



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Inestabilidad cromosómica y migración celular: JAK/STAT y una función no apoptótica de las caspasas efectoras

Ana Elena Gaspar Torrubia

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado en Genética

# Inestabilidad cromosómica y migración celular: JAK/STAT y una función no apoptótica de las caspasas efectoras

Ana Elena Gaspar Torrubia

2021





INSTITUT  
DE RECERCA  
BIOMÈDICA



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

Universidad de Barcelona

Facultad de Biología, Departamento de Genética

# Inestabilidad cromosómica y migración celular: JAK/STAT y una función no apoptótica de las caspasas efectoras

Memoria presentada por

**Ana Elena Gaspar Torrubia**

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Barcelona, Septiembre 2021

Marco Milán  
Kalbfleisch

(Director)

Ana Elena Gaspar  
Torrubia

(Estudiante)

Florencio Serras  
Rigalt

(Tutor)



**“You may not control all the events that happen to you,  
but you can decide not to be reduced by them”**

**Maya Angelou**



Quiero dedicar esta tesis a David, gracias por haber creído  
siempre que podía llegar hasta aquí





# ÍNDICE



<b>Abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>
<b>Capítulo 1: Cáncer como modelo</b> .....	<b>15</b>
1.1 Incidencia y actualidad del cáncer .....	<b>15</b>
1.2 Signos distintivos del cáncer .....	<b>17</b>
1.3 Inestabilidad Cromosómica en la progresión tumoral .....	<b>20</b>
1.4 CIN, fuente de aneuploidías .....	<b>23</b>
1.5 <i>Drosophila</i> como organismo modelo .....	<b>25</b>
1.6 CIN como modelo de carcinogénesis .....	<b>27</b>
1.7 CIN, inductor de invasión celular en tejidos epiteliales .....	<b>29</b>
<b>Capítulo 2: Muerte celular programada</b> .....	<b>32</b>
2.1 Apoptosis .....	<b>32</b>
2.2 Bloqueo de la muerte en células cancerosas .....	<b>35</b>
2.3 Activación de la vía apoptótica en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	<b>37</b>
2.4 Caspasas, inductores de muerte celular .....	<b>39</b>
2.5 Funciones no apoptóticas de las caspasas .....	<b>44</b>
<b>Capítulo 3: Vías activadoras de la apoptosis</b> .....	<b>48</b>
3.1 JNK y la activación de caspasas .....	<b>48</b>
3.2 P53 y la función de la mitocondria en la activación de caspasas .....	<b>52</b>
3.3 JAK/STAT y la activación de caspasas .....	<b>55</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>60</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>64</b>
<b>Capítulo 1: Evento migrante y activación de la vía apoptótica en tejidos CIN</b> .....	<b>66</b>
1.1 Aspectos generales de la población migratoria .....	<b>66</b>
1.2 Activación de la vía apoptótica en tejidos CIN .....	<b>69</b>
1.3 Papel de los genes proapoptóticos en la invasividad celular .....	<b>71</b>
1.4 Papel de los genes proapoptóticos en muerte celular .....	<b>73</b>

**Capítulo 2: Contribución de las caspasas al fenotipo invasivo ..... 76**

2.1 Papel de las caspasas en migración ..... 76

2.2 Contribución de las caspasas en un sistema CIN .. 77

2.3 Consecuencias de la sobreexpresión de la vía apoptótica entumores CIN ..... 80

2.4 La migración en tumores CIN es un proceso invasivo activo..... 83

2.5 DUOX y MYO1D no son necesarios para la migración celular ..... 86

2.6 La caspasa iniciadora DREDD también contribuye a la Invasividad celular en tumores CIN ..... 88

**Capítulo 3: Contribución de JNK en la activación de la vía apoptótica responsable del fenotipo invasivo 90**

3.1 Coexistencia de dos poblaciones migrantes en los tumores CIN ..... 90

3.2 Contribución de JNK a la activación de la vía de las caspasas ..... 92

3.3 Rescate parcial de la muerte celular mediante el bloqueo de la Vía de JNK ..... 95

**Capítulo 4: Dp53 y la mitocondria como posibles activadores de la vía de las caspasas ..... 97**

4.1 Dp53 como candidato tras la segunda población migrante ..... 97

4.2 El bloqueo de Dp53 indujo incremento de la invasividad y muerte ..... 99

4.3 Las células migrantes presentan altos niveles de fragmentación mitocondrial ..... 101

4.4 Contribución del ciclo celular al fenotipo migrante ..... 102

**Capítulo 5: Contribución de la vía de JAK/STAT al fenotipo invasivo ..... 106**

5.1 La vía de JAK/STAT activo en la segunda población migración .....	106
5.2 Rescate del fenotipo invasivo y la muerte celular mediante el bloqueo de la vía de JAK/STAT .....	107
5.3 JAK/STAT segundo activador de la vía de las caspasas .....	109
5.4 Reducción de capacidad invasiva del tumor mediante el tratamiento con Ruxolitinib .....	113

**Capítulo 6: La migración inducida por JAK/STAT depende de ligandos proinflamatorias .....** 116

6.1 La citoquina Upd3 activa el fenotipo invasivo de JAK/STAT .....	116
6.2 El bloqueo de Upd3 rescata la invasividad y la muerte celular .....	117
6.3 La sobreexpresión de Upd3 induce altos niveles de muerte celular .....	119

**Capítulo 7: Relación entre JNK y JAK/STAT, exclusión y expresión en el tiempo .....** 121

7.1 Las vías de JNK y JAK/STAT no presentan un bloqueo mutuo .....	121
7.2 Las vías de JNK y JAK/STAT evolucionan de diferente manera durante la vida del tumor .....	122
7.3 Las poblaciones celulares sufren una transición temporal durante el desarrollo tumoral .....	124

**Discusión .....** 126

1.Funciones de los genes proapoptóticos en migración .....	128
2.Implicaciones de los elementos de la vía apoptótica relevantes en migración .....	130
3. Relevancia de la vía de JNK en nuestro modelo .....	133
4. Relevancia de p53 y el ciclo celular en nuestro modelo .....	135
5.Evolución temporal de las dos vías y de las poblaciones migratorias .....	137
6.Modelo Final .....	141

7.Perspecctivas futuras .....	143
<b>Conclusiones .....</b>	<b>146</b>
<b>Material y métodos Índice figuras .....</b>	<b>150</b>
<b>1.Materiales y protocolos .....</b>	<b>152</b>
1.1 Líneas de <i>Drosophila</i> .....	151
1.2 Puestas de embriones y tiempos de desarrollo .....	153
1.3 Inmunohistoquímica .....	154
1.4 TUNEL verde .....	154
1.5 TUNEL rojo lejano .....	155
1.6 Medición de intensidades .....	156
1.7 RT-PCR cuantitativa .....	157
1.8 Tratamiento con Ruxolitinib .....	157
<b>2. Cuantificaciones y análisis .....</b>	<b>158</b>
2.1 Procesamiento y análisis de las imágenes .....	158
2.2 Análisis estadísticos .....	159
2.3 Cuantificación del tamaño tumoral (Ratio D/T) .....	159
2.4 Cuantificación de la invasividad celular .....	160
2.5 Cuantificación de la muerte celular por TUNEL .....	160
2.6 Cuantificación de la intensidad de los distintos sensores .....	161
2.7 Cuantificación de las poblaciones celulares o número de células apoptóticas .....	161
<b>Índice figuras .....</b>	<b>162</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>170</b>







# ABREVIATURAS



<b>AiP</b>	Apoptosis induced proliferaci3n
<b>ADN</b>	3cido desoxiribonucleico
<b>AMN</b>	Apoptotic microtubule network
<b>Ap&gt;</b>	Promotor apterous
<b>APAF-1</b>	Apoptotic protease-activating factor 1
<b>AP1</b>	Activator protein1
<b>APC/C</b>	Anaphase-promoting complex/cyclosome
<b>ARN</b>	3cido ribonucleico
<b>Ask1</b>	Apoptotic signal-regulating kinase 1
<b>ATP</b>	Apoptotic signaling-regulating kinase 1
<b>BSK</b>	Basket
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b><math>\beta</math>-GAL</b>	$\beta$ -Galactosidasa
<b>BIR</b>	Baculovirus IAP repeat
<b>BUB</b>	Budding uninhibited by benzimidazole
<b>Caspasa</b>	CysteinyI aspartate-specific protease
<b>CDC20</b>	Cell division cycle 20
<b>CDK1</b>	Cyclin-dependent kinase1
<b>CED9</b>	Cell death gene 9
<b>CED4</b>	Cell death gene 4
<b><i>C. elegans</i></b>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<b>CIC</b>	Capicua

<b>CIN</b>	Chromosomal Instability
<b>CycE</b>	Ciclina E
<b>DAPI</b>	4'.6'-diamidino-2 phenylindole
<b>DARK</b>	Death-associated APAF1-related killer
<b>dATP</b>	Deoxyadenosine triphosphate
<b>DAMM</b>	Death associated molecule related to Mch2 caspase
<b>DECAY</b>	Death executioner caspase related to Apopain/Yama
<b>DCP1</b>	Death caspase1
<b>cDCP1</b>	Cleaved DCP1
<b>DEVD</b>	Asp-Glu-Val-Asp
<b>DIAP-1</b>	Death-associated IAP
<b>DN</b>	Dominant Negative
<b>dpp</b>	Decapentaplegic
<b>Dp53</b>	Drosophila p53
<b>DREDD</b>	Death related ced-3/Nedd2-like caspase
<b>DrICE</b>	Drosophila ICE
<b>DRONC</b>	Drosophila Nedd2-like caspase
<b>HOME</b>	Domeless
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>Ratio D/T</b>	Ratio Dorsal/Total
<b>DUOX</b>	Dual oxidase
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor

<b>ERK</b>	Extracellular regulated kinase
<b>FUCCI</b>	Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator
<b>GAL4</b>	Transcription factor
<b>GC3Ai</b>	GFP Caspase-3-like protease activity indicator
<b>GCO</b>	Global Cancer Observatory
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GI</b>	Inestabilidad genómica
<b>HEP</b>	Hemipterous
<b>HID</b>	Head involution defective/Wrinkled
<b>HOP</b>	Hopscotch
<b>IAP</b>	Inhibitor of apoptosis protein
<b>IBM</b>	IAP- bind motif
<b>ICE</b>	Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme
<b>IL-1B</b>	Interleukin 1 beta
<b>JAK</b>	Janus kinases
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>MAD2</b>	Mitotic-arrest deficient
<b>MAPK</b>	Mitogenic-activated protein kinase
<b>MCM</b>	Mitotic check point
<b>MDSC</b>	Myeloid-derived suppressor cells
<b>miRHG</b>	miRNA para rpr, hid y grim
<b>miRNA</b>	micro RNA

<b>MKK4</b>	MAP kinase kinase 4
<b>MMP1</b>	Matric metalloprotease 1
<b>MOMP</b>	Mitochondrial outer membrane permeabilization
<b>MSI</b>	Inestabilidad de microsatélites
<b>MYO1D</b>	Myosin 31DF
<b>MyrT</b>	Myristoylated tomato
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinases
<b>PS</b>	Phosphatidylserine
<b>PTI</b>	Pro-Tumor Inflammation
<b>puc</b>	Puckered
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative real time polymerase chain reaction
<b>RHG</b>	Rpr-Hid-Grim
<b>RING</b>	Really interesting new gene
<b>ARNi</b>	RNA interference
<b>RPR</b>	Reaper
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SAC</b>	Spindle-assembly checkpoint
<b>SeSB</b>	Stress-sensitive B
<b>SKL</b>	Sickle
<b>SLPR</b>	Slipper

<b>STAT</b>	Signal transducers and activator of transcription
<b>Tak1</b>	TGFB-associated kinase 1
<b>TAM</b>	Tumor-associated macrophages
<b>Treg</b>	Regulatory T cells
<b>TFs</b>	Transcriptional factors
<b>TNF-alpha</b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>TUNEL</b> labelling	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nich end
<b>UAS</b>	Upstream activating sequence
<b>UPD</b>	Unpaired
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WG</b>	Wingless
<b>WND</b>	Wallenda





# **ABSTRACT**



Chromosomal Instability, or CIN, has been extensively related to carcinogenic development given that it is present in a high percentage of the epithelial tumors. CIN induction generates a high rate of aneuploidies, generating important levels of cell stress and activating response mechanisms as JNK or JAK/STAT pathways.

One of the main factors in tumor progression is the development of invasiveness capacities. Using a chromosomal instability model combined with cell death blocking, we were able to detect the presence of two different migrating models in the invasiveness population. This migrating phenotype was mainly composed by two different cell groups mostly exclusive: one migrating model guided by JNK pathway, whose role in invasiveness was previously characterized by our lab, and another migrating model dependent of the JAK/STAT pathway and the proinflammatory cytokine UPD3.

Related with that second population, dependent on the JAK/STAT pathway, we described that it controls cell invasiveness mediating a non-apoptotic function of caspases by the regulation of the proapoptotic gene *hid*. As a result of the systemic effect originated by the tumor, JAK/STAT pathway and caspases pathway were overactivated during tumor progression, and, in consequence, its invasiveness capacity also increased over time. Altogether, these results provide a new perspective of tumoral development and its interaction with other tissues, but also, a new non-apoptotic role of caspases that is crucial for carcinogenic progression.



# INTRODUCCIÓN



## Capítulo 1: Inestabilidad genética y cáncer

### 1.1 Incidencia y actualidad del cáncer

El término 'cáncer' se utiliza de forma genérica para referirse a un amplio número de enfermedades que engloban más de 100 tipos diferentes de patologías. Los primeros indicios de esta enfermedad se remontan al antiguo Egipto donde se han encontrado momias con daños en el tejido que habrían sido causados por tumoraciones en cabeza o cuello, así como referencias en textos antiguos de los primeros tratamientos quirúrgicos que consistían en la cauterización rudimentaria del área afectada.

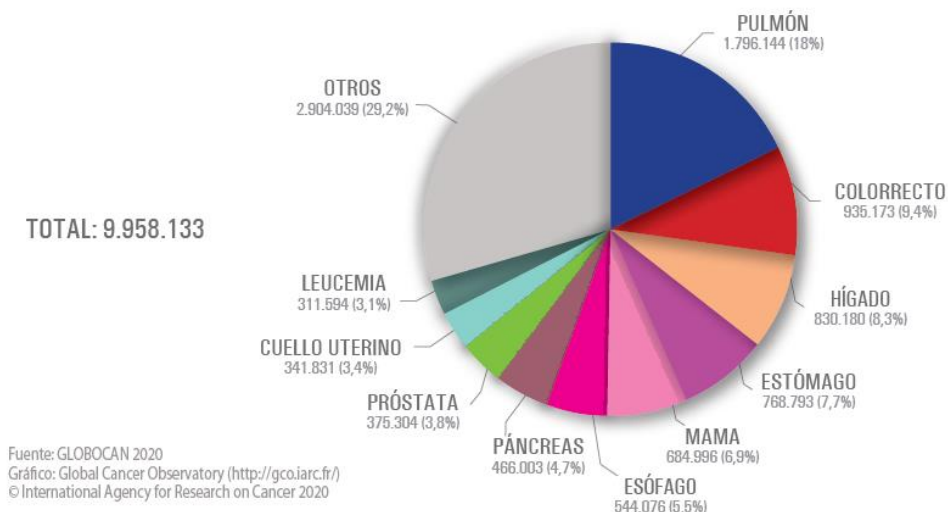
Sin embargo, fue Hipócrates (460-370 a.C.), “el padre de la medicina”, quien dio nombre por primera vez a dicha patología. El término cáncer proviene del latín *karkinos*, que significa cangrejo, cuya relación no está clara, pero una hipótesis es que podría deberse a la gran tenacidad con que dichos animales se aferran a su presa.

Hasta nuestros días, son muchos los avances que se han hecho en el entendimiento y tratamiento de dicha enfermedad, sin embargo, actualmente el cáncer constituye una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y el pronóstico futuro es de momento poco esperanzador. De acuerdo con La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer se estimó que en 2020 se diagnosticaron 19,3 millones de nuevos casos y se prevé, de acuerdo con la tendencia al alza, que dicho valor ascenderá a 30,2 millones para el año 2040.

De acuerdo con los datos aportados por la GCO (*Global Cancer Observatory*), a nivel mundial, el orden de mortalidad lo encabeza el



cáncer de pulmón, seguido del cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de estómago y cáncer de mama (Figura 1).



**Figura 1. Incidencia de cánceres en España.** Porcentajes de incidencia de los principales cánceres en 2019 (Junttila and de Sauvage et al 2020).

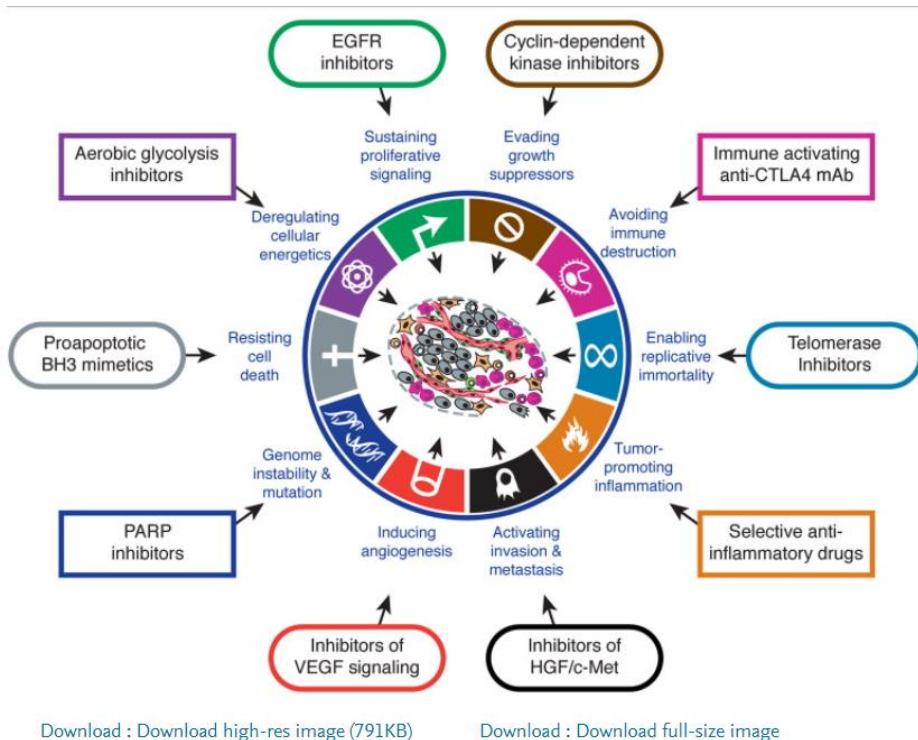
Los tumores pueden clasificarse en tumores líquidos, presentes en los fluidos corporales, o tumores sólidos, constituidos por una masa anormal de tejido que carece de quistes y áreas líquidas. De ambos grupos, la incidencia en adultos es mayoritariamente de tumores sólidos, responsables del 90% de los casos anuales, dada su alta correlación con los cánceres de mayor incidencia respecto a los datos de la GCO. Esto los convierte en uno de los grandes objetivos de estudio para la comunidad científica en la desesperada búsqueda de encontrar tratamientos más eficientes capaces de reducir la mortalidad de dicha patología.

## 1.2 Signos distintivos del cáncer

En el año 2000, Hanahan y Weinberg publicaron un modelo pionero que definía los 6 sellos distintivos que caracterizan un tumor maligno a los que denominaron “Signos Distintivos del Cáncer” y que consisten en: autonomía de señales de proliferación, evasión de señales de supresión del crecimiento, resistencia a la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, actividad invasiva y metastática (Hanahan and Weinberg 2000).

Tiempo después, en una revisión publicada en 2011, incrementaron hasta 10 dichos sellos característicos. Por un lado, añadieron dos nuevas características a las que denominaron “signos emergentes”, responsables de facilitar el desarrollo y progresión de la enfermedad. Los signos emergentes consistían en primer lugar en una reprogramación del metabolismo energético de la célula para hacer sostenible un modelo de crecimiento y proliferación continuos y, en segundo lugar, la capacidad de las células cancerosas de evadir al sistema inmune.

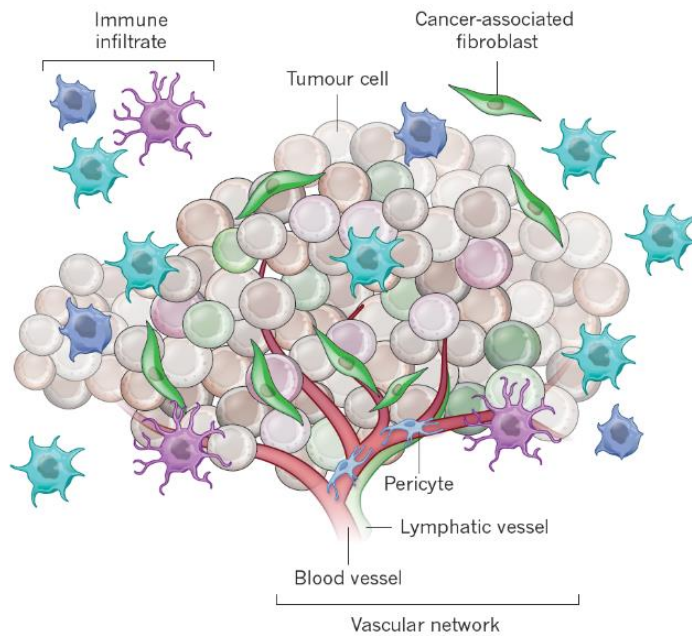
Por otro lado, describieron que las razones subyacentes del desarrollo canceroso estaban mediadas por dos factores fundamentales. Dichos factores, a los que denominaron “factores capacitadores”, eran por un lado el estado inflamatorio generado por las células del sistema inmune en tejidos que aún no se han malignizado y, por otro lado, la inestabilidad genómica, responsable de generar mutaciones aleatorias capaces de acelerar y orquestar dicha evolución (Hanahan and Weinberg 2011) (Figura 2).



**Figura 2. Sellos distintivos del cáncer según Hanahan y Weinberg.** Conjunto de elementos denominados en inglés “Hallmarks of cancer” (Hanahan and Weinberg 2011).

En concordancia con esta nueva forma de caracterizar los tumores, el concepto de cáncer fue evolucionando a una perspectiva más amplia en la que se ponía de manifiesto que no se trataba simplemente de una población de células aberrantes aisladas que proliferaban sobre un tejido sano, sino de un ecosistema en el que convivían muchos tipos celulares diferentes que podían desempeñar diversas funciones en la progresión y pronóstico de la enfermedad (Junttila and de Sauvage 2013) (Figura3).

De esta forma, se introdujo el concepto de un microambiente heterogéneo, donde el nicho del tumor es una estructura dinámica que evoluciona de forma conjunta con la matriz extracelular, el endotelio vascular, estromal y células del sistema inmune (Hanahan and Coussens 2012).



**Figura 3. Microambiente tumoral.** Ecosistema de un tumor entendido como se propone en Junttila y de Sauvage et al 2013, constituido por múltiples grupos celulares que le otorgan una gran heterogeneidad.

Este concepto más amplio de los fenómenos cancerosos pone de manifiesto la dificultad para tratar una enfermedad cuya complejidad radica en el amplio número de factores determinantes y variables en cada caso particular.

### 1.3. Inestabilidad Cromosómica en la progresión tumoral

La inestabilidad genómica (GI), presente en la mayoría de los cánceres de origen esporádico, ha sido relacionada con el desarrollo de dicha patología desde hace más de 100 años cuando se describió su presencia en cánceres epiteliales en 1890 por el científico alemán Hanseemann. Desde principios del siglo XX, ya se planteaban hipótesis acerca de que el desarrollo de dicha enfermedad podría estar relacionado con la pérdida de determinados cromosomas, que serían portadores de lo que más adelante se denominarían supresores tumorales (Boveri 1914).

La inestabilidad genómica engloba la inestabilidad de microsatélites (MSI), la inestabilidad genómica generada por el incremento de mutaciones de pares de base y la inestabilidad cromosómica, siendo esta última la principal y más conocida forma de inestabilidad genómica (Wei, Cheng et al. 2016).

La inestabilidad cromosómica, también conocida como CIN (de sus siglas en inglés *Chromosomal Instability*), es considerado uno de los sellos distintivos fundamentales en el desarrollo del cáncer. Se define como los cambios en el número o estructura de los cromosomas a lo largo del tiempo en las células cancerosas respecto al resto de células del tejido (Negrini, Gorgoulis et al. 2010).

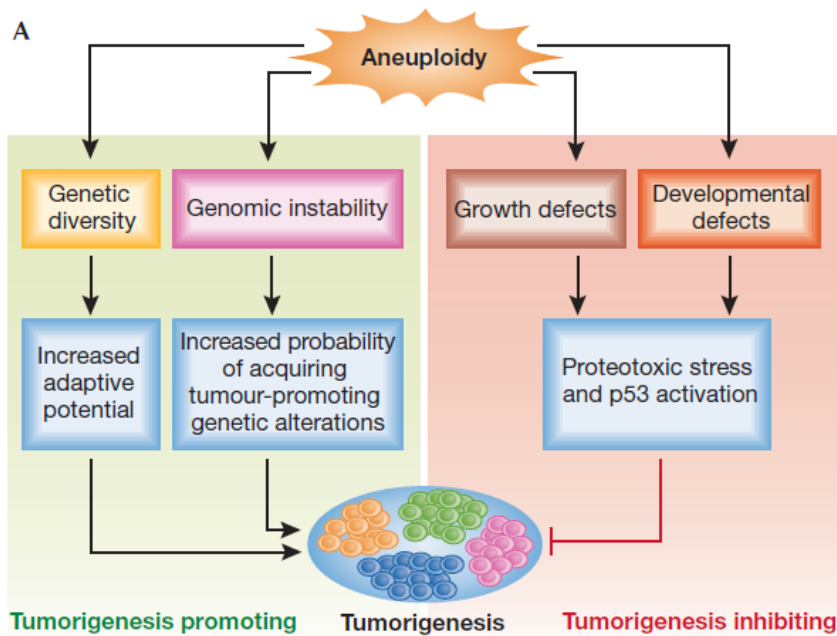
Está ampliamente descrito que CIN está presente en el 70-80% de los tumores de pulmón, 65-70% de los tumores de colon, 95% de los tumores de hígado, 50% de los tumores gástricos y 75% de los tumores de mama (Turajlic and Swanton 2016) (Masuda and Takahashi 2002) (Voutsadakis 2021) (Pino and Chung 2010) (Chen, Zhang et al. 2019). Sin embargo, a pesar de haber sido propuesto en numerosas ocasiones como un elemento que contribuye al éxito en la colonización de otros tejidos,

todavía hay muchas incógnitas abiertas en la comprensión de dicho proceso (Hingorani, Wang et al. 2005).

