatsuta M, Babal M, Yamamoto R & Taniguchi H (1993). Enhancement by thyroxine of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats *H Br J Cancer* 68: 515-518.
- INCERPI S, Davis PJ, Pedersen JZ & Lanni A (2018). Nongenomic actions of thyroid hormones. In: Belfiore A, LeRoith D (eds). *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. Endocrinology. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_32).
- IRETON RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Matrisian L, Bundy LM, Sealy L, Gilbert B, van Roy F & Reynolds AB (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159: 465-476.
- IZAGUIRRE MF (2003). Influencia de la expresión de las moléculas de adhesión celular en el desarrollo embrionario, larval y metamórfico de *Bufo arenarum*". Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
- IZAGUIRRE MF & Casco VH (2010). T3 regulates E-cadherin, and  $\beta$ - and  $\alpha$ -catenin expression in the stomach during the metamorphosis of the toad *Rhinella arenarum*. *Biotech Histochem (USA)* 85: 305-323.
- IZAGUIRRE MF, Larrea D, Adur JF, Diaz-Zamboni JE, Vicente N, Galetto CD & Casco VH (2010). E-cadherin role in epithelial architecture maintenance. *Cell Commun Adhes* 17 (1): 1-12.
- IZAGUIRRE MF & Casco VH (2016). E-cadherin roles in animal biology: A perspective on thyroid hormone-influence. *Cell Commun Signal* 14(1): 27.
- IZAGUIRRE MF, Galetto CD & Casco VH (2018). Physiological regulation of E-cadherin adhesiveness. *J Cell Signal* 3: 1000182.
- IZAGUIRRE MF, Galetto CD, Baró L & Casco VH (2019). E-cadherin dysfunction and cancer. *J Biosci Medicines* 7: 42-67.
- KESTER MH, Kuiper GG, Versteeg R & Visser T (2006). Regulation of type III iodothyronine deiodinase expression in human cell lines. *Endocrinology* 147: 5845-5854.
- KESTER MH, Toussaint MJ, Punt CA, Matondo R, Aarnio AM, Darras VM, Everts ME, de Bruin A & Visser TJ (2009). Large induction of type III deiodinase expression after partial hepatectomy in the regenerating mouse and rat liver. *Endocrinology* 150: 540-545.
- KIM SH, Li Z & Sacks DB (2000). E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *J Biol Chem* 275(47): 36999-37005.
- KIM SW, Park JI, Spring CM, Sater AK, Ji H, et al. (2004) Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat Cell Biol* 6: 1212-1220.
- KITADA T, Seki S, Sakaguchi H, Sawada T, Hirakawa K & Wakasa K (2003). Clinicopathological significance of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in human pancreatic carcinoma. *Histopathology* 43(6): 550-555.
- KITAYAMA H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y & Noda M (1989). A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 56: 77-84.
- KLEIN I & Ojamaa K (2001). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England J Medicine* 344(7): 501-509.
- KRASHIN E, Piekietko-Witkowska A, Ellis M & Ashur-Fabian O (2019). Thyroid hormones and cancer: a comprehensive review of preclinical and clinical studies. *Front Endocrinol* 10:59.
- KRESS E, Samarut J & Plateroti M (2009a). Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Mol Cell Endocrinology* 313(1-2): 36-49.
- KRESS E, Rezza A, Nadjar J, Samarut J & Plateroti M (2009b). The frizzled-related sFRP2 gene is a target of thyroid hormone receptor  $\alpha$ 1 and activates beta-catenin signaling in mouse intestine. *J Biol Chem* 284: 1234-1241.