La inestabilidad cromosómica se caracteriza por producir una alta tasa de fallos durante la segregación de los cromosomas que dará lugar a importantes aneuploidías generadas de manera aleatorias (Wei, Cheng et al. 2016). Dichas aneuploidías pueden estar constituidas tanto por la ganancia como por la pérdida del material genético. Tanto en levaduras como en mamíferos, el aumento del material genético se ha visto que puede ir acompañado de un incremento en la transcripción de dichos genes (Torres, Williams et al. 2008) (Pavelka, Rancati et al. 2010).

Respecto a la pérdida de autosomas, en levaduras se ha visto que la presencia de monosomías puede producir un fenómeno poco común denominado endorreduplicación (Reid, Sunjevaric et al. 2008). A pesar de ello, no existe un consenso universal acerca de la correlación entre número de copias de un gen y su expresión, y actualmente lo más aceptado es la presencia de mecanismos específicos de especie para responder ante variaciones del número de copias de un gen (Pfau and Amon 2012).

A día de hoy, la contribución de las aneuploidías todavía presenta una fuerte controversia entre si es causa o consecuencia del desarrollo del cáncer (Sen 2000). Sin embargo, se sabe que la presencia creciente de aneuploidías contribuye a la progresión carcinogénica al incrementar tanto la diversidad genética como la inestabilidad genómica del tejido, promoviendo así las probabilidades de adquirir alteraciones que contribuyan a la transformación maligna (Figura 4) (Pfau and Amon 2012).



**Figura 4. Aneuploidía y carcinogénesis.** Esquema propuesto en Pfau and Amon 2012 donde muestran la contribución de las aneuploidías a la progresión carcinogénica.

## 1.4 CIN, fuente de aneuploidías

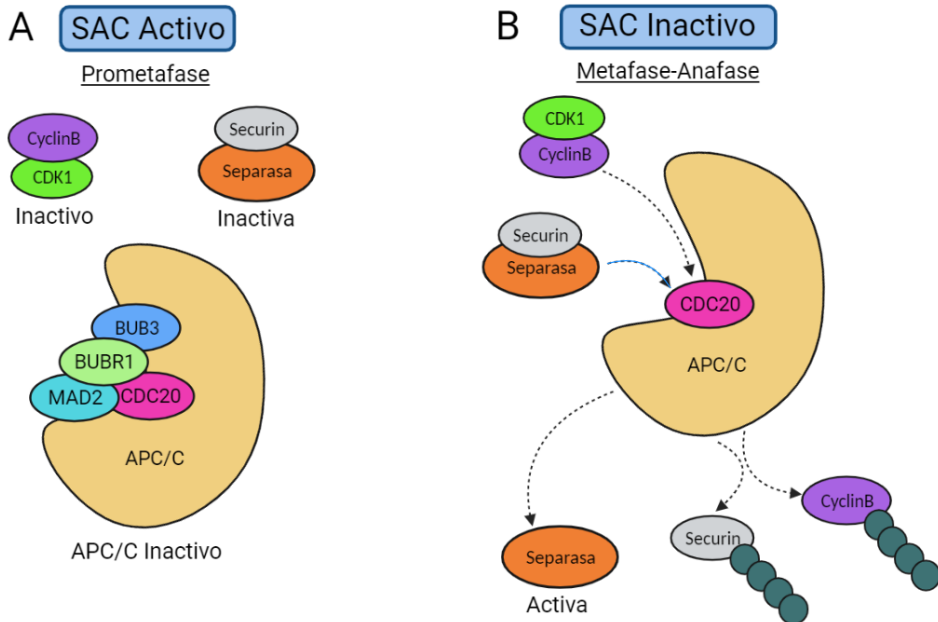
Durante la división celular, la fidelidad de la mitosis depende de la correcta separación de las cromátidas hermanas, que se mantienen unidas por una proteína denominada cohesina la cual es degradada por la separasa. Sólo cuando los cromosomas se disponen en la orientación adecuada, la separasa se activa y procesa la cohesina, generando la separación de las dos cromátidas, y asegurando así una distribución equitativa del genoma (Silva, Mirkovic et al. 2018). Los genes responsables de monitorizar dicho proceso son los denominados genes SAC por sus siglas en inglés (*spindle-assembly checkpoint*) que están conservados en todos los eucariotas (Musacchio and Salmon 2007).

La activación de los genes SAC da lugar al complejo MCM (*mitotic check point*), constituido por MAD2 (*mitotic-arrest deficient*), BUBR1 y BUB3 (*budding uninhibited by benzimidazole*), y su unión a la proteína CDC20 (*cell division cycle 20*), un cofactor de la ubiquitin-ligasa APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) (Yen 2013).

De esta manera, los genes SAC regulan negativamente la habilidad de CDC20 de activar APC/C, cuya activación genera la proteólisis de la ciclina B, inactivando la kinasa mitótica CDK1 (*cyclin-dependent kinase1*), responsable de promover la salida de la mitosis. Por otro lado, APC/C también degrada al inhibidor estequiométrico de la separasa, la securina. De esta manera, el control del CDC20 permite prolongar la prometáfase hasta que todos los cromosomas se hallen en la orientación adecuada. (Musacchio and Salmon 2007) (Santaguida and Amon 2015). Dado que dicho complejo es el responsable de mantener la cohesión de las dos cromátidas hermanas, problemas en el funcionamiento de este complejo convergen en la escisión prematura de la cohesina, y el consecuente incremento de errores de segregación y células hijas



aneuploides (Musacchio and Salmon 2007, Foley and Kapoor 2013)(  
 Figura 5).



**Figura 5A. Prometafase con los genes SAC activos.** En esta situación el complejo APC/C se encuentra bloqueado por el complejo MCM, CDK1 se encuentra activo por la unión a la ciclina B y la separasa inactiva por su unión a la securina.

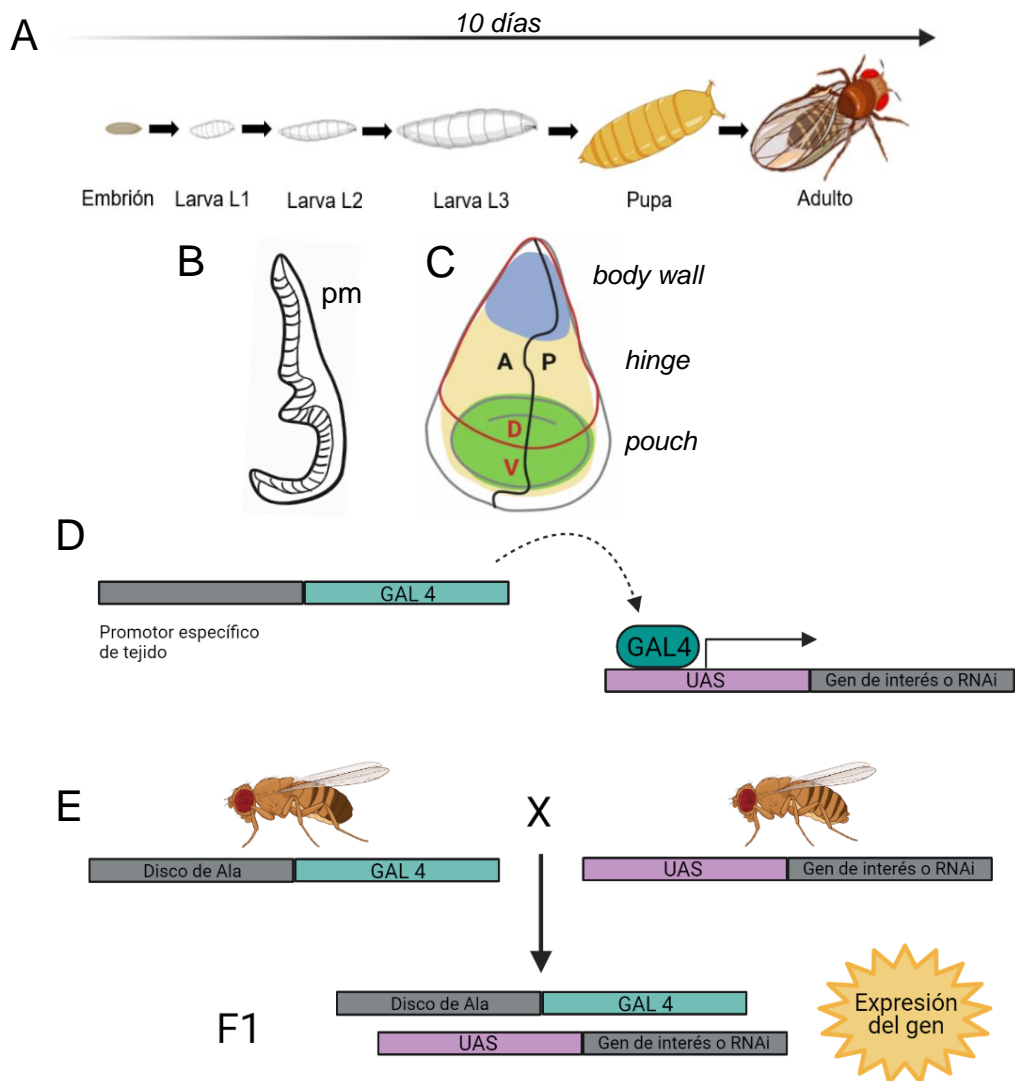
**Figura 5B. Metafase-Anafase con los genes SAC apagados.** En dicha situación la falta del complejo MCM permite que la CDC20 y APC/C estén activos y procesen la securina y la ciclina B. activando de esta forma la separasa que inducirá la separación de las dos cromátidas hermanas.

## 1.5 Drosophila como organismo modelo

*Drosophila melanogaster*, comúnmente conocida como la mosca de la fruta, ha sido ampliamente utilizada como organismo modelo para el estudio de diversas disciplinas desde que Charles W. Woodworth la propusiera por primera vez como un modelo genético en 1900. Su alta homología con el genoma de los seres humanos la convierten en un modelo muy útil donde estudiar numerosas patologías humanas. De hecho, aproximadamente el 65% de las patologías de los seres humanos pueden estudiarse en este modelo dado que presentan un homólogo en mosca (Ugur, Chen et al. 2016) .

Tanto es así que ha sido utilizada en numerosas ocasiones para estudiar distintos cánceres, así como dianas terapéuticas o tratamientos de distintos fármacos (Mirzoyan, Sollazzo et al. 2019). Una de sus principales ventajas, además de su rápido ciclo de vida (Figura 6A), es el requerimiento de pocas mutaciones para el desarrollo tumoral, haciendo mucho más accesible el estudio sistemático de la carcinogénesis (Brumby and Richardson 2005) (Pastor-Pareja and Xu 2013).

El disco imaginal de ala es un epitelio en monocapa que prolifera activamente durante el desarrollo larvario. A nivel apical, está limitado por la membrana peripodial y, basalmente en hasta el notum por una capa de mioblastos dispuestos sobre la matriz extracelular (Mirzoyan, Sollazzo et al. 2019) (Figura 6B-C). Este órgano es comparable con los epitelios de mamíferos tanto a nivel bioquímico como morfológico (Wodarz and Näthke 2007), lo que lo convierte en una estructura de gran utilidad para el estudio del mecanismo subyacente que se encuentra tras el crecimiento de los tumores (Dekanty, Barrio et al. 2012) .



**Figura 6A. Ciclo de vida de *D. melanogaster*.** En *D. melanogaster* la transición de embrión a adulto se produce en un periodo de 10 días.

**Figura 6B. Disco imaginal dispuesto en orientación lateral.** Disco de larva L3 de *D. melanogaster* marcando el tejido pseudoestratificado y la membrana peripodial (pm).

**Figura 6C. Disco imaginal dispuesto en orientación frontal.** Disco de larva L3 de *D. melanogaster* dispuesto en orientación frontal, donde se marcan los ejes anterior-posterior (A-P) y dorsal-ventral (D-V).

**Figura 6D-E. Sistema UAS/GAL 4.** La combinación de la proteína GAL4, regulada por un promotor específico de tejido, y el gen a expresar, dependiente de dicha proteína, hacen que, mediante un cruce simple, se generen individuos portadores de la expresión deseada.

Una de sus principales herramientas es la utilización del sistema GAL4/UAS, el cual permite expresar específicamente uno o varios genes en un tejido o población celular (Brand and Dormand 1995). Consta de dos componentes, en primer lugar, el GAL4 que es un activador transcripcional procedente de la levadura y que posee una expresión específica de tejido. En segundo lugar, un transgén que se expresará bajo el control del del GAL4 elegido (Elliott and Brand 2008). Dicho mecanismo otorga una gran simplicidad al sistema que puede generarse con un simple cruce, dando lugar a individuos portadores de la expresión deseada (Figura 6D-E).

### 1.6 CIN como modelo de carcinogénesis

CIN ha demostrado ser altamente dañino para las células, lo cual supone que, por sí solo no es suficiente para generar situaciones aneuploides estables (Thompson and Compton 2008). Sin embargo, como se ha explicado con anterioridad, un genoma descompensado genera, en consecuencia, un metabolismo celular descompensado, y esto puede implicar un aumento del estrés celular (Joy, Barrio et al. 2021). Tanto es así, que la presencia de células aneuploides se ha relacionado con una sobreactivación de genes de respuesta a estrés, así como la activación de vías de respuesta al daño del ADN (Janssen, van der Burg et al. 2011, Sheltzer, Torres et al. 2012, Tang and Amon 2013).

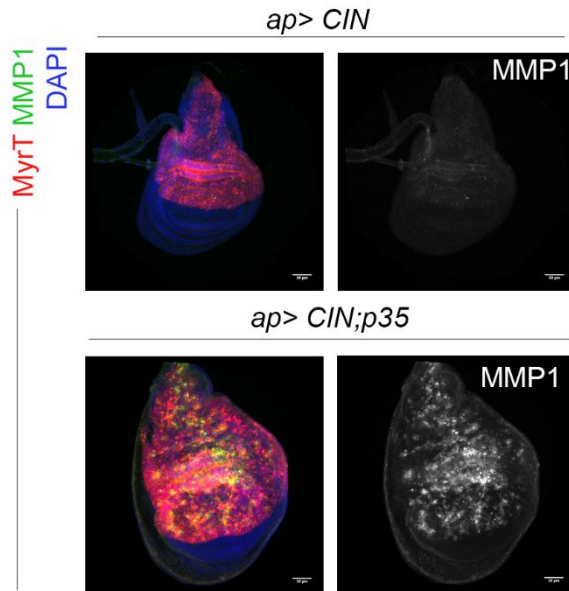
CIN puede ser generado de diferentes maneras, una de ellas es mediante ARN de interferencia específico para los genes SAC. Esto genera una gran cantidad de células aneuploides que delaminan del epitelio principal y son eliminadas del tejido por la activación de apoptosis dependiente de

JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). De esta manera, se evita el crecimiento tumoral de dichas células (Clemente-Ruiz, Murillo-Maldonado et al. 2016).

Por el contrario, si la vía apoptótica es bloqueada mediante el uso de la proteína de baculovirus p35, se genera un modelo estable donde las células aneuploides sobreviven y son acumuladas en el tejido, mimetizando así el comportamiento de los tumores en humanos, y donde JNK se convierte en un factor promotor de la carcinogénesis (Muzzopappa, Murcia et al. 2017). Dicho modelo será referenciado también durante este trabajo como tumores CIN.

El bloqueo de la muerte de dichas células aneuploides hace que permanezcan en el tejido, y se conviertan en fuente continuada de moléculas miogénicas como Wg (*Wingless*) o la IL-6, induciendo así la proliferación del tejido. Esto da lugar a un aumento de los eventos CIN, que se traduce en el aumento de la población de células aneuploides, y otorga al tumor la capacidad de crecimiento ilimitado. A su vez, también induce la sobreexpresión de MMP1 (*matric metalloprotease 1*) que lleva a cabo la degradación de la membrana basal (Dekanty, Barrio et al. 2012, Morais da Silva, Moutinho-Santos et al. 2013, Muzzopappa, Murcia et al. 2017) (Figura 7).

Es interesante destacar que durante este proceso se produce el arresto de las células aneuploides en la fase G2 del ciclo celular. Este proceso se ha relacionado principalmente con la activación de JNK, que afecta tanto al arresto como al incremento del tamaño nuclear y celular (Joy, Barrio et al. 2021).

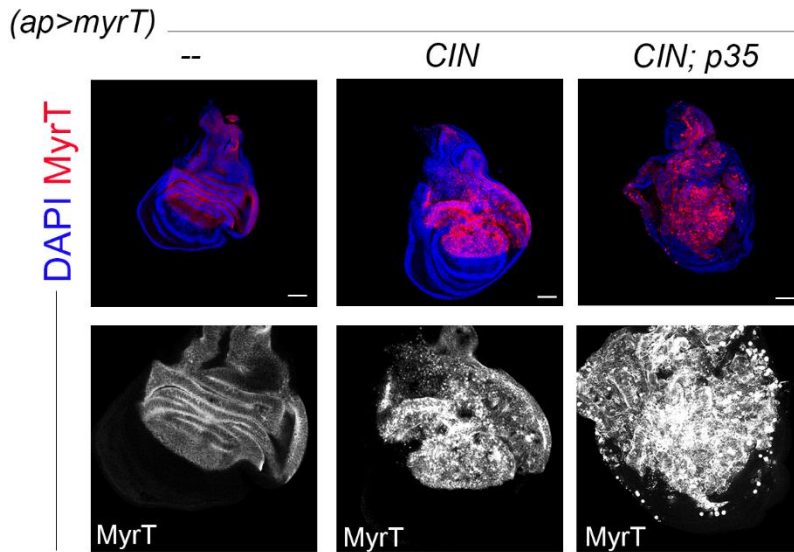


**Figura 7. Acumulación de MMP1 en tejidos CIN p35.** Comparación de la acumulación de MMP1 en una situación CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) con muerte activa o un tumor CIN con muerte bloqueada (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*).

### 1.7 CIN, inductor de invasión celular en tejidos epiteliales

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la presencia de CIN está normalmente asociada con una peor prognosis y una mayor agresividad de los tumores. De hecho, en modelos de cáncer de mama, se ha correlacionado la presencia de senescencia inducida por aneuploidías con un aumento de la invasividad celular (He, Au et al. 2018).

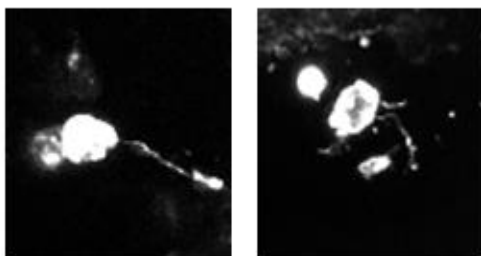
En 2018, nuestro laboratorio describió que los tumores CIN eran capaces de inducir un comportamiento invasivo de estas células altamente aneuploides, que adquirirían la habilidad de abandonar el compartimento de origen (Figura 8).



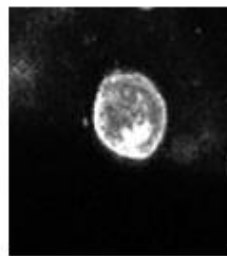
**Figura 8. Inducción de migración celular en tejidos *CIN p35*.** Disco de ala de *Drosophila melanogaster* con el promotor *apGAL4>*. Tanto el tejido salvaje (*apGAL4>MyrT*) como el *CIN* (*apGAL4>myrT; bub3-i*) carecen de células invasivas. Por el contrario, el tejido *CIN; p35* muestra la presencia de un alto número de células en el compartimento próximo de disco. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu\text{m}$ .

Dentro de la población migrante se encontraron dos tipos de conformaciones celulares diferentes: estructura de filopodio (morfología similar a la mesenquimal con filopodios ricos en acto-miosina) y estructura de burbuja (morfología circular de su membrana que las asemeja a una burbuja) (Benhra, Barrio et al. 2018) (Figura 9).

### Estructura de Filopodio



### Estructura de Burbuja



**Figura 9. Conformaciones de células migrantes en tejidos CIN p35.** Dos conformaciones de células migratorias presentes en un tumor CIN: conformación de filopodio (izquierda) y conformación en burbuja (derecha).

Dicho fenómeno invasivo dependió de la activación de dos vías. Por un lado, la vía de señalización de JNK, responsable de fosforilar al factor transcripcional Fos, responsable de modular el citoesqueleto de actomiosina, y de esa manera controlar el fenotipo invasivo de estas células migratorias. Por otro lado, la vía EGFR/ERK contribuyó a la invasividad mediante el bloqueo de un supresor metastático clave en mamíferos denominado CIC (*Capicua*) (Benhra, Barrio et al. 2018).



## Capítulo 2: Muerte celular programada

### 2.1 Apoptosis

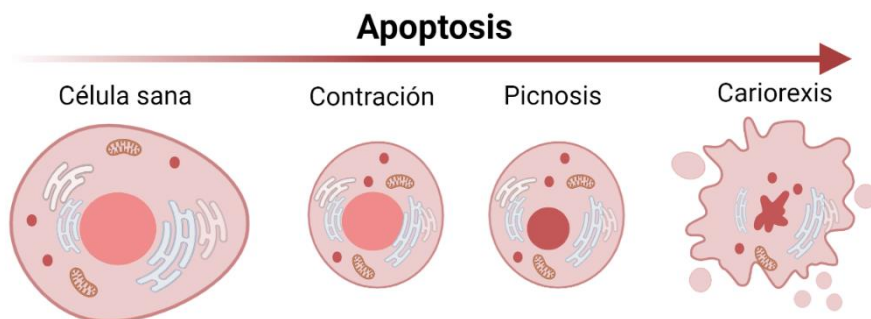
La apoptosis, también llamada “muerte celular programada” o “suicidio celular”, es uno de los tres mecanismos descritos por los que las células pueden ser eliminadas del tejido, junto con la necrosis y la autofagia asociada a muerte celular (Hotchkiss, Strasser et al. 2009).

El término “apoptosis” fue acuñado por primera vez por Derr Wyllie y Currie en 1972 para describir un fenotipo de muerte celular donde, en primer lugar, se producía la compresión del núcleo y la condensación del citoplasma, seguido de la ruptura de la célula. En segundo lugar, los cuerpos apoptóticos generados de su ruptura eran fagocitados y degradados por las enzimas lisosomales (Kerr, Wyllie et al. 1972).

De manera natural, la apoptosis se encuentra presente a lo largo del desarrollo y su función radica en mantener la homeostasis de los tejidos eliminando aquellas células sobrantes cuya presencia puede obstaculizar la formación correcta del tejido (Meier, Finch et al. 2000). También puede producirse en respuesta a distintos estímulos como células dañadas o que el sistema inmune reconoce como aberrantes (Norbury and Hickson 2001), pero no todas las células reaccionan de igual manera a los estímulos apoptóticos.

La muerte celular programada es un proceso altamente coordinado y dependiente de energía que conlleva la activación de un grupo de cistein-proteasas llamado “caspasas”, así como una compleja cascada de eventos responsables de la muerte de la célula, y en la consecución de tres estadios. En primer lugar, se produce la disminución de tamaño de la célula afectada, el citoplasma se vuelve más denso y los organelos se ven obligados a comprimirse. En segundo lugar, se produce la picnosis

del núcleo resultante de la condensación de la cromatina. La picnosis nuclear es el rasgo más distintivo de la apoptosis dado el fenotipo punteado que genera en los núcleos y que es fácilmente reconocible por microscopía. Finalmente, se produce la cariorexis o ruptura del núcleo celular, así como la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos (Elmore 2007). (Figura 10)



**Figura 10. Etapas de la apoptosis.** Transición desde una célula sana, hasta su lisado final durante la cariorexis.

La apoptosis puede ser extrínseca o intrínseca dependiendo de la señal iniciadora (Yang, Jiang et al. 2015). La vía extrínseca, o de receptor de muerte, consiste en la unión de un ligando específico, en este caso una citoquina, a un receptor transmembrana que iniciará la cascada de señal. Por el contrario, la vía intrínseca o mitocondrial, es iniciado por señales que surgen dentro de la célula, principalmente por la liberación del citocromo C de la mitocondria (Takle and Andersen 2007).

La necrosis es una alternativa a la muerte celular por apoptosis, la cual, a pesar de tener ciertos puntos en común, presenta importantes diferencias. La necrosis es un proceso mayoritariamente pasivo que se genera ante un daño masivo del tejido de origen tanto físico como químico, y que se caracteriza por presentar un requerimiento energético mucho menor que la apoptosis (Tonnus, Meyer et al. 2019). Determinados eventos, como la disminución de disponibilidad de ATP

intracelular, pueden generar la transición de un evento de apoptosis a un evento necrótico (Denecker, Vercaemmen et al. 2001). El tipo de estímulo, así como el grado de exposición, determinan en cada situación el modo en que se produce la muerte de las células (Cotran, Kumar et al. 1999).

La muerte celular es un proceso altamente necesario para eliminar células aberrantes o dañadas del tejido, sin embargo, implica una fuerte desorganización del tejido, sobre todo en respuesta a daños masivos. Por esta razón, y con el fin de restaurar la homeostasis del sistema existe un proceso denominado “Proliferación inducida por apoptosis” o AiP (*apoptosis induced proliferation*). Dicho proceso es llevado a cabo mediante la acción conjunta de la vía de JNK y la caspasa iniciadora DRONC (las cuales se desarrollarán en capítulos posteriores). Dicho proceso está basado en que la propia vía responsable de la muerte induce también un efecto compensatorio de proliferación celular, permitiendo la restauración de las células en los distintos tejidos (Ryoo, Gorenc et al. 2004) (Kondo, Senoo-Matsuda et al. 2006).

## 2.2 Bloqueo de la muerte en las células cancerosas

Si se produce correctamente, la eliminación de células del tejido por apoptosis evita una reacción inflamatoria en los tejidos por varias razones: las células apoptóticas no liberan sus componentes en el tejido intersticial, son rápidamente fagocitadas evitando así la inducción de necrosis y las células fagocitadas no producen citoquinas proinflamatorias (Savill and Fadok 2000) (Kurosaka, Takahashi et al. 2003). Esto hace que la apoptosis sea un proceso altamente eficiente con pocos efectos secundarios para el organismo.

Sin embargo, cuando el evento apoptótico no ocurre correctamente, puede dar lugar a numerosas enfermedades. Los desequilibrios en los procesos de muerte celular, tanto en exceso como en defecto pueden acarrear graves consecuencias para los organismos. Ejemplos de ello son el caso de enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1, donde las células beta de las islas pancreáticas son eliminadas; la sepsis, donde se produce una apoptosis masiva de las células inmunes y gastrointestinales; o desórdenes neurológicos en neonatales responsables de defectos cognitivos (Hotchkiss, Strasser et al. 2009),

A pesar de ello, el ejemplo posiblemente más conocido es el desarrollo de neoplasias, dado que más del 50% de las mismas están relacionadas con defectos en supresores tumorales. Existen diferentes métodos por los que las células cancerosas pueden evadir la muerte, como es incrementando la expresión de genes antiapoptóticos o disminuyendo la expresión de genes proapoptóticos, que puede obtenerse por la metilación de ciertas regiones del ADN. También pueden afectar a la estabilización de los factores anti o proapoptóticos o incluso modular modificaciones postranscripcionales como la fosforilación de las proteínas implicadas en dicho proceso (Fernald and Kurokawa 2013).

En el caso de los tumores CIN, el bloqueo de la muerte celular conlleva la acumulación de dichas células aberrantes, convirtiéndose en fuente continua de diferentes tipos de estrés como son el proteotóxico, metabólico, replicativo o mitótico (Zhu, Tsai et al. 2018). En 2016 se demostró que la inestabilidad cromosómica inducía altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) que mediaban tanto la activación de la vía de JNK, como diversos mecanismos de respuesta responsables de los efectos deletéreos asociados a CIN (Clemente-Ruiz, Murillo-Maldonado et al. 2016).

Todo ello genera un efecto sistémico en el organismo que se inicia por una respuesta autocrina localizada en el tumor, pero acaba produciendo también un efecto paracrino donde otros tejidos, no solo el implicado, se convierten en una fuente de citoquinas proinflamatorias que serán responsables de generar un proceso de inflamación crónica, favoreciendo así la progresión tumoral (Romão, Muzzopappa et al. 2021).

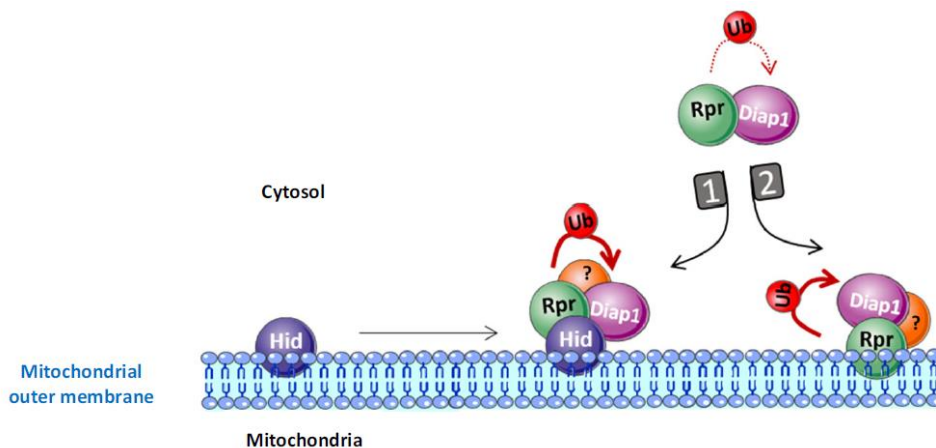
### 2.3 Activación de la vía apoptótica en *Drosophila melanogaster*

En *Drosophila*, la vía apoptótica es iniciada por la activación transcripcional de los principales genes proapoptóticos *reaper (rpr)*, *hid (head involution defective/Wrinkled)* y *grim*, seguido de un cuarto gen, menos conocido y descrito posteriormente, llamado *sickle (skl)* (Srinivasula, Datta et al. 2002). Sin embargo, la ausencia simultánea de los tres genes proapoptóticos principales por sí sola ha probado ser suficiente para generar el bloqueo casi completo de la apoptosis (White, Grether et al. 1994), motivo por el cual comúnmente se habla solo de tres genes proapoptóticos y son denominados RHG de forma abreviada. De ellos, se destaca normalmente la función de *rpr* y *hid* en la inducción de muerte en *Drosophila* (Bergmann, Tugentman et al. 2002, Hsu, Adams et al. 2002) (Steller 2008) (Brodsky, Nordstrom et al. 2000).

La relevancia en muerte de los tres genes proapoptóticos varía por diversos factores como el tejido, el tipo de estímulo o incluso el tiempo al que las células están sometidas a una señal concreta. Un ejemplo es que ante la expresión de la hormona esteroidea ecdisoma en las glándulas salivares, que regula los procesos de metamorfosis en *Drosophila*, se produce la activación de *rpr* tanto en la respuesta primaria del tejido como en la secundaria ante los pulso de esta hormona, a diferencia de *hid* que se induce solo en la respuesta secundaria o tardía (Jiang, Lamblin et al. 2000).

Entre sus principales diferencias está que las proteínas GRIM y RPR se encuentran en el citoplasma y sólo van a la mitocondria tras unirse a DIAP-1 donde inducen su ubiquitinación. Por el contrario, HID es la única que está localizada permanentemente en la mitocondria mediante una región C-terminal (Haining, Carboy-Newcomb et al. 1999).

A pesar de que las proteínas codificadas para los genes proapoptóticos no presentan muchas similitudes, todas comparten un motivo peptídico corto en la región N-terminal denominado IBM (*IAP- bind motif*), necesario para la interacción con la proteína IAP, y su consecuente degradación por ubiquitinación. Además, también se ha descrito que las proteínas RHG forman complejos heterodiméricos cuya interacción física resulta crucial para el proceso apoptótico (Sandu, Ryoo et al. 2010)(Figura 11).



**Figura 11. Interacción de las proteínas proapoptóticas HID, GRIM y RPR.** En la degradación de la proteína DIAP1 ante una señal proapoptótica las proteínas HID, GRIM y RPR ejercen su función a través de la membrana mitocondrial. (Clavier, Rincheval-Arnold et al. 2016)

Las proteínas IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) son una importante familia de inhibidores de caspasas conservadas tanto en insectos como en mamíferos (Salvesen and Duckett 2002). Los miembros de la familia IAP se caracterizan por tener en tándem entre una y tres repeticiones de un motivo BIR (*baculovirus IAP repeat*) localizado entre la zona amino-terminal y central de la proteína, y normalmente tienen también un motivo RING (*really interesting new gene*) en la región carboxi-terminal (Vucic,

Kaiser et al. 1998). Esto les permite regular mediante la ubiquitinación la actividad de las caspasas (Fuchs and Steller 2015).

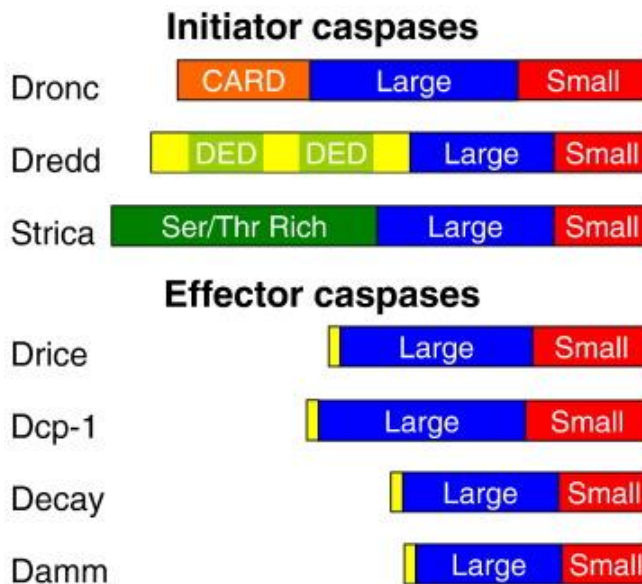
El genoma de *Drosophila* contiene cuatro proteínas IAP: DIAP1, DIAP2, dBRUCE y DETERIN, aunque la más importante es DIAP1 (*death-associated IAP*) (Bergmann 2010). Su función es bloquear constitutivamente la actividad remanente de caspasas que existe en los tejidos. Una vez los genes proapoptóticos se activan, generan el bloqueo de las proteínas IAP, permitiendo la activación de las caspasas (Hay 2000) (Wang, Hawkins et al. 1999).

Existen distintos mecanismos de activación de los genes proapoptóticos, ejemplos de ello son la activación mediada por p53, fundamental en mamíferos, o a través de distintas vías como JNK o JAK/STAT. Dichos mecanismos varían dependiendo del estímulo que los origina, y se desarrollarán más adelante en el capítulo 3 (Liu and Lin 2005) (Martínez-Morentin, Martínez et al. 2015) (Borensztein, Boissoneau et al. 2013).

## 2.4 Caspasas, inductores de muerte celular

La apoptosis es mediada, como se mencionó con anterioridad, por una familia de “cistein-aspartato-proteasas” denominadas “caspasas” que ejercen su función mediante el clivaje de sustratos vitales para las células. La apoptosis es un proceso conservado en todo el reino animal, pero la evolución de dicha vía ha generado que los organismos superiores muestren un sistema de mayor complejidad (Fan and Bergmann 2010). Por esta razón, mientras que en *C. elegans* existen sólo 4 caspasas, en *Drosophila* se han descrito 7 (Figura 12) y en mamíferos hay actualmente 15 identificadas (Takle and Andersen 2007).





**Figura 12. Estructura de las 7 caspasas caracterizadas en *Drosophila melanogaster*.** En la parte superior las 3 caspasas iniciadoras con el predominio de mayor longitud, y en la parte inferior las cuatro caspasas efectoras con el predominio corto.

Las caspasas se sintetizan en su forma inactiva denominada zimógeno o procaspasa, el cual precisa de un procesamiento enzimático para alcanzar su conformación activa. Dependiendo de la presencia de los motivos de interacción en sus prodominios, las caspasas se activan mediante mecanismos bioquímicos diferentes. De acuerdo con ello se pueden clasificar en caspasas iniciadoras, aquellas que poseen un prodominio largo, y caspasas efectoras, aquellas que poseen un prodominio corto (Fuchs and Steller 2015) (Kumar and Dumanis 2000).

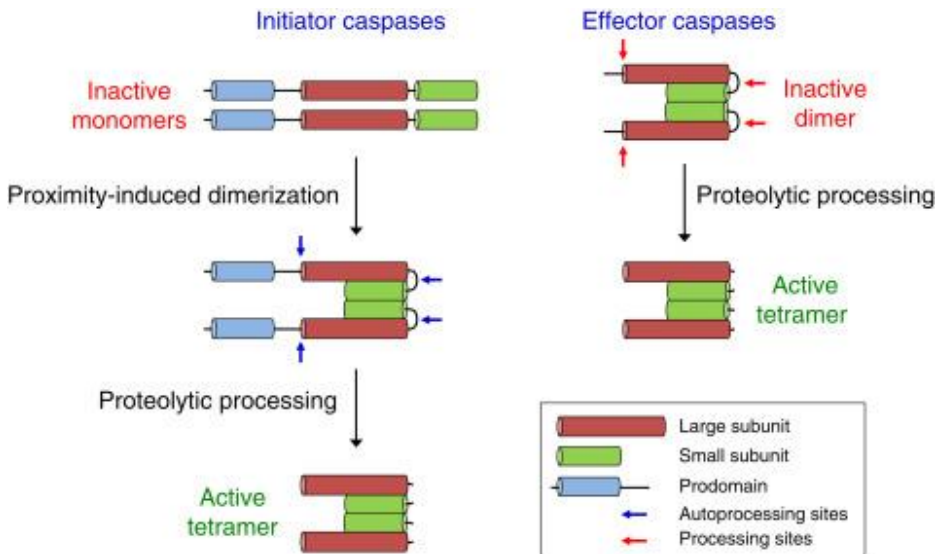
La conformación activa tanto de las caspasas iniciadoras como de las efectoras ha sido caracterizada mediante cristalización, mostrando que las caspasas activas enzimáticamente existen como tetrámeros

constituidos por dos heterodímeros de la subunidad larga y corta, que se ensamblan como homodímeros (Chai and Shi 2014)

Las caspasas iniciadoras están presentes en su forma inactiva como monómeros en el citoplasma de las células sanas. En este caso, la dimerización ocurre ante una alta concentración de monómeros del zimógeno que estimula la actividad catalítica y el clivaje autoproteolítico entre las dos subunidades. En *Drosophila*, la principal caspasa iniciadora es DRONC, homólogo de la caspasa-9 en mamíferos (Chai and Shi 2014, Puccini and Kumar 2016), aunque también se han descrito DREDD (relacionado con procesos de respuesta inmune) (Elrod-Erickson, Mishra et al. 2000) y STRICKA, cuyo papel en apoptosis ha demostrado ser poco significativo (Kondo, Senoo-Matsuda et al. 2006). Adicionalmente, a la activación autocatalítica de las caspasas iniciadoras puede ser facilitada por el reclutamiento por el apoptosoma. El principal componente del apoptosoma en mamíferos es Apaf1, cuyo homólogo en *Drosophila* es el complejo octamérico DARK (*Death-associated APAF1-related killer*) (Rodríguez, Oliver et al. 1999). El proceso en el cual DARK contribuye a la activación de DRONC todavía no se sabe con exactitud, aunque se cree que podría unirse a zimógeno, al ATP/dATP o a ambos (Chai and Shi 2014) (Figura 13).

En segundo lugar, se encuentran las caspasas efectoras, que, en contraste con las anteriores, están presentes como dímeros inactivos en el citoplasma de las células, y precisan de la escisión proteolítica de la caspasa iniciadora para su activación. Dicho proceso induce la reestructuración del centro activo e incrementa su actividad catalítica. En *Drosophila* las principales caspasas efectoras son drICE (*Drosophila ICE*) Y DCP1 (*death caspase 1*), homólogas de la caspasa-3 y caspasa-7 de mamíferos respectivamente, pero también se ha caracterizado la existencia de DECAY y DAMM (Puccini and Kumar 2016). A este nivel,

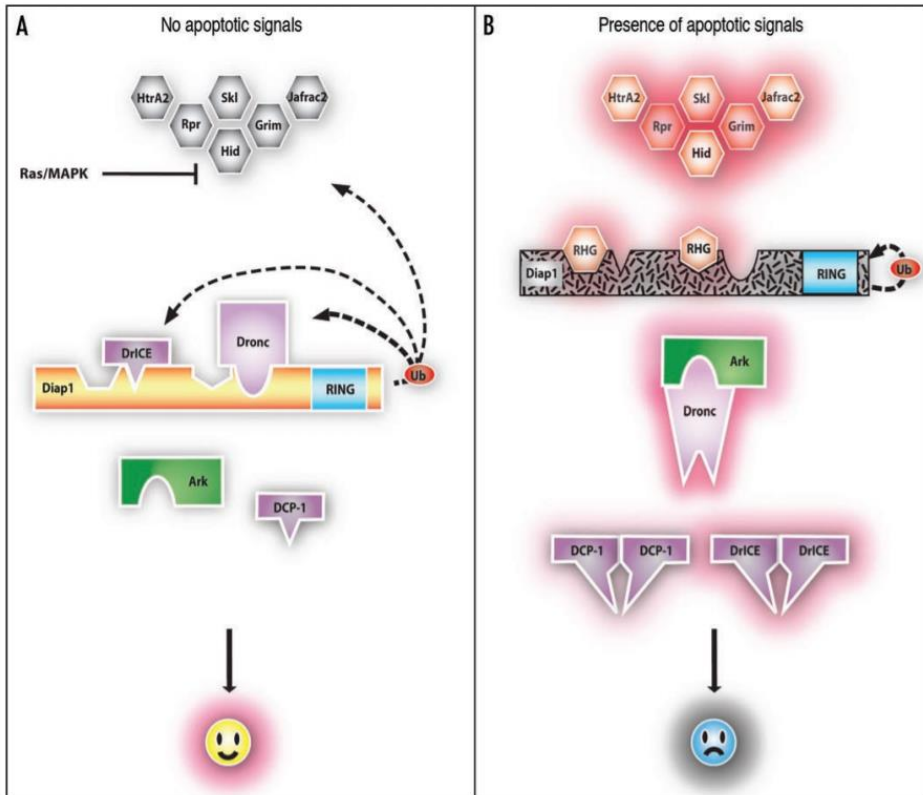
la muerte celular puede ser bloqueada mediante la proteína baculoviral p35, que actúa a nivel de las caspasas efectoras induciendo su ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Bader and Steller 2009) (Fuchs and Steller 2015) (Figura 13).



**Figura 13. Esquema de activación de las caspasas.** La dimerización desde su forma inactiva tras el clivaje de la procaspasa ocurre de forma diferencial dependiendo de las caspasas iniciadoras o efectoras (Puccini and Kumar 2016).

En situaciones no apoptóticas, DIAP 1 se une al zimógeno de DRONC e induce su ubiquitinación, evitando de esa manera tanto su acumulación como su activación (Wilson, Goyal et al. 2002, Bergmann 2010). Sin embargo, bajo una señal apoptótica, las proteínas proapoptóticas degradan DIAP1, permitiendo que DRONC active las caspasas efectoras por la escisión de la región DEVD (Schott, Ambrosini et al. 2017). Además, se ha descrito cómo DIAP1 puede interactuar directamente con las caspasas efectoras (Kumar 2007, Fuchs and Steller 2015) (Meier, Silke et al. 2000). Dicha interacción se produce por unión a la forma procesada tanto de drICE (Kaiser, Vucic et al. 1998) , como de DCP1

(Hawkins, Wang et al. 1999) (Figura 14). Pero, de manera paralela, dicho bloqueo puede ser en dirección opuesta, haciendo que las caspasas efectoras sean también capaces de bloquear la actividad de DIAP1 (Wang, Hawkins et al. 1999).



**Figura 14. Interacciones de DIAP1.** Interacción entre DIAP1 y las caspasas en una situación no apoptótica frente a una situación apoptótica donde DIAP1 es bloqueado por las proteínas proapoptóticas (Xu, Woodfield et al. 2009)

La función de las caspasas efectoras es muy amplia y se han identificado cientos de sustratos diferentes de las mismas. Su función va desde inducir alteraciones en la unión entre los nucleosomas y el ADN, produciendo la fragmentación del mismo tan característica de las células apoptóticas (Enari, Sakahira et al. 1998), hasta la activación de citoquinas

proinflamatorias, promoviendo su maduración y secreción (McIlwain, Berger et al. 2013).

Dentro de las caspasas efectoras, drICE es la principal inductora de apoptosis dado que se requiere en la mayoría de los tejidos en los que se ha caracterizado la muerte celular (Xu, Wang et al. 2006), mientras que DCP-1 queda relegado a un papel más específico del ovario. Sin embargo, en el caso del desarrollo del lóbulo óptico en *Drosophila*, DCP-1 sólo se requiere en situaciones donde la actividad de drICE está disminuida por mutaciones hipomórficas. Todo ello señala que drICE y DCP-1 presentan un papel redundante en la muerte celular, pero drICE tiene un papel más importante que el de DCP-1 (Akagawa, Hara et al. 2015).

Además, es interesante destacar que drICE se ha descrito que puede ser activado por DRONC, pero a su vez, que la forma activa de drICE también es capaz de activar al zimógeno de DRONC, generando entre ambos un bucle de amplificación cuyo objetivo es asegurar la muerte de la célula (Ziraldó and Ma 2015).

## **2.5 Funciones no apoptóticas de las caspasas**

Como se ha explicado en capítulos anteriores, la función más conocida de las caspasas es como ejecutores de muerte. Sin embargo, durante la última década, se han realizado numerosos descubrimientos que describen funciones de éstas, no relacionadas con la muerte celular.

Una de sus funciones secundarias es la de colaborar en la morfogénesis y organogénesis de los tejidos proporcionando fuerzas mecánicas

(Kawamoto, Nakajima et al. 2016). Esto genera que la inhibición de dicha vía cause defectos en el desarrollo como la formación aberrante del corazón o exencefalia (Ranger, Malynn et al. 2001).

Pero existen muchas otras funciones relacionadas directamente con su capacidad de procesar determinados sustratos sin que ello conlleve necesariamente la muerte de la célula. Un punto fundamental para evitar la letalidad de las caspasas son los niveles y la duración de su actividad, los cuales deben ser controlados para que su función se restrinja a la escisión de unos pocos sustratos. De esta manera se ha visto como, en las células madre embrionarias, la actividad transitoria de caspasas juega un papel crítico en la inducción eficiente de células madre pluripotentes en fibroblastos humanos (Li, He et al. 2010).

En el campo del envejecimiento celular, también se han descrito funciones destacables. Tanto es así, que normalmente el envejecimiento y la senescencia celular se relaciona con la presencia de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, se ha visto que dos componentes de la vía apoptótica de *C. elegans* (CED9 y CED4) pueden incrementar la longevidad celular por interacción con la cadena respiratoria mitocondrial, induciendo concentraciones óptimas de ROS, en un contexto independiente de inhibición de la apoptosis (Yee, Yang et al. 2014).

También, numerosos componentes de la vía apoptótica han demostrado tener papeles fundamentales en el campo de la fertilidad. Entre ellos se encuentra por ejemplo el papel de DRONC, caracterizado por ser un factor clave en la fertilidad masculina, ya que regula la individualización de las espermátidas durante el proceso de espermatogénesis. Defectos en dicho proceso generan esterilidad en los machos (D'Brot, Chen et al. 2013).

Respecto a la oogénesis, en *Drosophila* la caspasa efectora DCP1 mantiene la fisiología mitocondrial en condiciones basales mediante la interacción de su forma inactiva con el factor SeSB, una proteína mitocondrial que regula los niveles de ATP (DeVorkin, Go et al. 2014).

Otra función, esta vez relacionada con la capacidad metastática de los tumores CIN, fue descrita en 2018 por Benhra et al, artículo que se mencionó con anterioridad en el capítulo "*CIN, inductor de invasión celular en tejidos epiteliales*". En dicha publicación, se definió la contribución al fenómeno invasivo de la caspasa iniciadora DRONC. Dicho dato dejó abiertas numerosas incógnitas acerca de la contribución de la vía apoptótica a la migración de las células (Benhra, Barrio et al. 2018)(Figura 15).

En relación con la capacidad invasora de las caspasas también se publicó en 2013 que en ausencia de apoptosis la caspasa efectora DrICE era responsable de inducir invasividad celular en un modelo dependiente de JNK (Rudrapatna, Bangi et al. 2013).

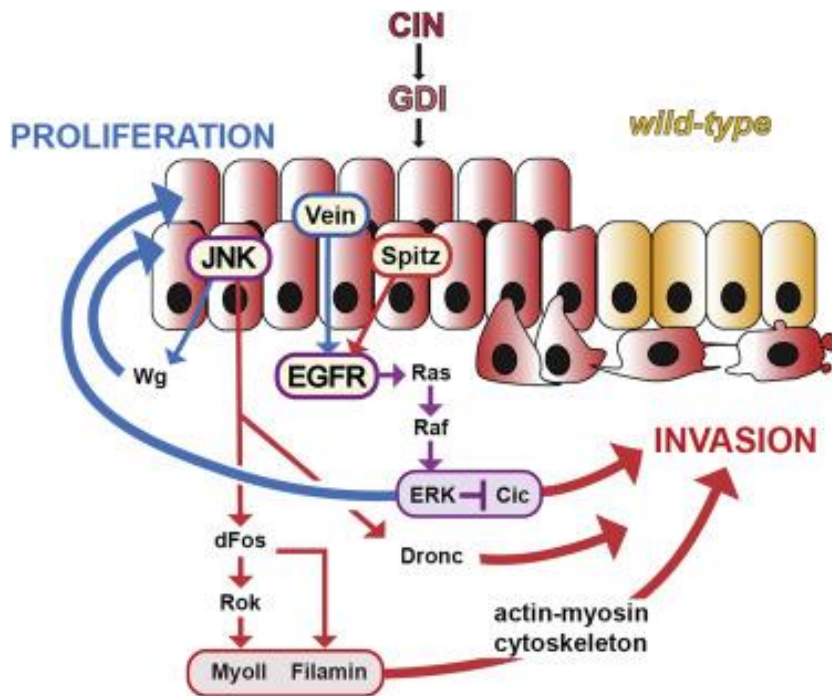


Figura 15. **Modelo migrante de inestabilidad cromosómica.** El sistema *CIN p35* actúa como inductor de migración celular mediante la activación de la vía de JNK y EGFR/ERK descrito en la publicación de nuestro laboratorio de 2018 Benhra et al. Se destaca también la actividad promotora de invasión de la caspasa iniciadora DRONC.



## Capítulo 3: Vías de activación de la apoptosis

### 3.1 JNK y la activación de caspasas

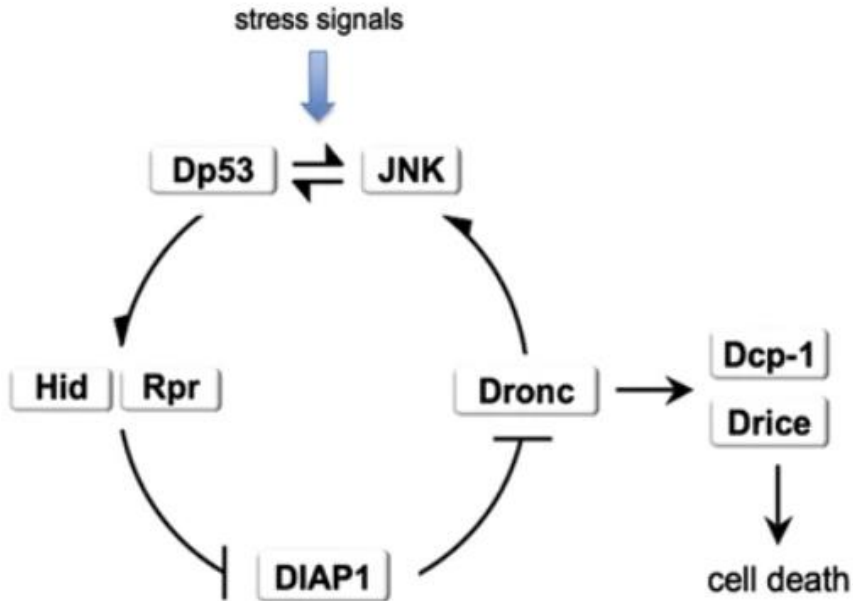
JNK es un regulador clave de numerosos eventos celulares, que abarcan desde la embriogénesis, respuestas a estrés o control del ciclo celular (Gerlach, Eichenlaub et al. 2018) (La Marca and Richardson 2020) (Cosolo, Jaiswal et al. 2019). Sin embargo, su papel en la muerte celular presenta ciertas controversias ya que ha demostrado que puede actuar tanto como un factor proapoptótico, como un factor antiapoptótico, dependiendo del tipo y de las condiciones del estímulo.