- KRESS E, Skah S, Sirakov M, Nadjar J, Gadot N, Scoazec JY, Samarut J & Plateroti M (2010). Cooperation between the thyroid hormone receptor TR $\alpha$ 1 and the WNT pathway in the induction of intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 138(5): 1863-1874.
- LAMPUGNANI MG, Zanetti A, Bre via rio F, Balconi G, Orsenigo F, Corada M, Spagnuolo R, Betson M, Braga V & Dejana E (2002). VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol Biol Cell* 13(4): 1175-1189.
- LARSEN PR, Silva JE & Kaplan MM (1981). Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocr Rev* 2: 87-102.
- L'HEUREUX A, Wieland DR & Weng C (2019). Association between thyroid disorders and colorectal cancer risk in adult patients in Taiwan. *JAMA Netw Open* 2(5): e193755.
- Li WW, Le Goascogne C, Ramauge M, Schumacher M, Pierre M & Courtin F (2001). Induction of type 3 iodothyronine deiodinase by nerve injury in the rat peripheral nervous system. *Endocrinology* 142: 5190-5197.
- LI L, Wang S, Jezierski A, Moalim-Nour L, Mohib K, Parks RJ, Retta SF, Wang L (2010). A unique interplay between Rap1 and E-cadherin in the endocytic pathway regulates self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28(2): 247-257.
- LIN HY, Davis FB, Gordinier JK, Martino LJ & Davis PJ (1999). Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am J Physiol* 276(5): C1014-C1024.
- LINHARES MM, Affonso RJ Jr, Viana Lde S, Silva SR, Denadai MV, de Toledo SR & Matos D (2015). Genetic and immunohistochemical expression of integrins ITGA5, ITGA6, and ITGA3 as prognostic factor for colorectal cancer: models for global and disease-free survival. *PLoS One* 10(12): e0144333.
- LUBER B, Candidus S, Handschuh G, Mentele E, Hutzler P, Feller S, Voss J, Höfler H & Becker KF (2000). Tumor-derived mutated E-cadherin influences  $\beta$ -catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun* 7: 391-408.
- MAIA AL, Berry MJ, Sabbag R, Harney JW & Larsen PR (1995). Structural and functional differences in the *dio1* gene in mice with inherited type 1 deiodinase deficiency. *Mol Endocrinol* 9: 969-980.
- MAIA AL, Goemann IM, Souza Meyer EL & Magagnin Wajner S (2011). Type 1 Iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinology* 209 (3): 283.
- MALO MS, Zhang W, Alkhoury F, Pushpakaran P, Abedrapo MA, Mozumder M, Fleming E, Siddique A, Henderson JW & Hodin RA (2004). Thyroid hormone positively regulates the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase gene via an atypical response element. *Mol Endocrinol* 18(8): 1941-1962.
- MORTAZAVI F, An J, Dubinett S & Rettig M (2010). P120-catenin is transcriptionally downregulated by FOXC2 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 8: 762-774.
- NATSUME H, Sasaki S, Kitagawa M, Kashiwabara Y, Matsushita A, Nakano K, Nishiyama K, Nagayama K, Misawa H, Masuda H, Nakamura H (2003). Beta-catenin/Tcf-1-mediated transactivation of cyclin D1 promoter is negatively regulated by thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 309(2): 408-413.
- NOREN NK, Liu BP, Burrridge K & Kreft B (2000). P120-catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150: 567-580.
- NOREN NK, Niessen CM, Gumbiner BM & Burrridge K (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem* 276: 33305-33308.
- OTTO T & Fandrey J (2008). Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  gene expression through thyroid hormone receptor  $\beta$ /retinoid x receptor  $\alpha$ -dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology* 149(5): 2241-2250.
- OZAWA M & Kemler R (1990). Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J Cell Biol* 111: 1645-1650.
- PARK JI, Kim SW, Lyons JP, Ji H, Nguyen TT, Cho K, Barton MC, Deroo T, Vleminckx K, Moon RT & McCrea