Además, dichas diferencias también varían dependiendo de los organismos. Por ejemplo, a diferencia del sistema de muerte extrínseca de mamíferos, en *Drosophila* la muerte inducida por Eiger (un factor tumoral de necrosis inductor de muerte celular) puede ser independiente de la actividad de las caspasas (Igaki, Kanda et al. 2002)

La vía de JNK puede inducir muerte tanto a través de la vía de las caspasas, como por vías independientes de las mismas. Por ejemplo, se ha descrito que JNK contribuye a la apoptosis inducida por el factor TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) (Tang, Tang et al. 2002). Sin embargo, en contraste también se ha caracterizado cómo puede suprimir la muerte en células hematopoyéticas mediante la fosforilación de proteínas de la familia Bcl-2 (Yu, Minemoto et al. 2004). Dicha dualidad de controlar muerte independientemente de las caspasas también se amplía a la proteína DIAP 1, para la cual también se han presentado evidencias de que puede bloquear la muerte inducida por Eiger en *Drosophila* (Igaki, Kanda et al. 2002).

La vía de JNK ha sido presentada en *Drosophila* como la principal inductora de muerte a través de la vía de las caspasas en respuesta a

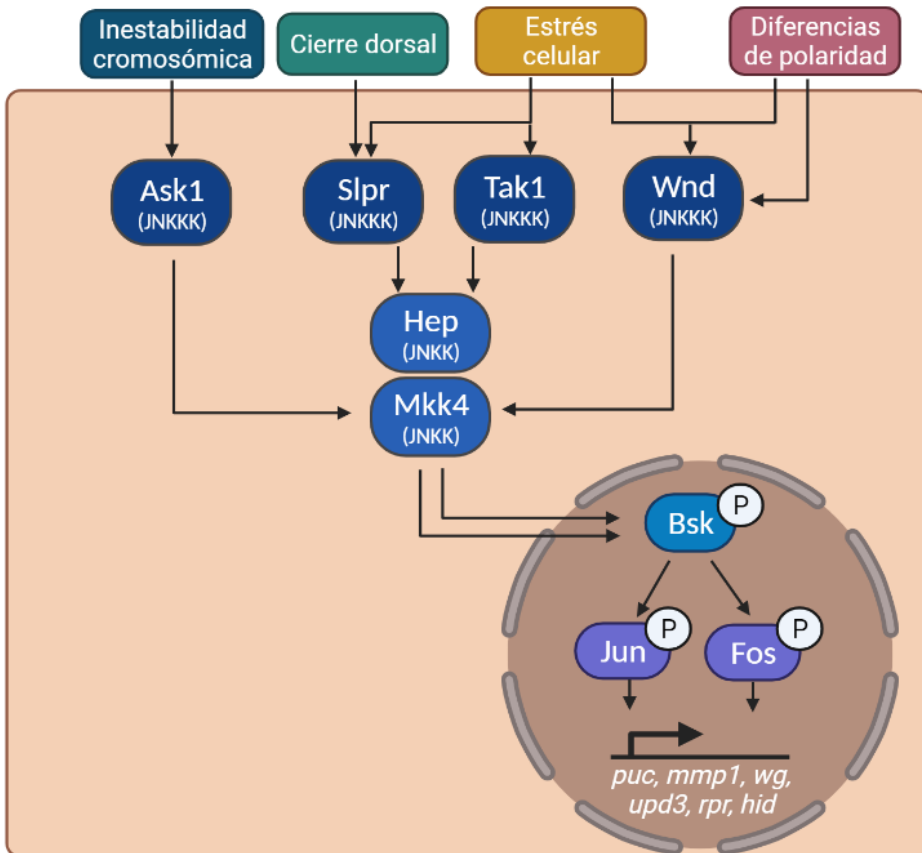
dos estímulos: la radiación UV (Tournier, Hess et al. 2000) y los procesos de *heat shock*. En dichos casos se ha descrito que genera un bucle de amplificación junto con p53 y la vía de las caspasas (Figura 16).



**Figura 16. Bucle de activación entre JNK y vía apoptótica.** Bucle de retroalimentación positiva descrito ante determinadas señales de estrés celular entre JNK, Dp53 y la vía de las caspasas. (Shlevkov and Morata 2012).

En *Drosophila*, la vía de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) es una vía de señalización MAPK (*mitogenic-activated protein kinase*) que actúa regulando la transcripción génica, influyendo así en la respuesta celular a un amplio rango de estímulos. Dependiendo de la señal de origen, existen dos JNK-quinasas: HEP (*hemipterous*) y MKK4 (*MAP kinase kinase 4*), y al menos cuatro JNKK-quinasas que son SLPR (*slipper*), WND (*wallenda*), Tak1 (*TGFB-associated kinase 1*) y Ask1 (*apoptotic signaling-regulating kinase 1*). Todas ellas confluyen en la activación de BSK (*basket*), el único ortólogo en *Drosophila* de los JNK existentes en humanos (JNK1, JNK2 y JNK3). La función de BSK es fosforilar y activar distintos factores transcripcionales (TFs) (La Marca and Richardson

2020). Como resultado se activan las proteínas AP-1 (*activator protein1*). Las proteínas AP-1 en *Drosophila* son JUN y FOS, sistema cuya activación promueve la expresión de genes como *dpp* (*decapentaplegic*), *puc* (*puckered*), *rpr* o *hid*, entre otros (La Marca and Richardson 2020) (Kockel, Homsy et al. 2001) (La Fortezza, Schenk et al. 2016) (Figura 17).



**Figura 17. Vía de JNK.** Vía de JNK activada ante distintas señales de estrés en la célula. Adaptación de La Marca y Richardson 2020.

Parte de la controversia que existe sobre el modo en que JNK interacciona con distintas vías radica en que JNK forma parte de un variado número de bucles de amplificación, lo que permite una activación persistente del mismo. Uno de los bucles clave identificados hasta la fecha es en el campo de la apoptosis, donde se ha visto que la caspasa

iniciadora DRONC puede mediar también la activación de JNK (Figura 16) (Shlevkov and Morata 2012). Bucles similares de amplificación con JNK han sido descritos también con otros componentes de la vía apoptótica como es el caso de HID (Rudrapatna, Bangi et al. 2013).

También existen otros procesos de retroalimentación positiva de esta vía como es el caso de carcinogénesis inducida por CIN, donde se ha visto que altos niveles de ROS producido en tejidos dañados son capaces de fosforilar y activar a ASK1, induciendo así altos niveles de JNK y apoptosis en el propio tejido. Sin embargo, en tejidos vecinos no dañados, las señales ROS se propagan activando la vía PI3K (Hietakangas and Cohen 2009), la cual altera la activación de ASK1 permitiendo bajos niveles de JNK y promoviendo así la proliferación y supervivencia, desempeñando una función regenerativa del tejido (Huang, Potter et al. 1999, Gao, Neufeld et al. 2000, Santabárbara-Ruiz, Esteban-Collado et al. 2019). Esto implica nuevamente que la función de JNK está íntimamente ligada a sutiles diferencias de activación en la misma.

Entre los dos bucles anteriores de DRONC - JNK y ROS - JNK, se publicó en 2018 un sistema conjunto que relaciona la retroalimentación positiva entre todos ellos, lo cual podría presentar una respuesta interesante de lo que ocurre en los tumores CIN de nuestro modelo. Dicho sistema se basó en dos proteínas que interactuaban directamente con la vía de las caspasas, DUOX (una NADPH-oxidasa) y MYO1D (Myosin 31DF). En dicha publicación demostraron que MYO1D (Myo1D) reclutaba a DRONC hasta la membrana celular donde se unía a DUOX. La interacción de ambos generaba la producción de ROS, la cual, a través de la activación de hemocitos, inducía la retroalimentación de JNK y la vía apoptótica (Amcheslavsky, Wang et al. 2018).

### 3.2 P53 y la función de la mitocondria en la activación de caspasas

P53 es un factor de transcripción ampliamente conocido por ser uno de los principales supresores tumorales. Tal es su relevancia en este ámbito que también es conocido por el nombre de 'Guardián del Genoma' (Lane 1992). Su relación con la progresión de distintos cánceres humanos ha sido ampliamente demostrada dado que alteraciones de este están presentes en un 50% de los tumores sólidos y ha sido caracterizado como un evento temprano en la malignización tumoral (Perri, Pisconti et al. 2016).

Este factor de transcripción se activa ante distintos estímulos de estrés celular tales como la genotoxicidad, daño del ADN, hipoxia, activación oncogénica, acortamiento telomérico, disrupción de microtúbulos, etc. (Hong, van den Heuvel et al. 2014, Ladds and Laín 2019). Más concretamente, altos niveles de AMP y bajos niveles de ATP, inducen la activación de AMPK (AMP-activated protein kinase), una quinasa responsable de activar por fosforilación a p53 (Mandal, Guptan et al. 2005).

El efecto de p53 depende mucho del grado de activación, de esta forma, ante una activación más moderada promueve la supervivencia celular mediante el arresto del ciclo celular entre las fases G1 y S mediante el bloqueo de la ciclina E, pero, si se produce un estrés más prolongado o severo abocará a la célula a la apoptosis (Owusu-Ansah, Yavari et al. 2008).

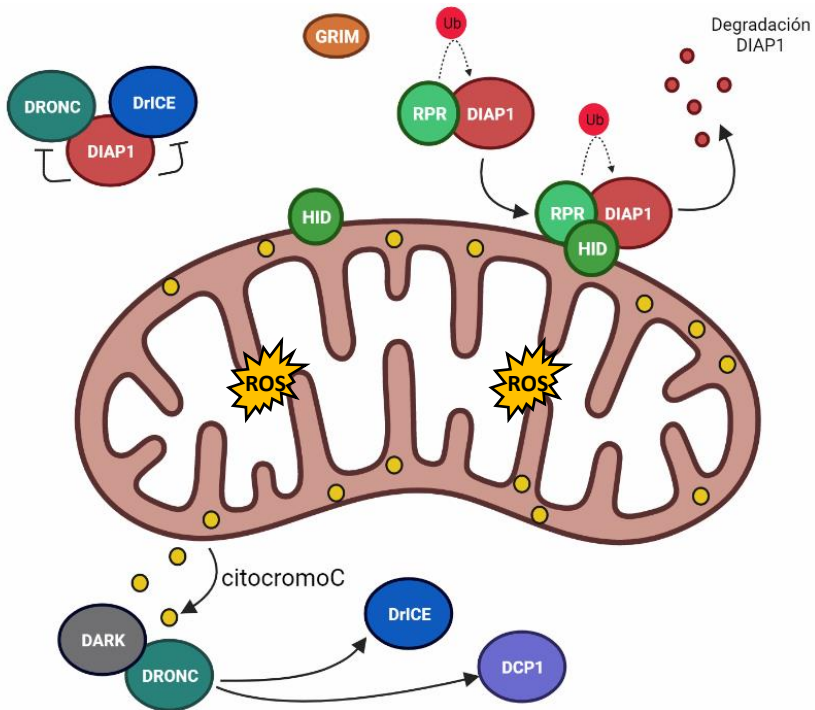
En mamíferos la familia de proteínas p53 la constituyen p53, p63 y p73, mientras que en *Drosophila* solo existe un homólogo, Dp53. Tanto en mamíferos como en otros organismos, la muerte celular ante determinados estímulos suele ir estrechamente relacionada entre JNK y p53, como es el caso de la respuesta a UV del tejido (Shaulian, Schreiber

et al. 2000) o por activación ante ROS (Nakamura, Ohsawa et al. 2014). Aunque la relación entre ambos presenta aun ciertas incógnitas, actualmente se considera que la activación puede ocurrir en ambos sentidos (Shlevkov and Morata 2012).

En mamíferos, p53 media la permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP-*mitochondrial outer membrane permeabilization*) en respuesta al estrés celular. Una de las consecuencias de dicha permeabilización es la liberación del citocromo C al citosol, donde activa la vía de las caspasas por la interacción con APAF1 y la procaspasa-9 (Martínez-Morentin, Martínez et al. 2015) (Clavier, Rincheval-Arnold et al. 2016).

El papel del citocromo C en la activación de la vía de las caspasas en *Drosophila* presenta cierta controversia. Esto se debe a que algunos estudios lo respaldan como un elemento contribuidor en base a que su presencia ha sido correlacionada con la formación de complejos de alto peso molecular que contenían las caspasas DRONC y DrICE. Sin embargo, por lo general dicho proceso se considera una consecuencia más que una causa de la activación de las caspasas (Clavier, Rincheval-Arnold et al. 2016) (Figura 18).

Además de ello, se ha visto que p53 también puede contribuir a la vía apoptótica en *Drosophila* de una forma independiente de la liberación del citocromo c, ya que se ha demostrado que *rpr*, *hid* y *grim* son dianas directas de este factor y que Dp53 es capaz de inducir directamente su expresión en los discos imaginales de ala y ojo (Fan, Lee et al. 2010, Martínez-Morentin, Martínez et al. 2015).



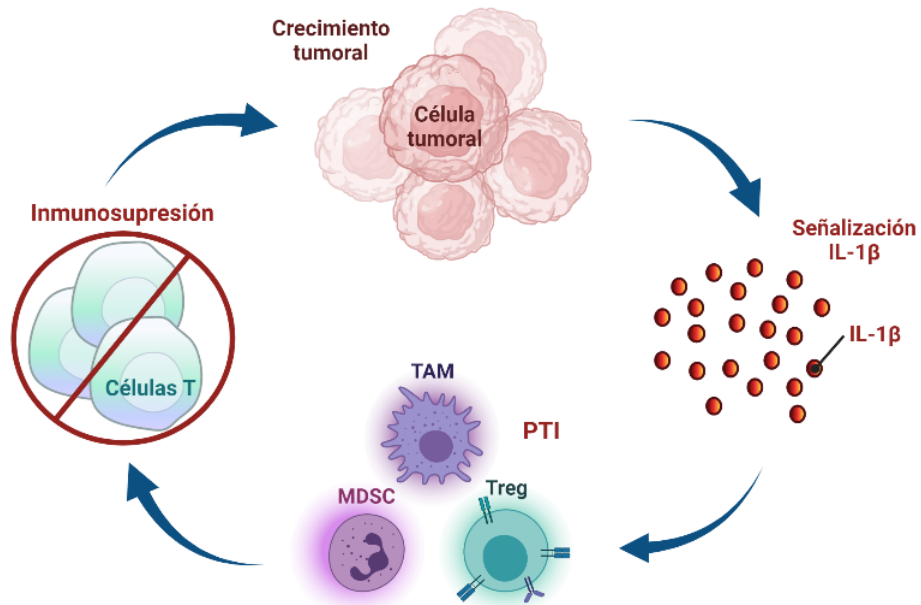
**Figura 18. Interacción de las caspasas con la membrana mitocondrial.** Adaptación de Clavier et al 2016 donde se muestra la interacción de las caspasas con la mitocondria ante una situación proapoptótica.

### 3.3 JAK/STAT y la activación de caspasas

La vía de JAK/STAT recibe su nombre de sus dos principales factores que son una familia de tirosín qinasas llamadas Janus (JAK) y una familia de factores transcripcionales citosólicos denominados STAT (*signal transducers and activator of transcription*). Esta vía, altamente conservada, está implicada en la respuesta inflamatoria ante distintos estímulos, pero también en desarrollo embrionario, hematopoyesis o regeneración. Problemas relacionados con esta vía pueden dar lugar a numerosas enfermedades. Un ejemplo de ello es que se ha caracterizado por ser responsable de las respuestas de inflamación crónica (Charles Jay and Eric 2009) (Levy 1999, Banerjee, Biehl et al. 2017).

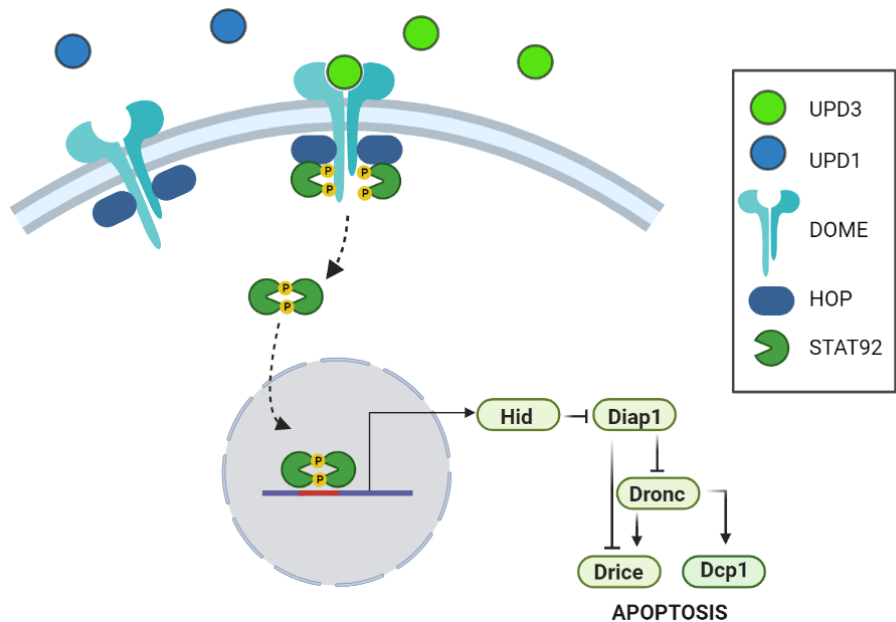
Los procesos inflamatorios crónicos han sido considerados desde hace mucho tiempo como un factor carcinogénico, pero sin una relación claramente definida. Sin embargo, durante los últimos años numerosos estudios han mostrado evidencias de como el microambiente inflamatorio fomenta la angiogénesis, la proliferación de células cancerosas y la invasión de otros tejidos. (Grivennikov, Greten et al. 2010). Tanto es así que existe un término cínico denominado PTI o Inflamación Pro-Tumorigénica, la cual destaca la función de la IL-1B en la progresión tumoral tanto en cáncer de pulmón como de mama (Carmi, Dotan et al. 2013) (Tulotta, Lefley et al. 2019) (Voronov, Shouval et al. 2003).





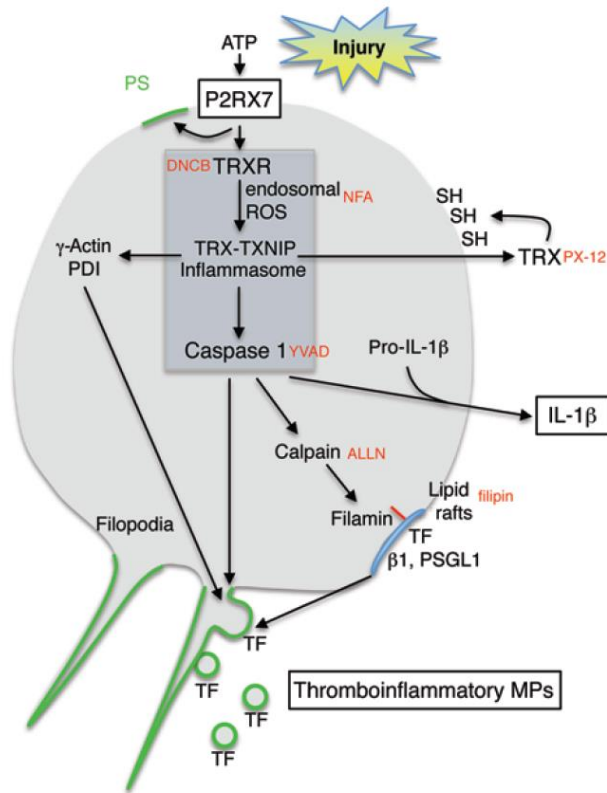
**Figura 19. Inflamación y carcinogénesis.** Imagen adaptada de Novartis Pharmaceuticals Corporation. Proceso de inflamación pro-carcinogénica donde se genera un bucle de retroalimentación positiva entre la IL-1B y las células tumorales, generando un estado de inflamación crónica que favorece al crecimiento tumoral. TAM: Macrófagos asociados a tumor. Treg (células T reguladoras), MDSC (células mieloides supresoras)

En *Drosophila*, la vía se inicia por la unión de un grupo de ligandos denominados UPD (*Unpaired*) constituida por UPD1, UDP2 y UDP3, a su receptor de membrana DOME (*Domeless*) induciendo su dimerización y la activación de HOP (*Hopscotch*), el único homólogo de JAK en *Drosophila*, y del factor transcripcional STAT92 (Herrera and Bach 2019). STAT92 es un factor transcripcional que, una vez activo, entra en el núcleo para tanto activar como reprimir determinados genes diana (Figura 20). Entre sus funciones se encuentra la regulación de la vía apoptótica mediante la activación específica de *hid*. En contraste, no presenta actividad sobre los otros dos genes proapoptóticos (Borensztein, Boissoneau et al. 2013, Maurya, Surabhi et al. 2021).



**Figura 20. Vía de JAK/STAT.** Activación de la apoptosis mediada por HID mediante la vía de JAK/STAT. Adaptación de Maury, Surabhi et al. 2021.

Además, es interesante destacar que la vía de JAK/STAT se ha relacionado con eventos de migración celular tanto en mamíferos como en modelos de invertebrados. En *Drosophila* está ampliamente descrito en la polarización de los epitelios durante la oogénesis (Silver and Montell 2001). Y en mamíferos se ha observado que, en procesos de inflamación crónica como la aterosclerosis y, más concretamente, la citoquina proinflamatoria IL-1B y la caspasa 1 son fundamentales para promover eventos de formación de filopodios en las células (Rothmeier, Marchese et al. 2015) (Figura 21).



**Figura 21 Modelo de generación de filopodios.** Modelo de mamíferos donde la caspasa 1 media la maduración de la IL.1B e influye en la generación de estructuras de filopodio en las células tumorales. (Rothmeier, Marchese et al. 2015)

Además de ello, en un estudio posterior de 2018 se asoció directamente como un factor carcinogénico en el cáncer de mama, al aumentar tanto la migración de las células tumorales como la formación de protrusiones de membrana en dichas células características de los fenómenos migratorios (Khanna, Lee et al. 2018). Todo ello muestra la gran importancia de los procesos inflamatorios en la progresión tumoral.



## **OBJETIVOS**



El modelo tumoral presentado por nuestro laboratorio ha demostrado que los tumores CIN son capaces de reproducir de forma eficiente fenómenos invasivos de los tumores epiteliales. De acuerdo con los datos recopilados en este campo queda vigente que hay diferentes vías que pueden ser responsables de la activación de la invasividad mediante la activación de la vía apoptótica. Con el fin de clarificar la contribución de las caspasas y las vías implicadas en la invasividad celular en nuestro modelo, los objetivos presentados a resolver en este trabajo fueron:

- Caracterización general del evento de migración.
- Determinación de los componentes de la vía apoptótica implicados en el fenotipo invasivo
- Confrontación de las funciones en muerte e invasividad de dichos componentes.
- Estudio del papel de la vía de JNK en el fenómeno invasivo, así como la posible implicación de Dp53 o la vía de JAK/STAT.
- Evolución temporal de la activación de la vía apoptótica.

De acuerdo con los resultados obtenidos durante este trabajo, como se explicará durante los resultados, se vio que había una coexistencia de dos vías que contribuían al fenómeno invasivo. En este punto se generaron dos nuevos objetivos con el fin de aportar más información en este ámbito:

- Interacción entre la vía de JNK y JAK/STAT para determinar si la exclusión en la población migratoria es consecuencia de un bloqueo mutuo.
- Evolución temporal de ambas vías en situación tumoral.
- Evolución temporal de las dos poblaciones migratorias en los tumores CIN.





# RESULTADOS



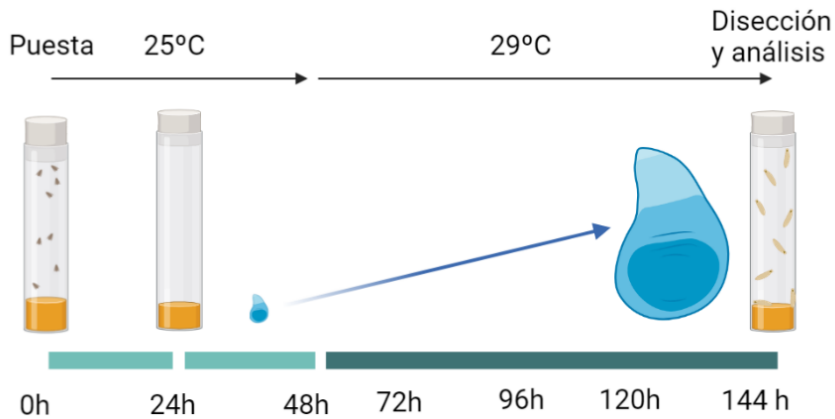
## CAPÍTULO 1: Evento migrante y activación de la vía apoptótica en tejidos CIN

### 1.1 Aspectos generales de la población migratoria

En situaciones tumorales, el tiempo es un proceso clave como ya expliqué en la introducción. El momento temporal en el que se encuentra cada tumor presenta una gran relevancia a la hora de entenderlo y tratarlo. Por esto, y de acuerdo con lo descrito anteriormente, y siguiendo los estudios publicados en 2018 (Benhra, Barrio et al. 2018), el primer objetivo fue el estudio detallado de esta migración a lo largo del tiempo y su relación con la activación de la vía apoptótica.