- PD (2005). Kaiso/p120catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell* 8: 843-854.
- PERTZ O, Bozic D, Koch AW, Fauser C, Brancaccio A & Engel J (1999). A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J* 18: 1738-1747.
- PIETERS T (2012). Functions of p120ctn isoforms in cell-cell adhesion and intracellular signaling. *Front Biosci* 17(5): 1669-1694.
- PLATEROTI M, Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Freund JN, Samarut J & Keding M (1999). Involvement of T3Ralpha- and beta-receptor subtypes in mediation of T3 functions during postnatal murine intestinal development. *Gastroenterology* 116 (6): 1367-1378.
- PLATEROTI M, Gauthier K, Domon-Dell C, Freund J-N, Samarut J & Chassande O (2001). Functional interference between thyroid hormone receptor  $\alpha$  (TR $\alpha$ ) and natural truncated TR $\Delta\alpha$  isoforms in the control of intestine development. *Mol Cell Biol* 21(14): 4761-4772.
- PLATEROTI M, Kress E, Mori JI & Samarut J (2006). Thyroid hormone receptor alpha1 directly controls transcription of the beta-catenin gene in intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol* 26: 3204-3214.
- POKUTTA S, Herrenknecht K, Kemler R & Engel J (1994). Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem* 223: 1019-1026.
- PROKHORTCHOUK A, Hendrich B, Jorgensen H, Ruzov A, Wilm M, et al. (2001) He p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15: 1613-1618.
- RANJAN M, Wong J & Shi YB (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.
- RUBIO CA & Schmidt PT (2020). Asymmetric crypt fission in sessile serrated lesions. *J Clin Pathol* 0: 1-6.
- SCHACKMANN RC, Tenhagen M, van de Ven RA & Derksen PW (2013). P120-catenin in cancer—mechanisms, models and opportunities for intervention. *J Cell Sci* 126(Pt 16): 3515-3525.
- SCHLEGELMILCH K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JR, Zhou D, Kreger BT, Vasioukhin V, Avruch J, Brummelkamp TR & Camargo FD (2011). Yap1 acts downstream of  $\alpha$ -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 144: 782-795.
- SCHWAMBORN JC & Püschel AW (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci* 7: 923-929.
- SHI Y-B & 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(1): 9-18.
- SILVIS MR, Kreger BT, Lien WH, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, Lantz DM, Seykora JT, Vasioukhin V (2011).  $\alpha$ -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal* 4: ra33.
- SIMÕES-CORREIA J, Figueiredo J, Oliveira C, van Hengel J, Seruca R, van Roy F & Suriano G (2008). Endoplasmic reticulum quality control: a new mechanism of E-cadherin regulation and its implication in cancer. *Human Mol Genetics* 17: 3566-3576.
- SIPOS F, Molnár B, Zágoni T, Berczi L & Tulassay Z (2005). Growth in epithelial cell proliferation and apoptosis correlates specifically to the inflammation activity of inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis shows specific p53- and EGFR expression alterations. *Dis Colon Rectum* 48: 775-786.
- SIRAKOV M & Plateroti M (2011). The thyroid hormones and their nuclear receptors in the gut: from developmental biology to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1812: 938-946.
- SIRAKOV M, Skah S, Lone IN, Nadjar J, Angelov D & Plateroti M (2012). Multi-level interactions between the nuclear receptor TR $\alpha$ 1 and the WNT effectors  $\beta$ catenin/Tcf4 in the intestinal epithelium. *PLoS ONE* 7: e34162.
- TAKEICHI M (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* c251: 1451-1455.

- TAN CW, Hirokawa Y, Gardiner BS, Smith DW & Burgess AW (2013). Colon Cryptogenesis: asymmetric budding. *PLoS ONE* 8(10): e78519.
- TANAKA T (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog* 8: 1-19.
- TANOS B & Rodriguez-Boulan E (2008). The epithelial polarity program: machineries involved and their hijacking by cancer. *Oncogene* 27: 6939-6957.
- VAN HENGEL J & van Roy F (2007). Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta* 1773(1): 78-88.
- WITZEL II, Koh LF, Perkins ND (2010). Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochem Soc Trans* 38(Pt 1): 217-222.
- WOOD LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE & Vogelstein B (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 318: 1108-1113.
- WRUTNIAK-CABELLO C, Casas F & Cabello G. (2000). The direct tri-iodothyronine mitochondrial pathway: science or mythology? *Thyroid* 10(11): 965-969.
- YAMADA S & Nelson WJ (2007). Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 178: 517-527.
- YANG YCSH, Ko PJ, Pan YS, Lin HY, Whang-Peng J, Davis PJ & Wang K (2021). Role of thyroid hormone-integrin  $\alpha\beta3$ -signal and therapeutic strategies in colorectal cancers Yu-Chen S. H. *Biomed Sci* 28: 24.
- YI H, Zeng D, Shen Z, Liao J, Wang X, Liu Y, Zhang X & Kong P (2016). Integrin  $\alpha\beta3$  enhances  $\beta$ -catenin signaling in acute myeloid leukemia harboring Fms-like tyrosine kinase-3 internal tandem duplication mutations: implications for microenvironment influence on sorafenib sensitivity. *Oncotarget* 7(26): 40387-40397.
- ZHANG L (2011). Voluntary oral administration of drugs in mice. *Protocol Exchange*. doi:10.1038/protex.2011.236.

## Indicadores de producción

### Publicaciones

1. Izaguirre, M. F.; Galetto, C.D. and Casco, V. H. (2018). Physiological Regulation of E-cadherin Adhesiveness. *Journal of Cell Signaling*. 3:2. DOI: 10.4172/2576-1471.1000182.
2. Izaguirre, M. F.; Galetto, C.D.; Baró, L. and Casco, V.H. (2019). E-cadherin dysfunction and cancer. *Journal of Biosciences and Medicines*, 7: 42-67. ISSN Print: 2327-5081 ISSN Online:2327-509X. doi: 10.4236/jbm.2019.78004.
3. Izaguirre, M. F. and Casco, V. H. E-cadherin roles in animal biology. Cambridge Scholars Publishing. Aceptada, con correcciones.
4. Izaguirre, M. F.; Baró, L.; Galetto, C.D. and Casco, V.H. (2019). E-cadherin: an approach from an evolutionary perspective. *Journal of Molecular Evolution*. ISSN: 0022-2844 (Print) 1432-1432 (Online). En evaluación.
5. Baró, L., Casco, V.H and Izaguirre, M.F. Influence of thyroid hormones on the crypt structure of the colon tumor. A meta-analysis study. En preparación.
6. Sampedro, M. F.; Izaguirre, M. F. & Sigot, V. (2018). E-cadherin expression pattern during zebrafish embryonic epidermis development. *F1000Research*, 7:1489. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15932.3>