El modelo de estudio consistió en la inducción de inestabilidad cromosómica en discos de ala de larvas L3, generada mediante la depleción del gene SAC *bub3* bajo la expresión del promotor de ala *apterous (ap>)*. La muerte celular se bloqueó mediante la expresión de la proteína baculoviral p35, responsable de bloquear la apoptosis a nivel de las caspasas efectoras. Dicho sistema será referido a lo largo del trabajo como tumores CIN o *ap>CIN, p35*. Es importante destacar que durante este trabajo todos los experimentos, salvo aquellos en los que se indique lo contrario, fueron realizados a las 144 horas como se indica en el apartado “Material y Métodos” (Figura 22).

También es importante destacar que, dadas las comparaciones de tamaño a lo largo del trabajo, los discos de ala incluyen una barra a escala correspondiente en todos los casos a la misma medida, 50  $\mu\text{m}$ .



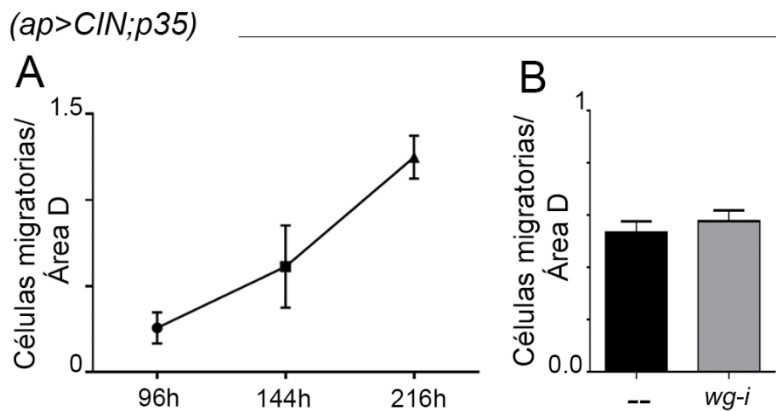
**Figura 22. Esquema temporal del modelo de estudio *CIN p35*.**

En primer lugar, el proceso metastático de un tumor se sabe que es un evento que comienza en un punto concreto del desarrollo del tumor y desde ese momento se incrementa exponencialmente y va acompañado de una mayor resistencia de estas células a los tratamientos farmacológicos. Por esta razón, lo primero fue la cuantificación y normalización de dicha invasividad para comprobar en qué momento se producía dicho incremento y que, además, este no era una consecuencia del crecimiento en paralelo del tumor primario.

Los resultados obtenidos mostraron que la invasión de la zona ventral del disco se producía ya en larvas L3 tempranas de 96 horas e iba incrementando a lo largo de los días siguientes hasta que las larvas entran en fase de pupa o mueren en la papilla (Figura 23A). Los datos fueron normalizados dividiendo por el Área Dorsal en todo momento para descartar que el incremento fuera una consecuencia del aumento de tamaño de los tumores a lo largo del tiempo.

De igual manera, y para comprobar que dicha invasividad era independiente del tamaño del tumor, también se analizó cómo afectaba a la invasividad de una situación de migración control (*CIN p35*) frente a

una situación donde se bloqueó mediante un ARNi específico la molécula mitogénica WG, cuyo incremento en nuestro sistema ha sido ampliamente descrito por nuestro laboratorio por ser el principal responsable del incremento del tamaño de los tumores (Muzzopappa, Murcia et al. 2017). La capacidad invasiva de dichas células no fue afectada por el bloqueo de WG corroborando su independencia del tamaño tumoral (Figura 23B).

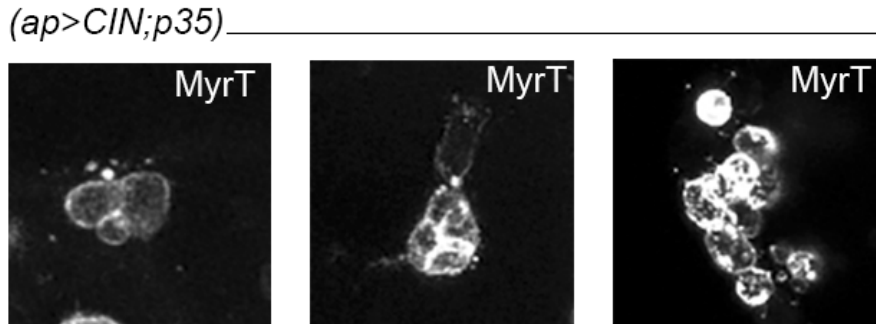


**Figura 23A. Incremento temporal de la invasividad.** La cuantificación de número de células migratorias muestra un incremento a lo largo de tiempo en discos de ala de larvas de 96, 144 y 216 tras su puesta en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*). Los datos fueron normalizados dividiendo por el área dorsal.

**Figura 23B. Invasividad independiente de crecimiento.** La invasividad celular del tumor no se ve afectada al bloquear el crecimiento mediante el bloqueo de la molécula mitogénica WG mediante el uso de *wg-RNAi* en un genotipo *apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35* en larvas de 144 horas.

Añadido a ello, un dato curioso que se caracterizó durante dicho análisis fue que las células migratorias presentaban patrones de agregación muy variados, pudiendo migrar individualmente o formando agrupaciones de

células de números muy variables que se observó que podían oscilar entre 2 o 8 células ([Figura 24](#)).

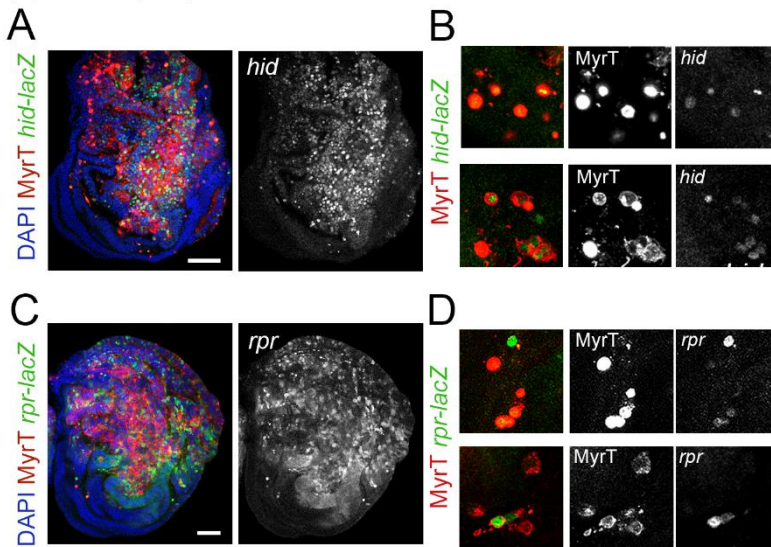


**Figura 24. Agrupaciones migratorias.** Células migrantes marcadas con la proteína de membrana MyrT. Las agrupaciones encontradas invadiendo el compartimento dorsal del disco de ala en el modelo tumoral *CIN p35* forman agregados de número muy variable.

## 1.2 Activación de la vía apoptótica en tejidos CIN

Para clarificar si dichos eventos de migración estaban realmente relacionados con la vía apoptótica, se realizó un análisis de caracterización de dicha vía mediante el uso de dos reporteros transcripcionales Lac Z para los dos principales genes proapoptóticos: *hid* y *rpr*. Dichos sensores mostraron que ambos genes proapoptóticos estaban activos en los tumores CIN ([Figura 25 A y C](#)). Además, se detectó activación de ambos sensores en numerosas células migratorias ([Figura 25 B y D](#)).

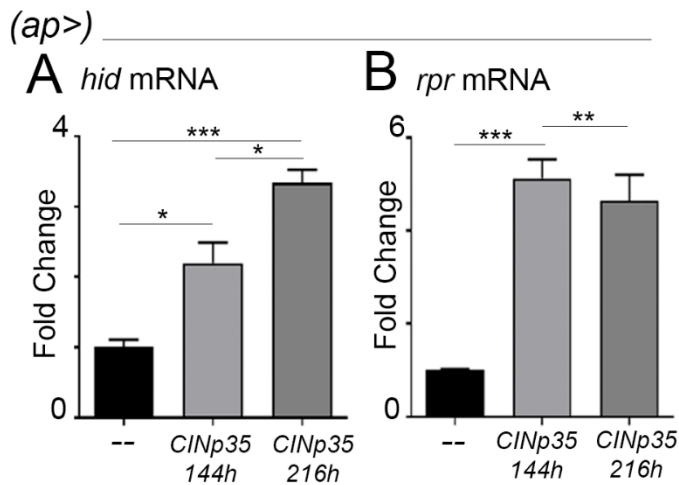
(*ap* > *CIN*; *p35*)



**Figura 25A-B. Patrón de expresión del gen pro-apoptótico *hid*.** Tejido *apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35* donde se muestra que *hid* se encuentra activo en la región en la región tumoral (A) así como en un alto número de células migratorias (B).

**Figura 25C-D. Patrón de expresión del gen pro-apoptótico *rpr*.** Tejido *apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35* donde *rpr* también está presente en la región tumoral (C) y en células migratorias (D).

Además de ver que ambos reporteros estaban activos en el modelo tumoral CIN, se cuantificó por qPCR el grado de sobreexpresión que presentaban ambos genes en un tumor CIN. De acuerdo con lo esperado, se obtuvo que ambos genes estaban sobreexpresados respecto al control, siendo dicho incremento 2 veces superior en el caso de *hid* (Figura 26A) y 5 veces para el caso de *rpr* (Figura 26B).



**Figura 26 A-B Expresión temporal *hid* y *rpr*.** qPCR de *hid* (A) y *rpr* (B) donde se compara la expresión de un tejido nativo (*ap>MyrT*) frente a un tumor CIN de 144 horas y otro de 216 horas. Se consideró significativo cuando el valor p era inferior a 0.001 (\*\*\*), 0,01 (\*\*), o 0.05(\*). Dicha significancia se utilizó de igual forma en todos los análisis que se mostrarán a continuación.

Respecto a su incremento a lo largo del tiempo lo que se observó curiosamente es que ambos genes proapoptóticos no aumentaban de manera paralela a lo largo del tiempo. En el caso de *hid*, se produjo un incremento continuado (Figura 26A), mientras que en caso de *rpr* se produjo un pico de expresión a las 144 horas donde dichos niveles se estabilizaban (Figura 26B).

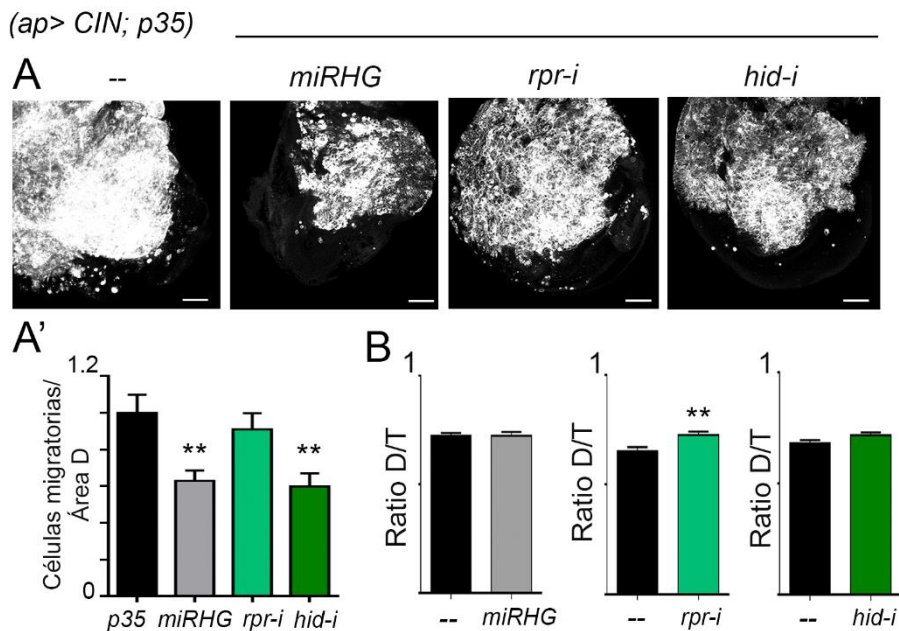
### 1.3 Papel de los genes proapoptóticos en la invasividad celular

Siguiendo con la hipótesis inicial de que las caspasas podían estar induciendo migración en dichas células, la siguiente cuestión a resolver fue si tanto la depleción de RPR como la de HID eran capaces rescatar



el fenotipo invasivo y en caso de que así fuera, si ambos contribuían de igual manera.

Con este fin, se estudió las variaciones en la invasividad de las células de un tumor CIN ante distintos bloqueos: bloqueo con *miRHG* (un microARN que bloquea RPR, HID y GRIN simultáneamente), bloqueo con *rpr-ARNi* o bloqueo con *hid-ARNi* (Figura 27A). Sorprendentemente, solo el *miRHG* y *hid-ARNi* fueron capaces de rescatar la invasividad celular, mientras que *rpr-ARNi* solo indujo una leve tendencia decreciente, pero



**Figura 27(A-A'). Genes proapoptóticos en invasividad.** Discos de ala de larvas L3 de un tumor CIN comparando la invasividad de las células en un control (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) frente otros tumores CIN donde se bloquean mediante RNAis todos los genes proapoptóticos al mismo tiempo (*miRHG*), o individualmente RPR o HID. Las cuantificaciones fueron normalizadas dividiendo por el área dorsal de los discos y las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m

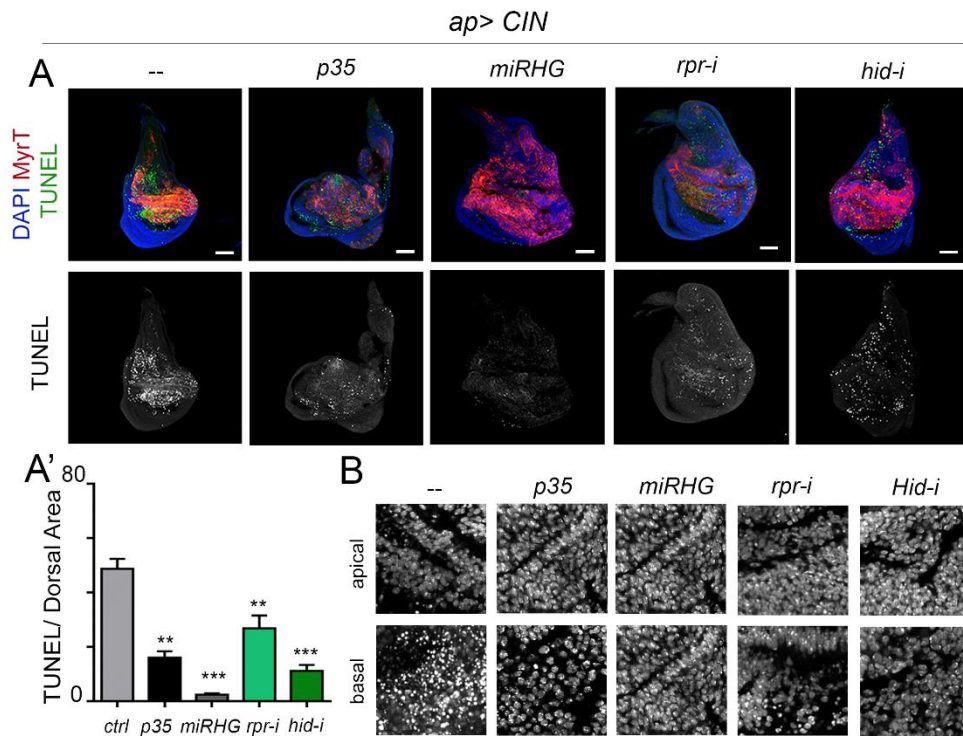
**Figura 27B. Efecto en crecimiento tumoral de los genes proapoptóticos.** Cuantificación del tamaño tumoral por la ratio dorsal/total.

no significativa (Figura 27A'). Además, hay que destacar que *hid-ARNi* por sí solo fue capaz de fenocopiar el efecto obtenido por el *miRHG*.

En paralelo, y dado que la vía apoptótica ha sido relacionada en otras situaciones, como se describió en la introducción, con la proliferación inducida por apoptosis (AiP), se analizó el tamaño de tumoral ante dichos bloqueos, obteniendo que en ninguno de los casos dichas depleciones alteraron el tamaño del tumor, y descartando por tanto que en el modelo tumoral que presentamos haya un fuerte efecto de dicho proceso (Figura 27B).

#### 1.4 Papel de los genes proapoptóticos en muerte celular

Sin embargo, como se ha explicado con anterioridad, la vía apoptótica es conocida por su papel como inductora de muerte celular. Por ello, y con el fin de saber si el bloqueo de dichos genes proapoptóticos era capaz, como debería esperarse, de rescatar la muerte celular, se realizó un análisis de inmunohistoquímica con TUNEL para medir la cantidad de muerte en un tejido CIN (situación con muerte activa) cuando se bloquea la vía con *p35*, *miRHG*, *hid-ARNi* y *rpr-ARNi* (Figura 28A). El resultado fue que en todos los casos se generó un fuerte rescate de la muerte celular, siendo el más significativo en presencia del *miRHG* (Figura 28A').



**Figura 28(A-A')** Muerte celular ante el bloqueo de genes proapoptóticos. Cuantificación por TUNEL de la muerte celular en discos de ala de larvas L3 en un tejido CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) sumado al bloqueo de la muerte de diferentes formas: *UAS p35*, *miRHG*, *hid-RNAi*, *rpr-RNAi*. La intensidad se midió y normalizó dividiendo por el área dorsal de los discos y las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

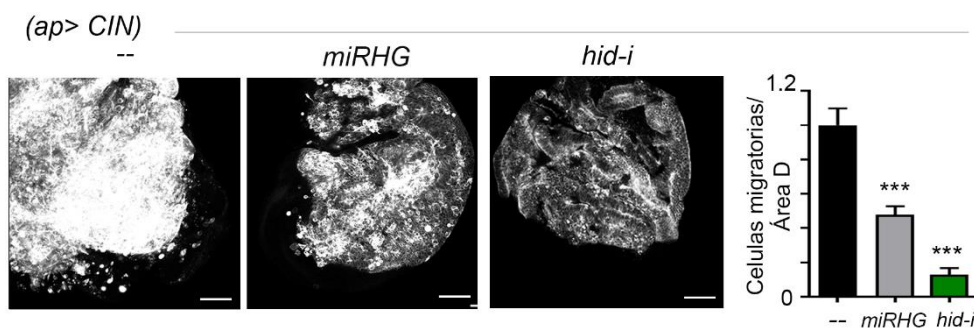
**Figura 28B. Genes proapoptóticos y picnosis nuclear.** Rescate de la picnosis nuclear en discos de ala de larvas L3 en un tejido CIN (con muerte activa) mediante *UAS p35*, *miRHG*, *hid-RNAi*, *rpr-RNAi* respectivamente.

Dichos resultados también fueron contrastados con el rescate de núcleos picnóticos en el tejido, lo cual corroboró los datos obtenidos de TUNEL (Figura 28B).

Los datos obtenidos confirman que tanto RPR como HID presentan una función apoptótica en nuestro sistema, y que el efecto nulo de *rpr-ARNi*

rescatando la invasividad celular no fue una consecuencia de un mal funcionamiento del ARNi.

Dado que el *miRHG* y *hid-ARNi* presentan un rescate en muerte igual o superior que el bloqueo con *p35* (Figura 28A'), se decidió cuantificar la invasividad celular para ver si por sí solos dichos bloqueos eran capaces de fenocopiar un bloqueo de la muerte al igual que *p35*, pero inducir además una disminución de la invasividad. En dicho caso, el rescate en ambos fue muy significativo, siendo el de mayor impacto el bloqueo de *hid-ARNi* (Figura 29). De esta manera, se corrobora la implicación de HID en el fenotipo migratorio de los tumores CIN.



**Figura 29. Genes proapoptóticos en invasividad en tejidos CIN.** Cuantificación de la invasividad celular en un fenotipo CIN (*apGAL4>MyrT*, *bub3-ARNi*) donde se compara en presencia de *UAS p35*, *miRHG* y *hid-RNAi*. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

Los resultados obtenidos de este primer bloque demuestran que los dos genes proapoptóticos *hid* y *rpr*, están presentes y muy activos en nuestro sistema. Además, indican que tanto *hid* como *rpr* presentan un papel como inductores en tejidos CIN, pero además *hid*, en una situación tumoral, presenta específicamente una segunda función no apoptótica que estaría relacionada con promover la invasividad de dichas células.

## CAPÍTULO 2: Contribución de las caspasas al fenotipo invasivo

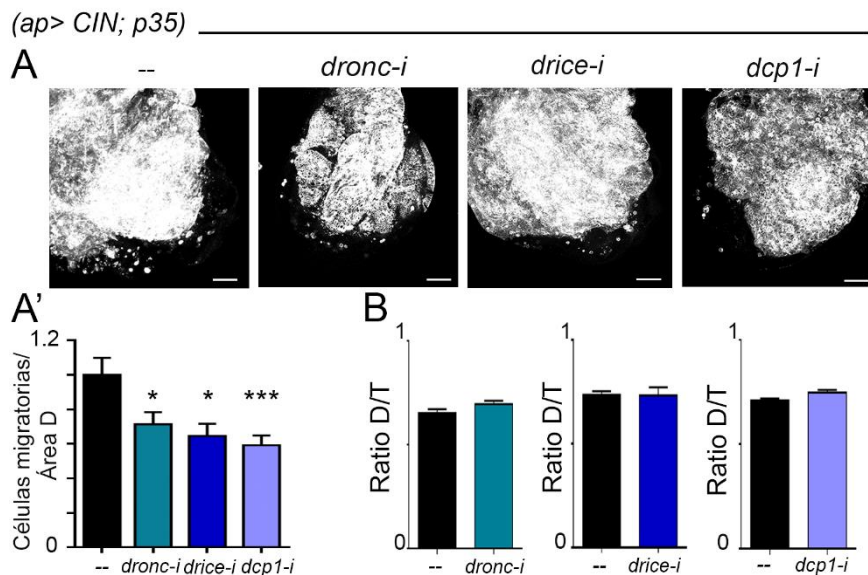
### 2.1 Papel de las caspasas en migración

Los datos obtenidos con anterioridad muestran que en los tumores CIN la vía apoptótica está altamente activa y su presencia es necesaria para el evento migrante, donde HID juega un papel fundamental. A partir de estas observaciones, el siguiente objetivo fue identificar una posible función no apoptótica de las caspasas, así como determinar cuál o cuáles desempeñaban dicha función.

Aunque el papel en migración de la caspasa iniciadora DRONC ya fue brevemente caracterizado con anterioridad en la publicación de 2018, se decidió estudiar dicho papel en mayor profundidad y esta vez, de manera paralela el de las caspasas efectoras, DrICE y DCP1. Dicha comparación entre las tres caspasas era especialmente necesaria para dilucidar si el papel en migración de DRONC era un efecto directo de esta caspasa o si por el contrario la migración podría depender de varios elementos de la vía apoptótica simultáneamente.

Para ello, la migración fue medida de igual manera que en el caso de los genes proapoptóticos en una situación tumoral donde se bloquearon mediante ARNis las tres caspasas individualmente (Figura 30A). En todos los casos se produjo un rescate de la invasividad celular; sin embargo, lo más sorprendente fue que *dcp1-ARNi* generara la mayor reducción de la migración celular (Figura 30A'), fenocopiando incluso los datos obtenidos previamente con el *miRHG* y *hid-ARNi* (Figura 27A'). Estos resultados demuestran que en una situación CIN p35, la actividad de las caspasas efectoras se ve reducida, pero no completamente eliminada, dado que los ARNis tanto de *drice* y *dcp1* si fueron capaces

de generar un rescate de la migración celular. Respecto al tamaño tumoral, en este caso tampoco se produjeron alteración por el bloqueo de las caspasas (Figura 30B).

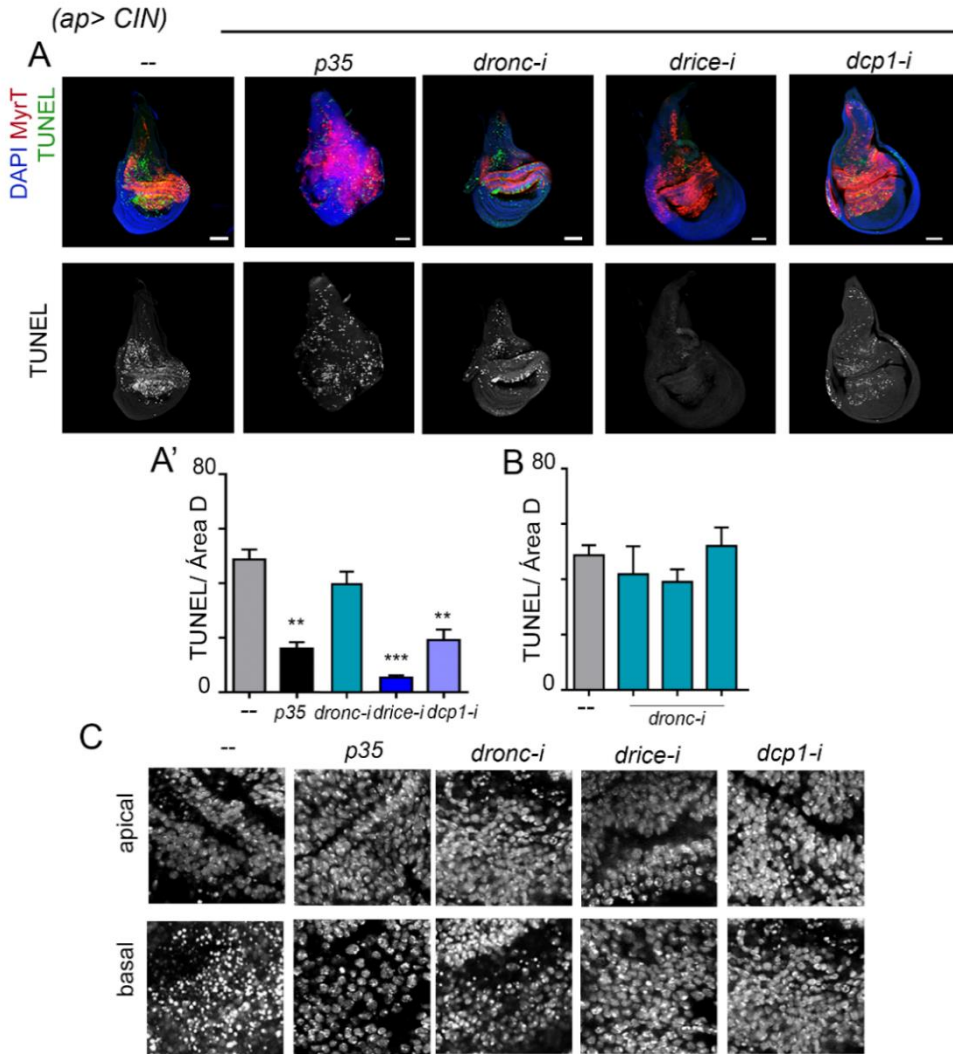


**Figura 30(A-A') Caspasas en invasividad.** Invasividad celular en discos de ala de larvas L3 al bloquear la vía apoptótica mediante *dronc-RNAi*, *drice-RNAi* o *dcp1-RNAi* respectivamente, en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-RNAi; p35*). Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

**Figura 30B. Efecto en crecimiento tumoral de las caspasas.** Medición del tamaño tumoral mediante el cálculo de la ratio resultante de dividir el área dorsal por el área total.

## 2.2 Contribución de las caspasas en un sistema CIN

Para corroborar la capacidad de dicho bloqueo de rescatar la muerte celular en nuestro sistema se realizó de nuevo la cuantificación con TUNEL en una situación CIN (muerte activa) al bloquear individualmente cada una de las caspasas (Figura31A). Solo el bloqueo de DRICE y DCP1 generaron un rescate significativo de muerte celular, mientras que el bloqueo de DRONC no fue suficiente para inducir rescate de la muerte en nuestro modelo (Figura 31A').



**Figura 31(A-A')** Muerte celular ante el bloqueo de las caspasas. Cuantificación por TUNEL de la muerte celular en discos de ala de larvas L3 en un tejido CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) donde se bloquea la muerte de diferentes formas: *UAS p35*, *dronc-RNAi*, *drice-RNAi*, *dcp1-RNAi*. La intensidad se midió y normalizó dividiendo por el área dorsal de los discos y las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m

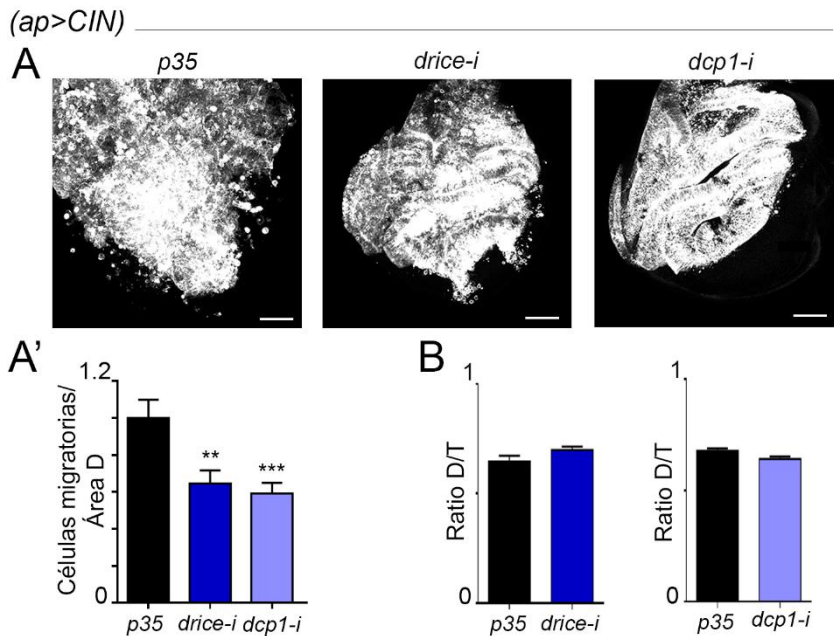
**Figura 31B** Muerte celular ante el bloqueo de DRONC. Cuantificación de TUNEL de una situación CIN al bloquear DRONC con tres RNAis diferentes.

**Figura 31C** Caspasas y picnosis nuclear. Rescate de la picnosis nuclear en discos de ala con muerte activa mediante *UAS p35*, *dronc-RNAi*, *drice-RNAi*, *dcp1-RNAi* respectivamente.



El bloqueo de DRONC fue testado con tres ARNis diferentes, y en ninguno de los casos se logró un rescate de muerte celular significativo (Figura 31B). Además, estos resultados fueron corroborados por el rescate de la picnosis de los núcleos (Figura 31C).

Respecto a los datos obtenidos en TUNEL de las caspasas efectoras es interesante resaltar que *drice-ARNi* por sí solo generó un rescate prácticamente total de la muerte celular, mientras de *dcp1-ARNi* fenocopió el rescate de *p35*. Dada la alta eficiencia obtenida, destaca que la misma herramienta genere un rescate de la migración más leve que en el caso de *dcp1-ARNi* (Figura 30A').



**Figura 32A-A'.** Caspasas efectoras en invasividad en tejidos CIN. Cuantificación de la invasividad celular en un fenotipo CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) donde se compara en presencia de *UAS p35*, *drice-RNAi* y *dcp1-RNAi*. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

**Figura 32B.** Efecto en crecimiento tumoral de las caspasas efectoras en tejidos CIN. Medición del tamaño tumoral (ratio dorsal sobre ratio total), el bloqueo de las caspasas efectoras no indujo cambios en ambos casos.



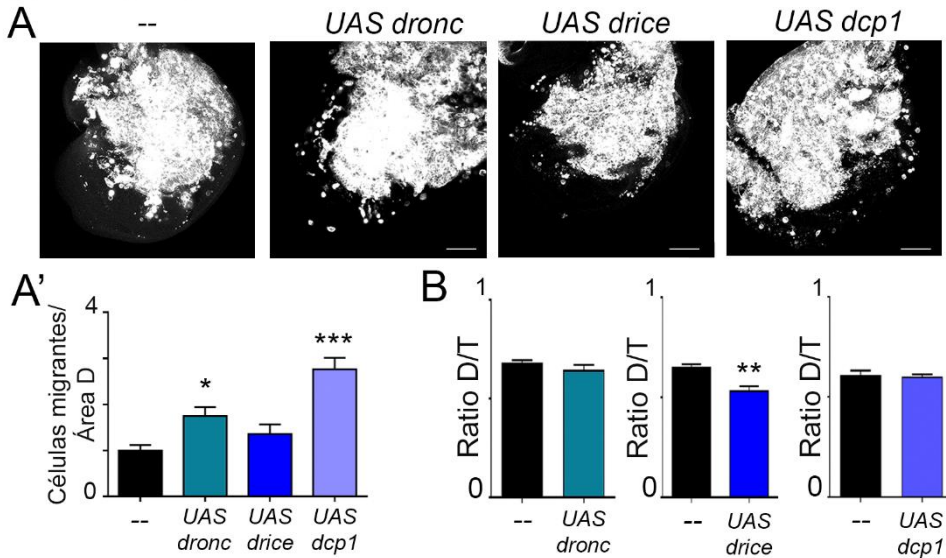
De igual forma que se hizo con los genes proapoptóticos, dado que DrICE y DCP1 mostraron ser necesarios tanto para la muerte como para la migración celular, se testó si eran capaces de reproducir la función de p35 a nivel del bloqueo de la muerte en tejidos CIN, pero sin genera el efecto invasivo. Dicho resultado se corroboró al rescatar la muerte celular de forma igual o superior a p35 respectivo, pero induciendo en este caso niveles de migración inferiores a los obtenidos en presencia de p35 (Figura 32A-A'). Además, de nuevo su bloqueo no tuvo repercusiones sobre el tamaño tumoral (Figura 32B).

### 2.3 Consecuencias de la sobreactivación de la vía apoptótica en tumores CIN.

Los datos obtenidos con anterioridad prueban que la vía apoptótica está involucrada en la inducción de invasividad en una situación tumoral cuando dichas células no pueden finalizar el proceso apoptótico. Todo ello en conjunto sugiere que la invasividad es directamente proporcional a un incremento de las caspasas efectoras.

Con el objetivo de testar dicha suposición se sobreexpresó en una situación tumoral las tres caspasas (Figura 33A-A'). Sorprendentemente solo la sobreexpresión de DRONC y DCP1 generó un aumento significativo de la invasividad celular. En el caso de la sobreexpresión de DrICE, solo se produjo un leve incremento que no llegó a ser significativo. Dichas sobreexpresiones no indujeron cambios en el tamaño tumoral, con la excepción de *UAS drice* (Figura 33B).

(*ap* > *CIN*; *p35*)

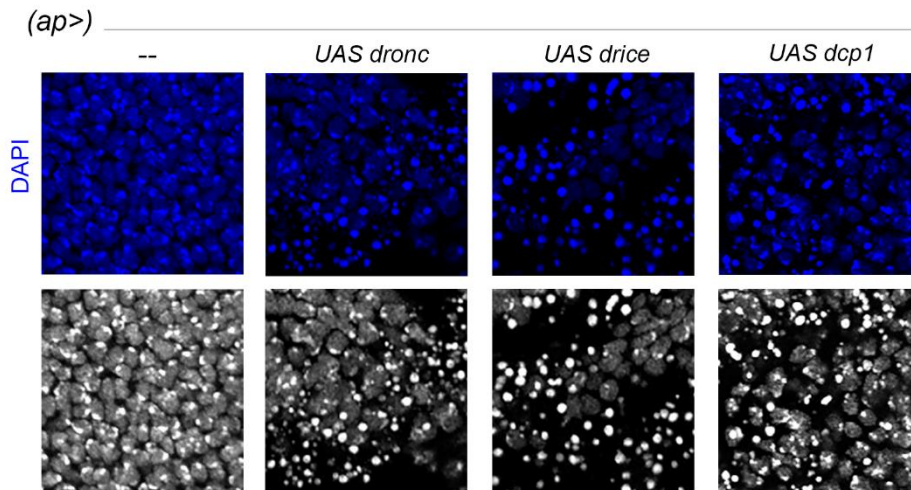


**Figura 33A-A'. Incremento invasivo por la sobreexpresión de las caspasas.** Cuantificación de la invasividad celular en un tumor CIN (*apGAL4*>*MyrT*, *bub3-ARNi*; *p35*) donde se sobreexpresan las tres caspasas DRONC, drICE y DCP1. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

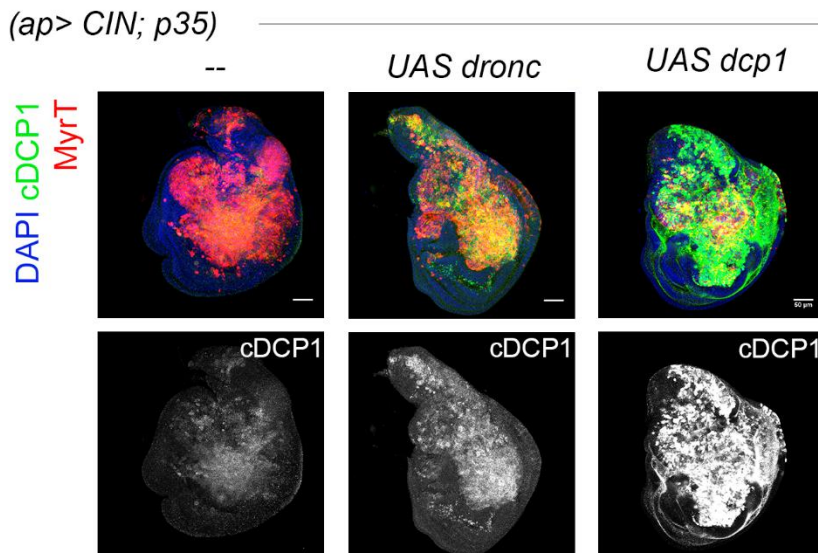
**Figura 33B. Efecto en crecimiento tumoral de la sobreexpresión de las caspasas.** Tamaño tumoral medido por el Ratio Dorsal/Total.

Además, se comprobó que las tres sobreexpresiones indujeran un alto grado de muerte celular al realizar la sobreexpresión sobre un tejido nativo, donde generó un alto grado de picnosis en sus núcleos (Figura 34), destacando el fenotipo de *UAS drice* como el que indujo el fenotipo más agresivo.

También, se verificó que el aumento en la migración observado en *UAS dronc* y *UAS dcp1* era realmente una consecuencia de una sobreactivación de la vía apoptótica. De hecho, se produjo un fuerte incremento de DCP1 activo en los tumores CIN (Figura 35), detectado mediante inmunohistoquímica con anticuerpo contra cDCP1 procesado y activo.



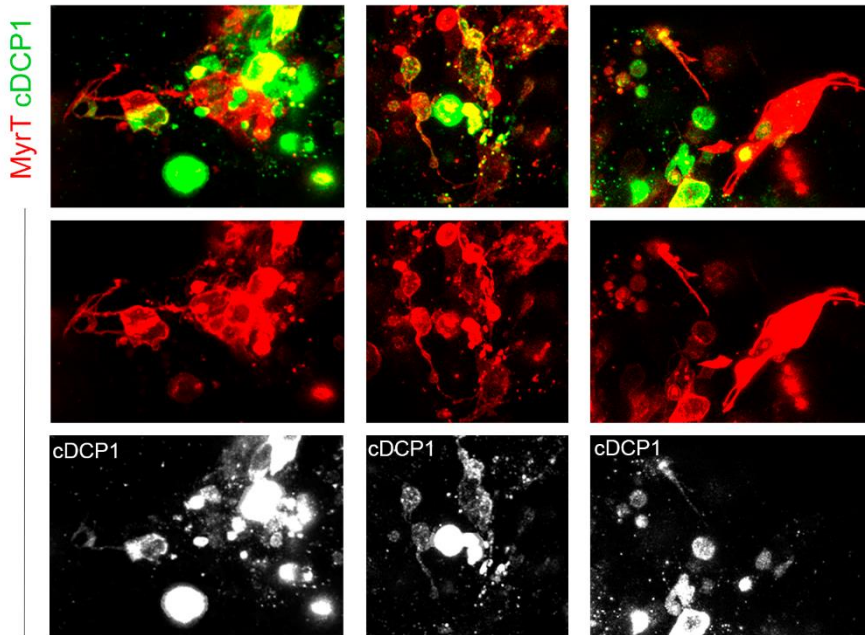
**Figura 34. Picnosis celular ante la sobreexpresión de las caspasas.** Picnosis nuclear de las células del disco de ala generada por la sobreexpresión de las caspasas DRONC, drICE y DCP1 en una situación de tejido nativo (*apGAL4>MyrT*).



**Figura 35. cDCP1 ante la sobreexpresión de las caspasas.** Inmunohistoquímica del anticuerpo de DCP1 donde se aprecia el aumento de DCP1 activo (cleaved DCP1) ante *UAS dronc* y *UAS dcp1* en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*). Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

Es importante destacar que *UAS dcp1* generó el incremento más acusado de DCP1, pudiéndose observar incluso una fuerte acumulación de este en las células que invadían el compartimento ventral (Figura 36).

(*ap>CIN; p35 UAS dcp1*)

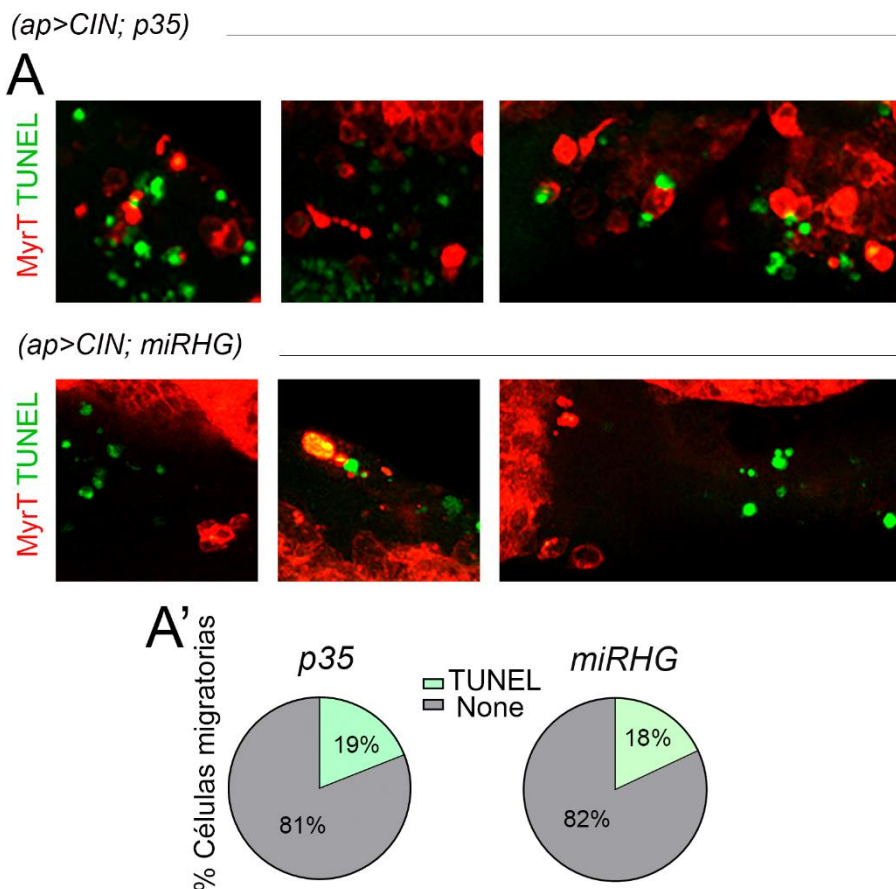


**Figura 36. cDCP1 en células migratorias.** Células migrantes con altos niveles de DCP1 activo ante la expresión de *UAS dcp1* en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) en del disco de ala.

#### 2.4 La migración en tumores CIN es un proceso invasivo activo.

Sin embargo, dado el hecho de que la presencia de caspasas en situaciones normales induce la muerte celular, cabía la posibilidad de que el fenómeno invasivo pudiera estar enmascarando una muerte tardía de las células. Para saber si realmente el proceso observado era una migración activa de células o simplemente eran células percederas que sufrirían el desplazamiento por la delaminación y desestructuración del

tejido tumoral, se realizó el análisis por TUNEL. Dicho análisis consistió en cuantificar el porcentaje de muerte en la población migratoria en un tejido CIN bloqueando la vía apoptótica a nivel de los genes proapoptóticos (*ap>CIN miRHG*), con una situación CIN p35, donde la vía apoptótica queda bloqueada a nivel de las caspasas efectoras. Dicho estudio mostró que ambos bloqueos poseían un porcentaje muy similar de células positivas para TUNEL (Figura 37A-A').



**Figura 37A-A'. TUNEL de la población migrante.** TUNEL de las células migrantes en una situación CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) donde se bloqueó la muerte mediante *p35* (final de la vía apoptótica) y *miRHG* (inicio de la vía apoptótica). La cuantificación muestra el porcentaje de células positivas para TUNEL en ambos casos.

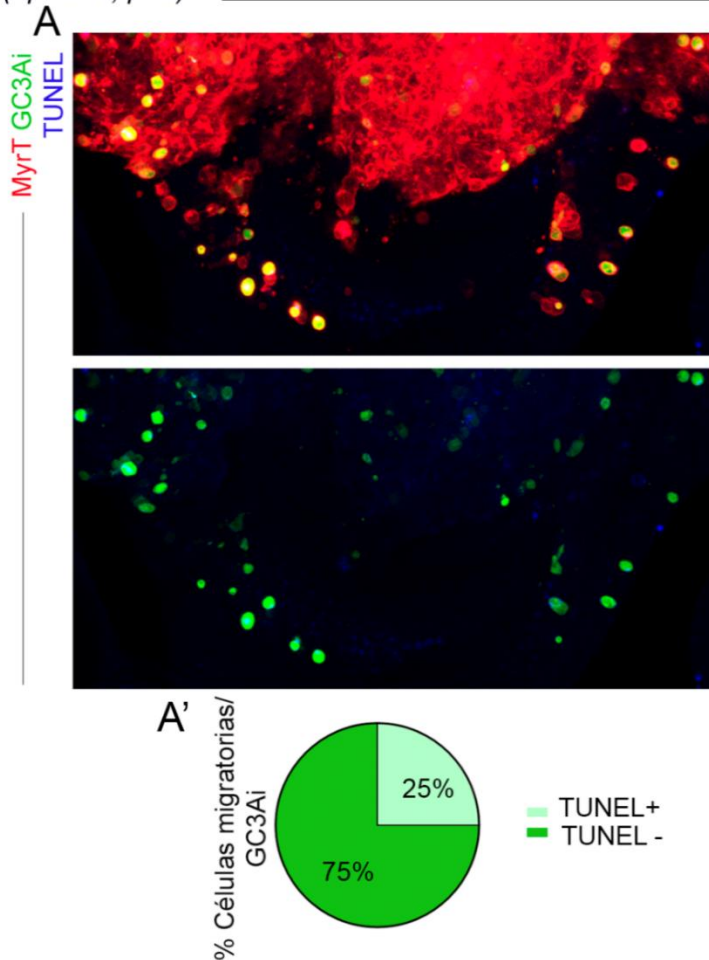
Este resultado implica, por un lado, que en la población migratoria aproximadamente un 20%, sufren un proceso de muerte independiente de la vía apoptótica, pero, por otro lado, que el 80% de la población migratoria es negativa para marcadores de muerte, descartando así que la mayoría de las células invasivas sean una población de células percederas

Sin embargo, aún era necesario correlacionar dicha población migrante realmente con la presencia de caspasas y asegurar que dichas células con caspasas activas no eran mayoritariamente positivas para marcadores de muerte. Dicha información se corroboró mediante el uso del sensor GC3Ai, capaz de marcar aquellas células que presentan actividad de caspasas (Schott, Ambrosini et al. 2017).

La colocalización del sensor de caspasas con TUNEL demostró que, de la población migrante positiva para caspasas, tan solo el 25% eran positivas para TUNEL (Figura 38A-A'), lo que implica que el 75% de células migrantes con altos niveles de caspasas activas no presentaban marcadores de muertes, y por tanto que la migración generada por la vía apoptótica es un proceso activo realizado por células que están evitando el proceso de muerte.



(ap>CIN; p35)

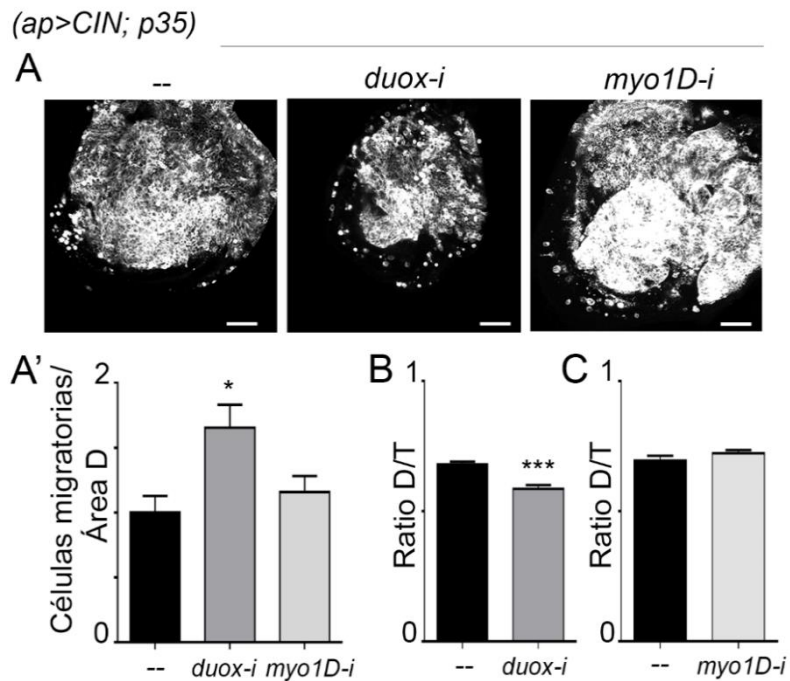


**Figura 38A-A'.** Colocalización TUNEL y sensor GC3Ai. Cuantificación de la colocalización de células migratorias en un tumor CIN positivas para TUNEL (azul) y para el sensor de caspasas GC3Ai (verde).

## 2.5 DUOX y MYO1D no son necesarios para la migración celular

Como se explicó en la introducción, en 2018 se publicó que en el disco de ala en *Drosophila* un sistema de retroalimentación positiva que guiaba la activación de la vía de las caspasas e influía directamente sobre la función de la caspasa iniciadora DRONC (Amcheslavsky, Wang et al. 2018). De acuerdo con este sistema la proteína MYO1D contribuía a

localizar la proteína DRONC en a la membrana celular donde su interacción con DUOX se traducía en la secreción de ROS al espacio extracelular, que concluía con una activación en bucle de JNK y la vía apoptótica a través de *hid*. Con el propósito de analizar si dicho sistema también estaba implicado en el fenotipo migratorio de nuestro modelo, se bloquearon ambas proteínas mediante *duox-ARNi* y *myo1D-ARNi* en tumores CIN.



**Figura 39A-A'. DUOX y MYO1D en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) al bloquear las proteínas DUOX y MYO1D. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

**Figura 39B-C. Efecto en crecimiento tumoral de DUOX y MYO1D.** Cuantificación del tamaño tumoral mediante el Ratio D/T.

El resultado fue que *myo1D-ARNi* no indujo ninguna alteración ni en la invasividad (Figura 39A) ni en el tamaño tumoral (Figura 39C). Sin embargo, el bloqueo de DUOX generó un incremento de la invasividad

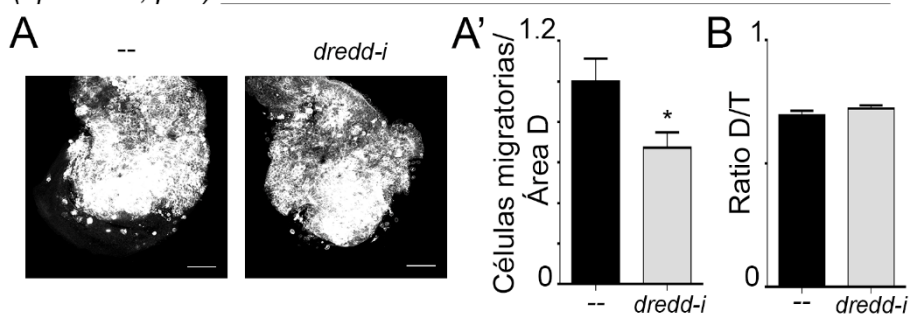


(Figura 39A), acompañado de una disminución del tamaño tumoral (Figura 39B). Dichos resultados indican que el sistema mencionado no media la activación de la vía de las caspasas, sin embargo, el hecho de que el bloqueo de DUOX generase un incremento de la invasividad celular si podría sugerir una interacción con la vía apoptótica como bloqueador de alguno de sus componentes, o como competidor por la interacción con DRONC (este punto se desarrollará posteriormente en el apartado Discusión).