## **CURSOS DICTADOS COMO CONSECUENCIA DE LA INVESTIGACIÓN REALIZADA**

Taller Internacional de Microscopias Ópticas Avanzadas. IV Edition of High-Resolution Optical Microscopy Engineering School-UNER (2019)

## **TÍTULO DE POSGRADO OBTENIDO**

Doctorado en Cs. Biológicas, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, obtenido por la Licenciada en Biotecnología Carolina Daniela Galetto. Director: Víctor H. Casco – Codirectora Ma. Fernanda Izaguirre.

## **OTRAS ACTIVIDADES QUE CREA IMPORTANTE CONSIGNAR**

### **Ma. Fernanda Izaguirre**

2015 a la actualidad: Representante por el Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) en el Consejo Asesor del Sistema Nacional de Microscopia-MINCYT.

2018: Evaluador de proyectos de Mejora de Servicios Tecnológicos 2017 de la Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación (ASaCTel), Resolución No 107/18, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de Santa Fe. 2 y 3 de julio de 2018, Santa Fe.

2018: Docente Curso de Posgrado: Biofotónica y Óptica Biomédica (Maestría en Ingeniería Biomédica Doctorado en Ingeniería).

2016-2020: Co-dirección de María Florencia Sampedro, D.N.I. 33.775.779, Beca Interna Doctoral de CONICET (Resolución 4981/15). Laboratorio de Microscopia, FIUNER. Plan "Remodelado de las uniones adherentes mediadas por cadherinas epiteliales durante la migración celular colectiva en la formación de la línea lateral posterior del pez cebra. A partir del 28 de agosto de 2018 pasa a trabajar en el Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB); (CONICET - UNER).

2017 y continúa: Co-dirección de María Florencia Sampedro, D.N.I. 33.775.779. Ejecución en el Laboratorio de Microscopia, FIUNER. Doctorado de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Resolución CD- UNL No 1045/17. Consejera de Estudios a la Dra. Daniela GARDIOL. Acta 14 CD, 20-09-17, UNL.

### **Víctor H. Casco**

2004 – 2019: Evaluador SENACYT Panamá.

2008-2018: Director de Tesis de Doctorado en Ingeniería del Bioingeniero Javier E. Diaz Zamboni. Facultad de Ingeniería en Ciencias Hídricas, UNL (Aprobada 03 de octubre de 2018).

2010 - 2018: Director de Tesis de Doctorado en Cs. Biológicas de la Licenciada en Biotecnología Mariana Bianchi. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL (Aprobada 09 de febrero de 2018).

2013 y continúa: Director de Tesis de Maestría en Ingeniería Biomédica del Bioingeniero Silvio Laugero. Facultad de Ingeniería, UNER.

2012 y continúa: director del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos.

2018 y continúa: Director por concurso del Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB-CONICET-UNER).

2018 y continúa: Vicedecano Facultad de Ingeniería (UNER)

**PID 6164**

**Denominación del Proyecto**

El rol de las hormonas tiroideas sobre la expresión de cadherinas-cateninas en el cáncer de colon: alternativas terapéuticas

**Directora**

Izaguirre María Fernanda

**Codirector**

Casco Víctor Hugo

**Unidad de Ejecución**

Universidad Nacional de Entre Ríos

**Dependencia**

Facultad de Ingeniería

**Contacto**

[fernanda.izaguirre@uner.edu.ar](mailto:fernanda.izaguirre@uner.edu.ar) y/o [victor.casco@uner.edu.ar](mailto:victor.casco@uner.edu.ar)

**Cátedra, área o disciplina científica:**

Cátedra de Biología Molecular y Celular (CBMyC) y Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares (LMAE) [ingenieria.uner.edu.ar](http://ingenieria.uner.edu.ar)

Área Temática: Ciencias Médicas y de la Salud

Disciplina Científica: Medicina Básica

**Integrantes del proyecto**

Adur Javier F.; Galetto Carolina D.

Becarios: Iglesias, Lucas Gabriel; Pozzer, Diego Fernando; Ignacio Ramiro Savini

**Fechas de iniciación y de finalización efectivas**

17-08-2016 y 17-08-2019

Aprobación de Informe Final por Resolución C.S. N° 042/21 (02/06/2021)