## 2.6 La caspasa iniciadora DREDD también contribuye a la invasividad celular en los tumores CN

Como se explicó con anterioridad, existen caspasas de la vía cuyo papel se ha caracterizado como secundario poco relevante, sin embargo, en vista de que los resultados con DRONC presentaron cierta controversia acerca de su papel como único activador de las caspasas efectoras, decidió testarse también la posible implicación de la caspasa iniciadora DREDD (Figura 40).

(*ap>bub3i; p35*)

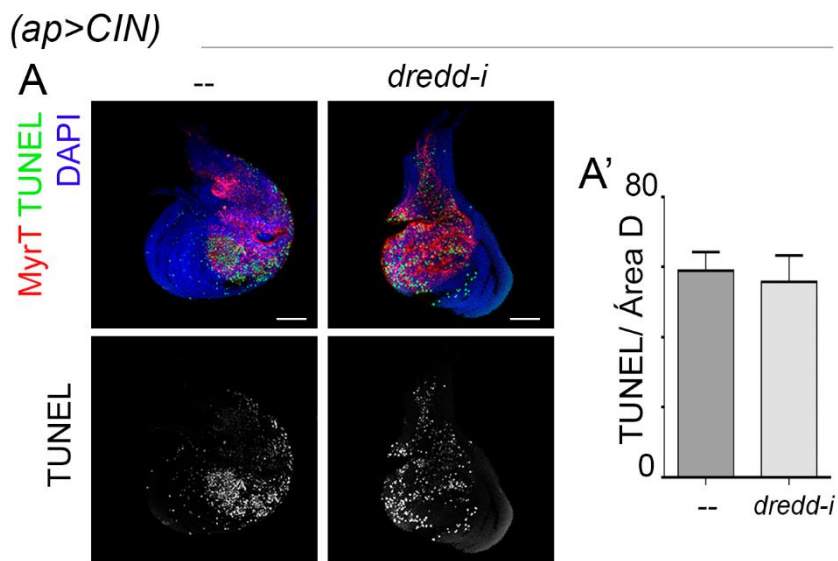


**Figura 40A-A'. DREDD en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) al bloquear la caspasa iniciadora DREDD. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

**Figura 40B. Efecto en crecimiento tumoral de DREDD.** Cuantificación del tamaño tumoral mediante el Ratio D/T.

El resultado del bloqueo de DREDD en tumores CIN también generó un descenso significativo de la invasividad celular (Figura 40A-A'), sin afectar al tamaño tumoral (Figura 40B).

Respecto a su capacidad de rescatar muerte, los resultados obtenidos por TUNEL del bloqueo en tejidos CIN (muerte activa) mostraron también que *dredd-ARNi* tampoco fue capaz de rescatar la muerte celular (Figura 41A-A').



**Figura 41A-A'. Muerte celular ante el bloqueo de DREDD.** Cuantificación por TUNEL de la muerte celular en tejidos CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) al bloquear la caspasa iniciadora DREDD. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

Todo ello en conjunto, sugiere que DREDD participa en el evento migrante de los tumores CIN al inducir una disminución de la invasividad celular. En consecuencia, podría sugerir la presencia de varios factores activadores de las caspasas efectoras.

### CAPÍTULO 3: Contribución de JNK en la activación de la vía apoptótica responsable del fenotipo invasivo

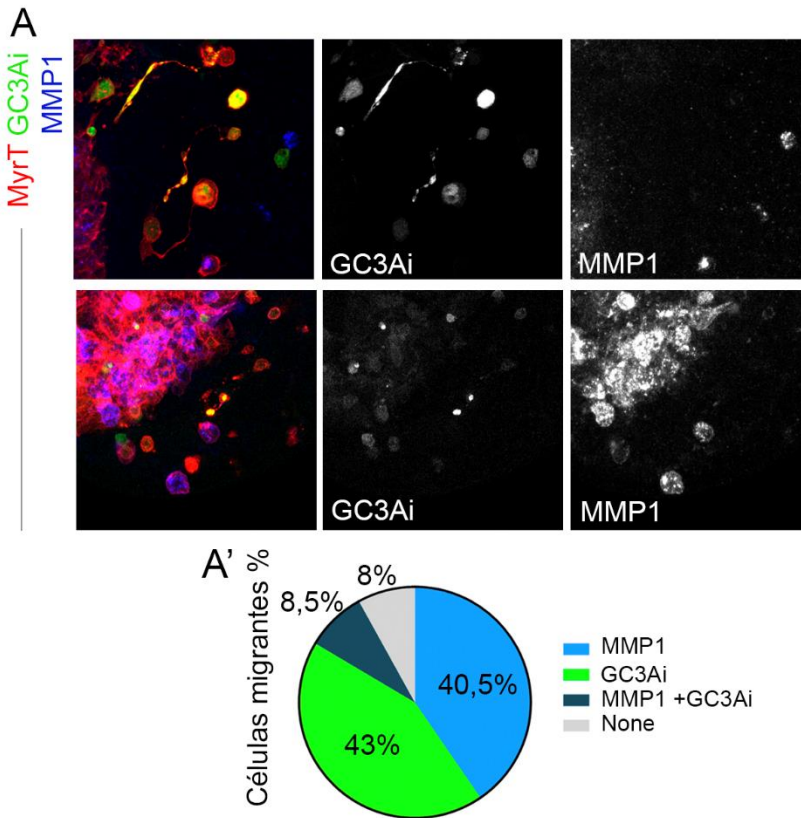
#### 3.1 Coexistencia de dos poblaciones migratorias en los tumores CIN

Una vez caracterizado que la vía apoptótica contribuía al fenotipo invasivo, el siguiente objetivo fue determinar la vía responsable de su activación. Como se explicó anteriormente, existen distintas vías descritas que son capaces de activar la vía apoptótica, sin embargo, dado que ya nuestro laboratorio describió previamente el rescate de la migración por el bloqueo de la vía de JNK (Benhra et al. 2018), este fue el primer candidato a testar.

En primer lugar, se analizó la posible colocalización de la actividad de caspasas, detectado con el sensor GC3Ai (Schott, Ambrosini et al. 2017), con la vía de JNK, detectado mediante el anticuerpo de MMP1. El resultado obtenido mostró que ambas poblaciones celulares presentaban una alta exclusión (Figura 42A). Los porcentajes obtenidos fueron que un 40,5% de las células migratorias eran positivas para MMP1, el 43% eran positivas para el sensor de caspasas GC3Ai, un 8% de las células no presentaron marcaje por ninguna de ellas y tan solo un 8,5% de las células presentaban colocalización de los dos marcadores (Figura 42A').

El resultado obtenido muestra que hay un pequeño porcentaje de células (8,5%) que sí podrían corresponder a caspasas activadas por la vía de JNK, sin embargo, la gran exclusión obtenida entre ambas sugirió que podría existir una segunda vía, además de la vía de JNK, que estaría contribuyendo al fenómeno invasivo asociado a la vía de las caspasas.

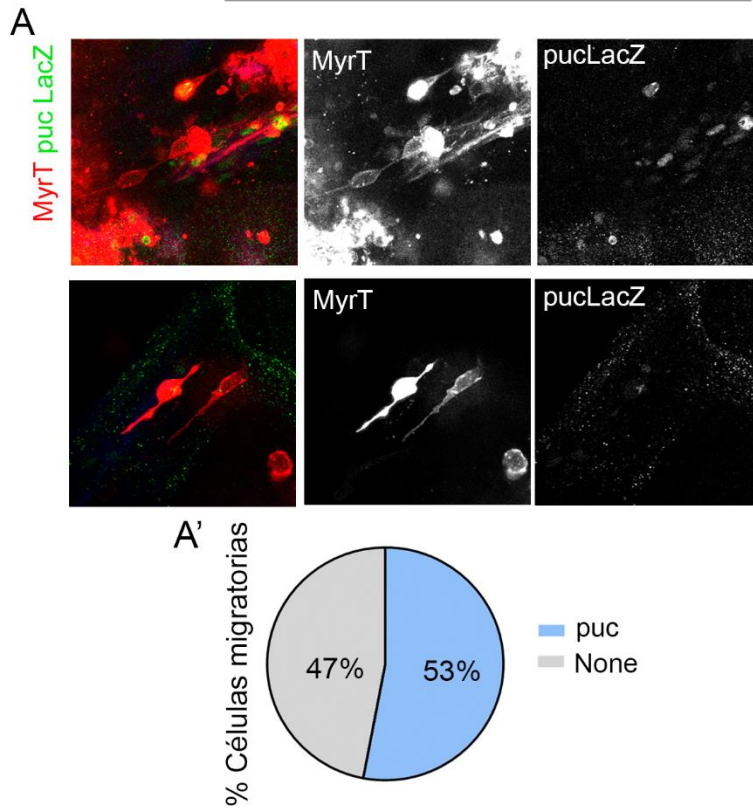
(*ap* > *CIN*; *p35*)



**Figura 42A-A'. Poblaciones migratorias.** Poblaciones migratorias en tumores CIN donde se marca la población de caspasas mediante el sensor GC3Ai y JNK mediante MMP1. La cuantificación muestra que ambas poblaciones son altamente excluyentes.

Para corroborar la presencia de dos poblaciones dentro de las células migratorias se utilizó un segundo sensor de la vía de JNK, en este caso *puc LacZ* (Figura 43A). La cuantificación de este también mostró que un 47% de las células migratorias eran negativas para el sensor de JNK y corroborando así que existen dos poblaciones diferentes, donde solo una de ellas era positiva para sensores de la vía de JNK (Figura 43A').

(*ap* > *CIN*; *p35*)



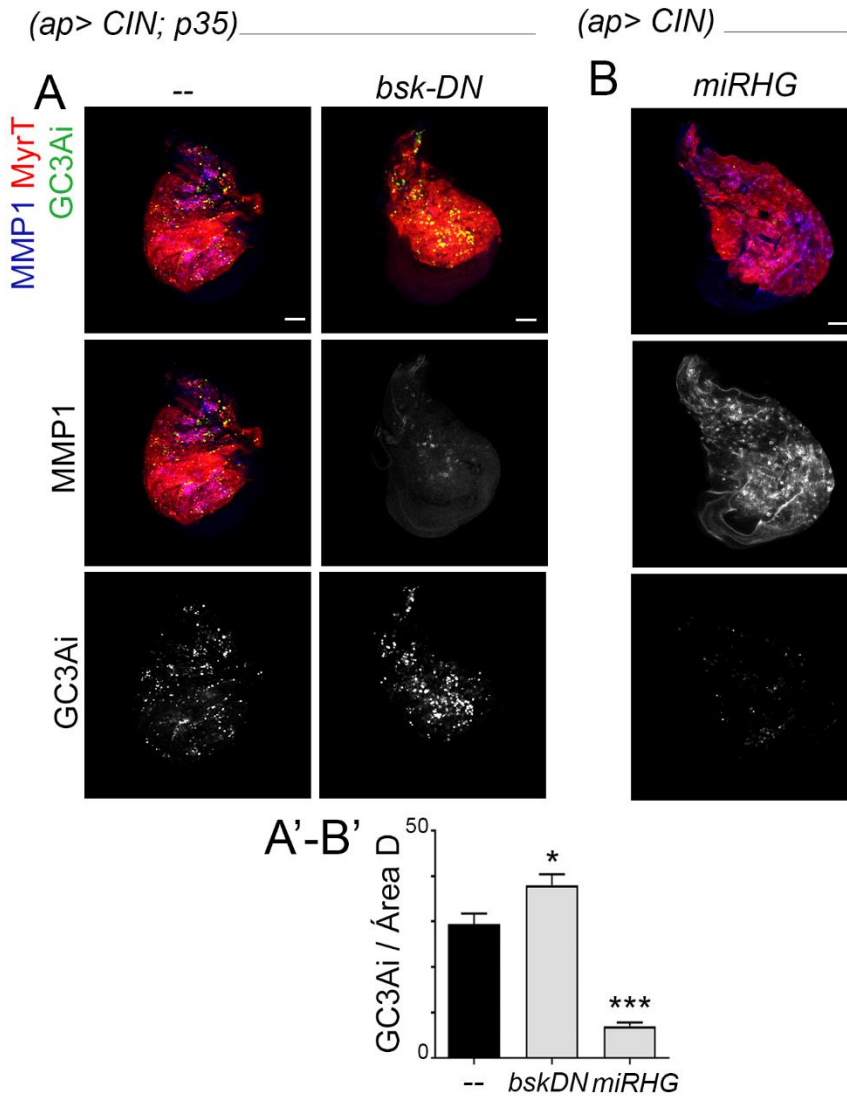
**Figura 43A-A'. Población migratoria PUC.** Porcentaje de células migratorias en tumores CIN positivas para la vía de JNK mediante el sensor *puc LacZ*. De nuevo se muestra la existencia de una segunda población que es negativa para los marcadores de esta vía de JNK.

### 3.2 Contribución de JNK a la activación de la vía de las caspasas

Los resultados obtenidos acerca de las dos poblaciones existentes en el modelo migratorio sugerían que la activación de caspasas podría ser por tanto independiente de JNK o existir una segunda vía activadora de las mismas.

El bloqueo de la vía de JNK mediante el uso de un mutante dominante negativo de *bsk* (*bsk DN*) mostró un efecto nulo rescatando la activación

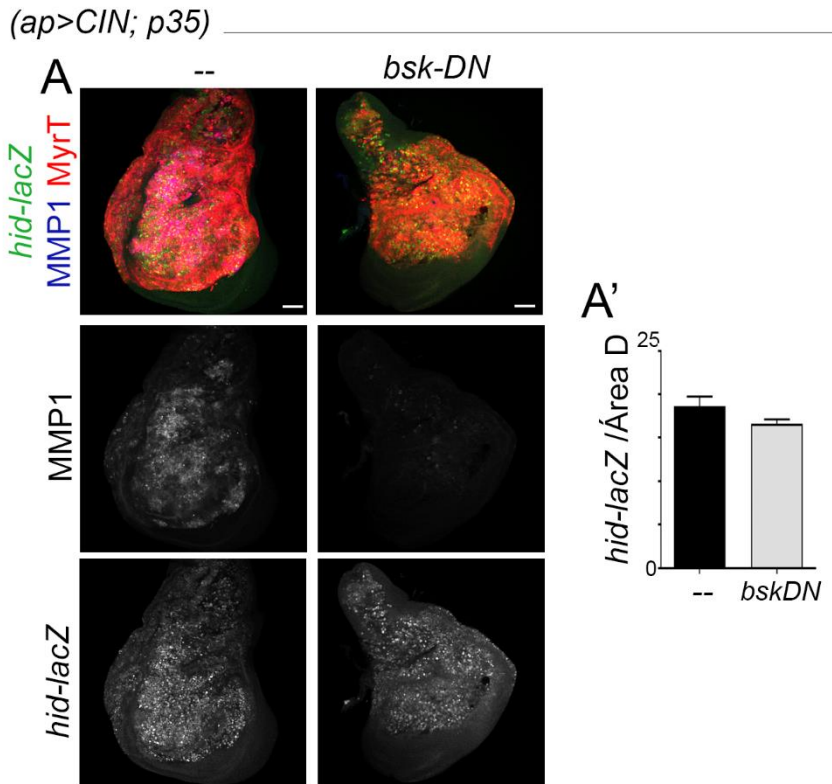
del sensor de caspasas GC3Ai (Figura 44A-A') en contraste con el bloqueo directo de la vía de las caspasas mediante el uso del *miRHG* (Figura 44B-B').



**Figura 44A-A'. Bloqueo GC3Ai por *bskDN*.** Expresión y cuantificación del sensor de caspasas GC3Ai en un tumor CIN al bloquear la vía de JNK mediante *bskDN*. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

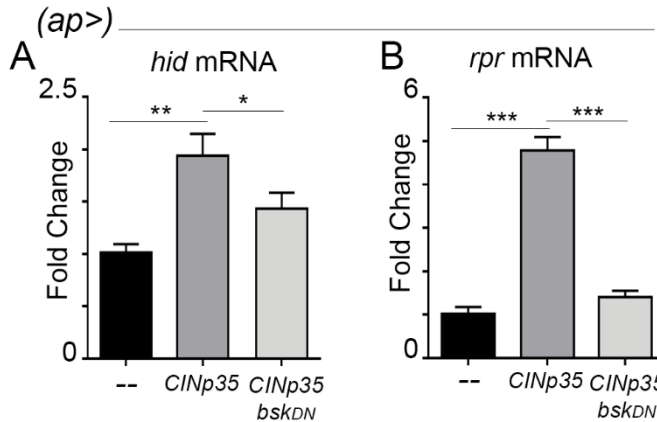
**Figura 44B-B'. Bloqueo GC3Ai por *miRHG*.** Expresión y cuantificación del sensor de caspasas GC3Ai en un tejido CIN al bloquear la vía de las caspasas mediante el *miRHG*. Las imágenes presentan una barra a escala de 50  $\mu$ m.

Por otro lado, si llegó a detectarse un leve descenso de la activación del sensor del gen proapoptótico *hid* ante el bloqueo en tumores CIN con *bskDN* (Figura 45A-A').



**Figura 45A-A'.** Bloqueo de *hid* por *bskDN*. Expresión y cuantificación del sensor *hid LacZ* en tumores CIN al bloquear la vía de JNK mediante *bskDN*.

Para clarificar la capacidad de JNK de controlar la activación de la vía apoptótica se analizó también su impacto por qPCR, observando que el bloqueo de la vía de JNK fue capaz de generar un rescate parcial de la activación de *hid* y *rpr* (Figura 46), siendo mayor su eficiencia en el rescate de *rpr*, pero presentando también rescate significativo para *hid*. Dicho dato demuestra que JNK tiene relevancia en la activación de las caspasas, pero que debe existir una segunda vía de activación.



**Figura 46A. QPCR de *hid* al bloquear JNK.** QPCR de la expresión de *hid* comparando una situación nativa, un tumor CIN y un tumor CIN con la vía de JNK bloqueada.

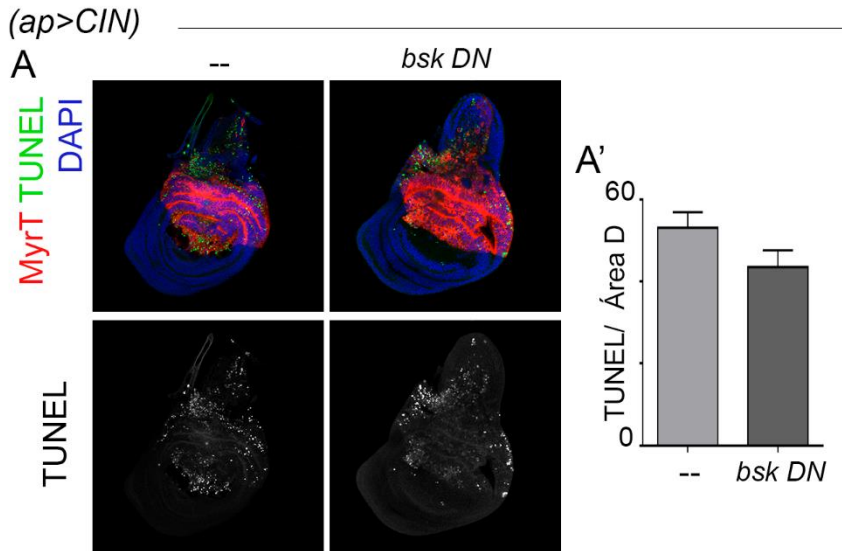
**Figura 46B. QPCR de *rpr* al bloquear JNK.** QPCR de la expresión de *rpr* comparando una situación nativa un tumor CIN y un tumor CIN con la vía de JNK bloqueada.

### 3.3 Rescate parcial de la muerte celular mediante el bloqueo de la Vía de JNK.

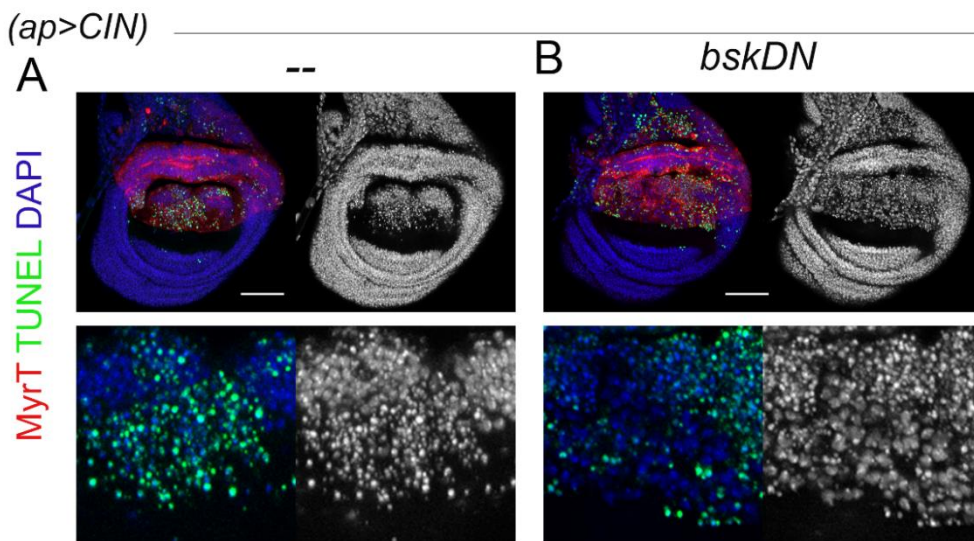
Paralelamente se estudió la capacidad de rescatar muerte ante el bloqueo de la vía de JNK. En dicho caso se observó que solo se lograba un rescate parcial de la muerte celular con TUNEL (Figura 47). Sin embargo, la observación detallada de los núcleos mostró que sí existía un rescate de la picnosis celular en la zona más inferior del *pouch* (Figura 47), donde residía una población de células cuya muerte estaba siendo rescatada, y que de forma contraria eran eliminadas en el tejido control.

Todo ello en conjunto muestra que JNK es capaz de regular la vía apoptótica, sin embargo, al inducir un rescate parcial, los datos obtenidos sugieren la presencia de una segunda vía de activación de la vía de las caspasas responsable de nuestro fenotipo.





**Figura 47. Muerte celular ante el bloqueo de JNK en tejidos CIN.** Muerte celular medida mediante TUNEL en tejidos CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) al bloquear la vía de JNK mediante *bsk DN*.



**Figura 48A-B. Rescate de la picnosis nuclear por *bskDN*.** Rescate de la muerte celular mediante el bloqueo de la vía de JNK mediante el uso de *bsk DN*, donde se puede observar un mayor número de célula no picnóticas en la parte inferior del *pouch* (B), en contraste con la situación control (A).

## CAPÍTULO 4: Dp53 y la mitocondria como activadores de la vía de las caspasas

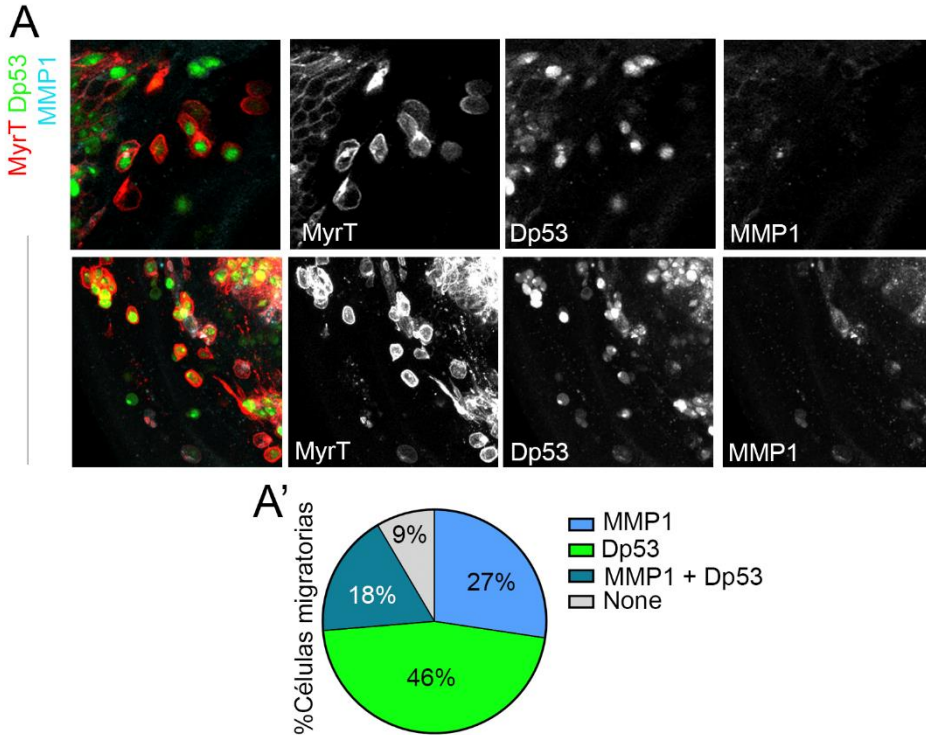
### 4.1 Papel de Dp53 en la activación de la migración inducida por caspasas

Dado que JNK no demostró ser el regulador de la migración inducida por caspasas, decidió estudiarse nuevos candidatos capaces de regular la activación de la vía apoptótica, y por tanto fueran responsables del fenotipo invasivo y la muerte celular asociados a la misma. El siguiente candidato que testar fue Dp53, un factor que, como se explicó con anterioridad presenta una ampliamente descrita relación con la activación de las caspasas en el caso de los modelos mamíferos.

De igual manera que en el capítulo anterior, lo primero fue estudiar la exclusión con la vía de JNK en la población migratoria. Utilizando un sensor de actividad de Dp53, se estudió su colocalización y el resultado obtenido mostró exclusión importante entre ambos, presentando un 46% de la población positiva únicamente para Dp53, un 27% para MMP1, un 18% positiva para ambos y un 9% de células negativas para ambos marcadores ([Figura 49A](#)).

Dichos porcentajes muestra un grado importante de exclusión en la población migrante, pero no tan definida como en el caso anterior con el sensor de caspasas (GC3Ai), dado que la población positiva en este caso para ambos marcadores pasó a ser de un 18% en vez de un 8%, como se obtuvo previamente ([Figura 42](#)).

(ap>CIN; p35)

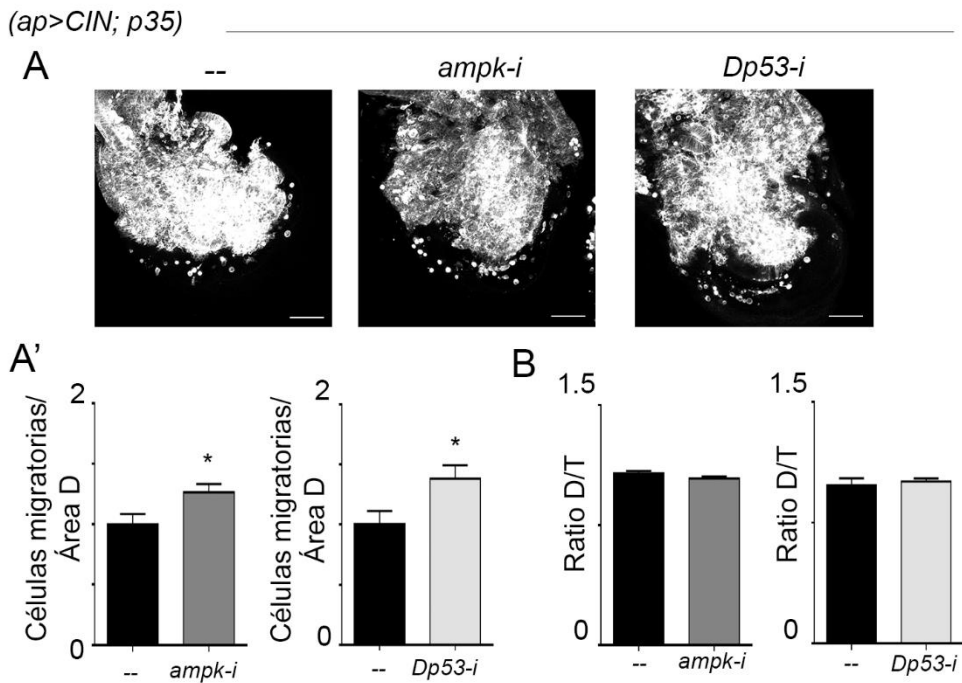


**Figura 49. Poblaciones migratorias Dp53.** Porcentaje celular de la población migratoria en tumores CIN positivas para el sensor de Dp53 (p53 GFP) y la vía de JNK (MMP1). Se obtuvo un 46% de células positivas para p53, un 27% de células positivas para JNK, un 18% positivo para ambos y un 9% negativo para los sensores.

Todo ello en conjunto sugería una menor especificidad, pero dada la exclusión obtenida se decidió estudiar el efecto sobre la migración y la muerte en nuestro sistema ante el bloqueo de Dp53.

## 4.2 El bloqueo de Dp53 indujo incremento de la invasividad y muerte

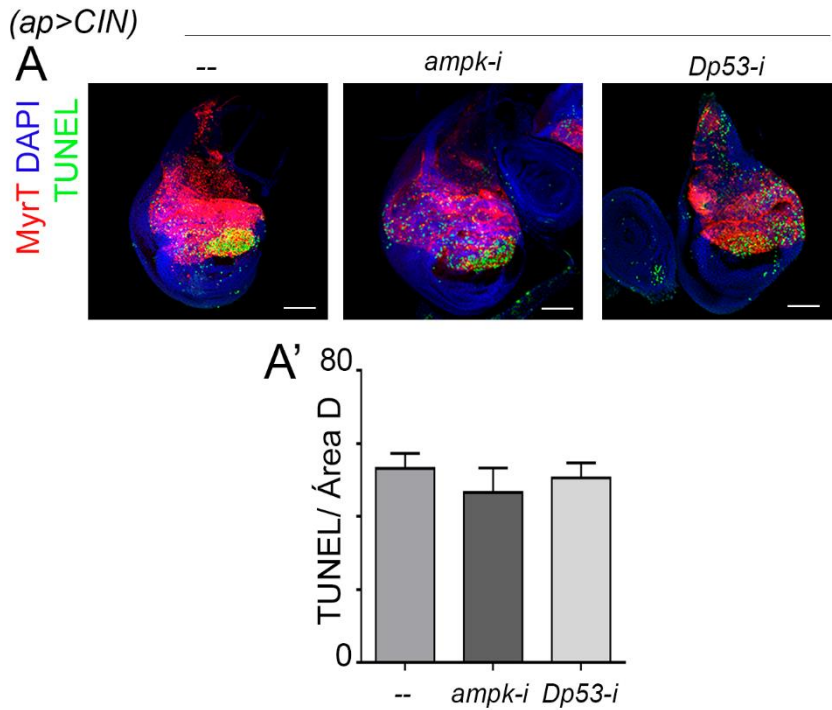
De igual manera que en los capítulos anteriores se analizó si Dp53 era necesario para el evento invasivo en los tumores CIN. Para ello, se bloqueó tanto Dp53, como su activador AMPK (Mandal, Guptan et al. 2005). Contrariamente a lo esperado, el resultado de ambos bloqueos mediante *ampk-ARNi* como *Dp53-ARNi* indujo un incremento de la invasividad celular (Figura 50 A-A'), sin afectar al tamaño tumoral como se vio por la ratio D/T respecto al control (Figura 50B).



**Figura 50A-A'. Dp53 en invasividad.** Invasividad celular al bloquear en un tumor CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) Dp53 mediante el bloqueo por *Dp53-RNAi* y *ampk-RNAi*.

**Figura 50B. Efecto en crecimiento tumoral de Dp53.** Tamaño tumoral medido mediante la ratio Dorsal/Total de los tumores.

Paralelamente, ninguno de los bloqueos fue capaz de inducir un rescate significativo de la muerte celular presente en los tejidos CIN (muerte activa) (Figura 51).



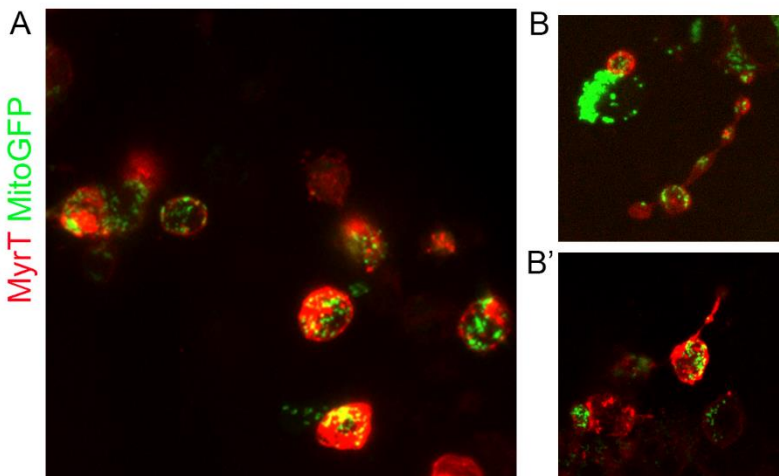
**Figura 51A-A'.** Muerte celular ante el bloqueo de Dp53 en tejidos CIN. Cuantificación de la muerte celular por TUNEL al bloquear Dp53 mediante *Dp53-RNAi* y *ampk-RNAi* en tejidos CIN (*apGAL4>MyrT*, *bub3-ARNi*).

Ambos resultados de forma conjunta sugirieron que Dp53 no es el candidato responsable detrás del evento migratorio mediado por las caspasas.

### 4.3 Las células migratorias presentan altos niveles de fragmentación mitocondrial

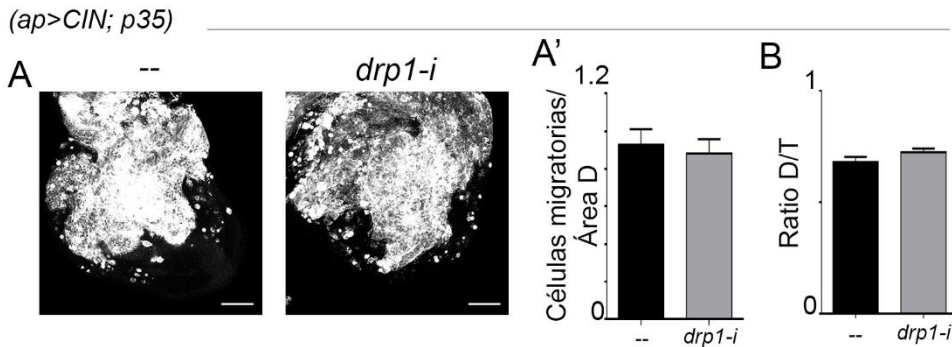
La información obtenida mostró que Dp53 no era el candidato responsable de la activación de las caspasas en nuestro sistema, pero sí que se encontraba activo en un alto porcentaje de células migratorias. Por ello, y dado que Dp53 está estrechamente relacionada con el estado energético de las células, y que las células aneuploides presentan altos niveles de estrés proteotóxico que induce fragmentación mitocondrial (Joy, Barrio et al. 2021), se decidió analizar si existía fragmentación mitocondrial en las células migratorias (Figura 47). Para ello se utilizó un marcador mitocondrial denominado MitoGFP que marcaba en verde el patrón mitocondrial. El resultado fue que la gran mayoría de las células migratorias sufrían un alto grado de fragmentación mitocondrial (Figura 52A), incluso pudieron apreciarse a lo largo de las estructuras de filopodio de algunas de las células (Figura 52B-B').

(*ap>CIN; p35, mito GFP*)



**Figura 52A-B. Fragmentación mitocondrial en células migratorias.** Células migratorias en tumores CIN con altos niveles de fragmentación mitocondrial, marcados en verde por MitoGFP.

Con el objetivo de dilucidar si la fragmentación mitocondrial era necesaria para el evento de migración, se bloqueó la proteína DRP1 responsable de inducir la fragmentación mitocondrial (Clavier, Rincheval-Arnold et al. 2016), mediante un ARNi específico (Figura 53). Los resultados obtenidos mostraron que el bloqueo de la fragmentación mitocondrial no indujo una disminución significativa de la invasividad celular (Figura 53A-A'). Dicho bloqueo tampoco tuvo efectos a nivel del tamaño tumoral (Figura 53B). Todo ello sugiere que la fragmentación mitocondrial es una consecuencia de la aneuploidía y la activación de la vía de las caspasas, y no a la inversa.



**Figura 53A-A'. DRP1 en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN al bloquear la fragmentación mitocondrial mediante *drp1-RNAi*.

**Figura 53B. Efecto en crecimiento tumoral de DRP1.** Tamaño tumoral medido mediante la ratio Dorsal/ Total de los tumores CIN al bloquear con *drp1-RNAi*.

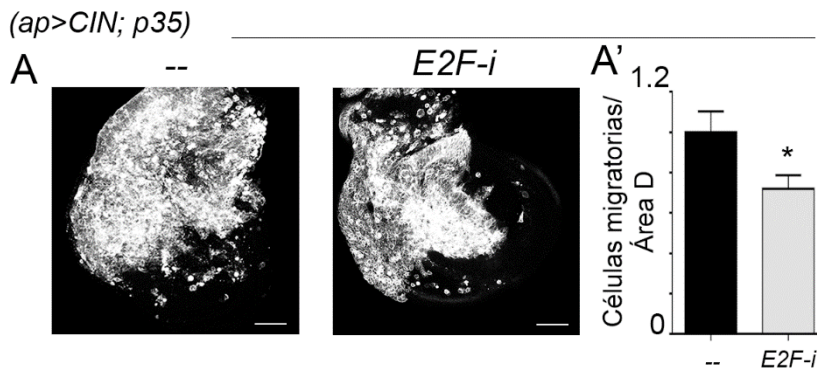
#### 4.4 Contribución del ciclo celular al fenotipo invasivo

En vista de los resultados obtenidos con Dp53, se descartó su papel como activador de fenómeno invasivo dependiente de caspasas. Sin embargo, el incremento de la invasividad ante el bloqueo con *Dp53-ARNi* y *ampk-ARNi* sugirió que podía estar interaccionando indirectamente con



el evento de migración. Como se describió en la introducción, p53 está implicada en numerosos procesos además de la muerte celular, pero destaca su papel como elemento regulador de ciclo celular, capaz de inducir su arresto celular entre las fases G1 y S mediante la regulación de la ciclina E, crucial para la progresión en el ciclo (Marchesi and Bagella 2013).

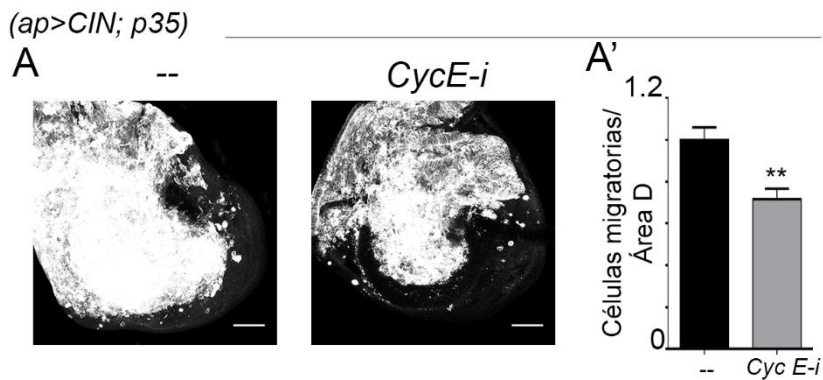
Con el objetivo de ver el efecto sobre el ciclo celular contribuía a la invasividad, se estudió de qué manera afectaba el bloqueo mediante ARNi de E2F (Figura 54A), proteína que actúa como regulador transcripcional clave para la transición a la fase S (Marchesi and Bagella 2013). El resultado de dicho bloqueo generó una disminución de la invasividad celular (Figura 54A'), sugiriendo por tanto que el arresto en las fases G1 y S es desfavorable para la migración celular.



**Figura 54A-A'. E2F en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN al bloquear el ciclo celular mediante *E2F-RNAi*.

Además, siguiendo la misma línea argumental, también se estudió el arresto en dicha fase mediante el bloqueo directo de la ciclina E por un ARN-i específico. De nuevo, el resultado fue una importante disminución de la invasividad celular en los tumores CIN (Figura 55).





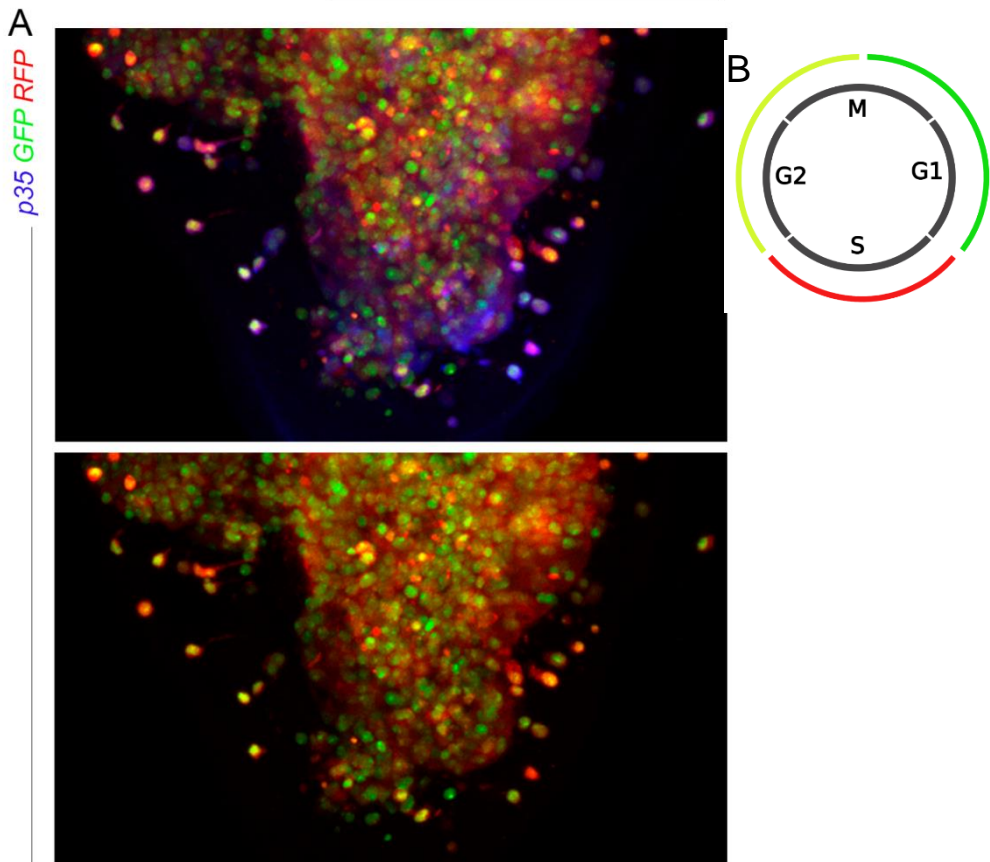
**Figura 55A-A'. Cyc E en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) al bloquear el ciclo celular mediante *CycE RNA-i*.

Los datos obtenidos con *E2F-ARNi* y *CycE-ARNi*, sugirieron que el arresto en fases G1-S parece actuar en detrimento de la invasividad celular. Con el objetivo de corroborar si las células migratorias no estaban mayoritariamente arrestadas en las fases iniciales del ciclo (G1 y S), o si existía también la presencia de dos poblaciones, se decidió estudiar el arresto celular en la población migratoria.

Para ello, se utilizó la línea Fly-FUCCI (*fly fluorescence ubiquitin cell cycle indicator*) donde la fase del ciclo celular en que se encontraban las células migratorias queda marcada mediante un código de colores regido por la presencia de dos fluoróforos. El sistema Fly-FUCCI está basado en dos reporteros, E2F-GFP y CycB-RFP, que son degradados ante las ligasas APC/C y CRL4-Cdt2, haciendo que el momento del ciclo celular quede indicado por la conjugación de dichos fluoróforos (Zielke, Korzelius et al. 2014)(Gerlach, Sander et al. 2019) (Figura 56B). En este caso el promotor *ap>* carece de la proteína MyrT, y el seguimiento de las células migratorias fue por inmunohistoquímica mediante anticuerpo anti-p35. El resultado obtenido mostró que la mayoría de las células migratorias eran positivas para ambos marcadores, lo cual implicó que estaban arrestadas en fase G2 del ciclo celular (Figura 56A). No se detectó la presencia de

dos poblaciones en este caso, dato que indicaría que es un rasgo común tanto de la vía de JNK como de la vía dependiente de caspasas. Todo ello conjuntamente concuerda con los datos obtenidos en nuestro laboratorio acerca de que las células aneuploides quedan arrestadas en G2 (Joy, Barrio et al. 2021), lo que sugiere que el arresto en dicha fase contribuye al fenómeno invasivo.

(*ap> CIN; p35, Fly FUCCI*)



**Figura 56. Arresto en G2 de las células migratorias.** Población migratoria en tumores CIN marcada según el arresto celular mediante la técnica de Fly-FUCCI. Mayoritariamente se detectó tanto el fluoróforo rojo como el verde, indicando por tanto el arresto en fase G2.

**Figura 56B. Sistema Fly-FUCCI.** Código de colores del sistema Fly-FUCCI utilizado, donde se marcan en verde la fase G1 marcada con E2F-GFP, la fase S se marca con CycB-RFP, y la fase G2 se marca al colocalizar ambos sensores.

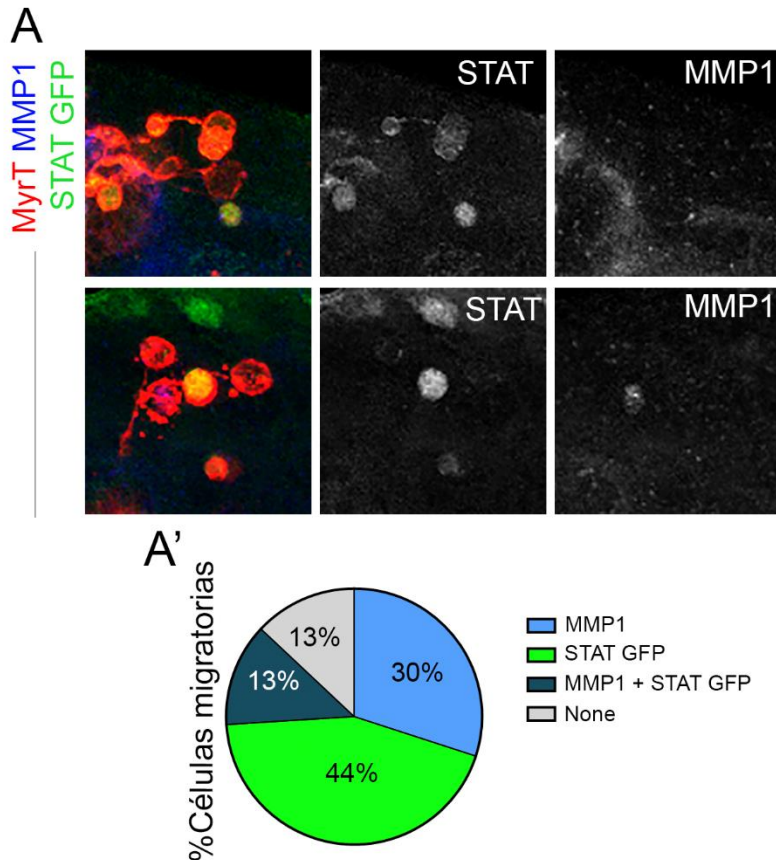
## CAPÍTULO 5: JAK/STAT como candidato de activación del fenotipo invasivo inducido por caspasas

### 5.1 JAK/STAT está activo en la segunda población migratoria

Dado que Dp53 demostró no ser el elemento responsable de la activación de la vía de las caspasas, el siguiente candidato fue la vía de JAK/STAT, la cual, como se ha indicado en la introducción, ha sido descrita también como activadora de la vía de las caspasas a través de *hid* (Borensztein, Boissoneau et al. 2013) (Maurya, Surabhi et al. 2021). Además, de acuerdo con una de las últimas publicaciones, la vía de JAK/STAT se ve incrementada a lo largo de la vida del tumor dada la contribución sistémica de las citoquinas proinflamatorias generadas en otros tejidos que inducen la retroalimentación positiva para dicho proceso inflamatorio (Romão, Muzzopappa et al. 2021). Por estas razones, este fue el siguiente candidato de estudio.

En primer lugar, se testó su expresión en la población migrante mediante el reportero STAT-GFP. Dicho experimento corroboró una alta exclusión de dicha vía con la de JNK, al carecer de colocalización entre el marcador de JNK (MMP1) y el reportero STAT-GFP, obteniendo que un 44% de células migratorias fueron positivas para STAT-GFP, un 30% positivo para JNK, un 13% positivas para ambos y un 13% negativa para cualquier marcador (Figura 57). Dada la alta exclusión de ambas vías se consideró como posible candidato de la activación de la vía de las caspasas.

(ap > CIN; p35)



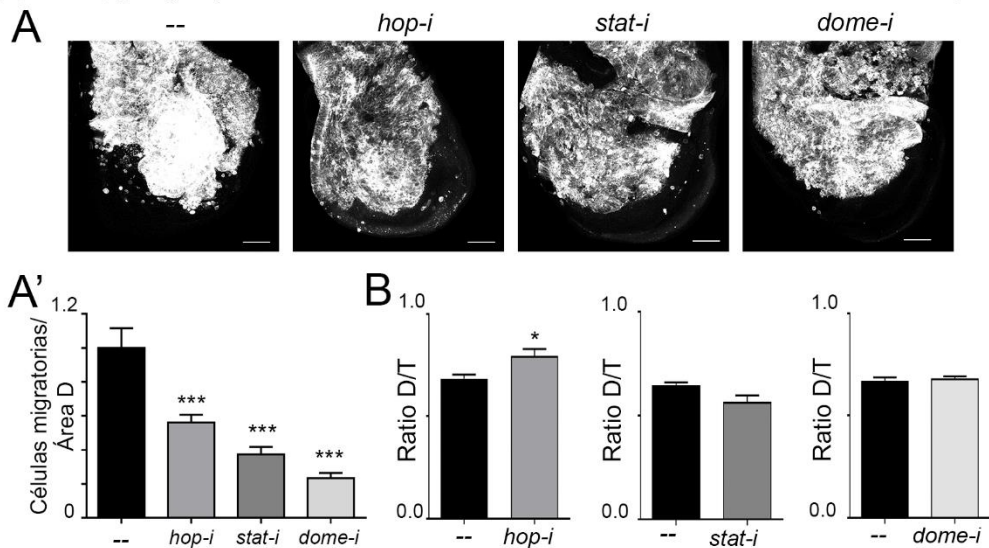
**Figura 57. Poblaciones migratorias STAT GFP.** Porcentaje de células migratorias en tumores CIN positivas para el reportero STAT GFP de la vía JAK/STAT o para MMP1 como reportero de la vía de JNK. Se obtuvo un 44% de células positivas para JAK/STAT, un 30% positivo para JNK, un 13% positivas para ambos y un 13% negativa para cualquier marcador.

## 5.2 Rescate del fenotipo invasivo y la muerte celular mediante el bloqueo de la vía de JAK/STAT

De igual forma que en los casos anteriores, se estudió si el bloqueo de la vía de JAK/STAT era capaz de rescatar tanto la muerte celular como la invasividad.

En términos de migración, el resultado obtenido del bloqueo a distintos niveles de la vía (*stat-ARNi*, *hop-ARNi*, *dome-ARNi*) generó un rescate muy significativo de la invasividad de las células tumorales (Figura 58A-A'). Respecto al tamaño tumoral, no se vio alterado más que en presencia del *hop-i* como mostró el análisis de la ratio D/T (Figura 58B).

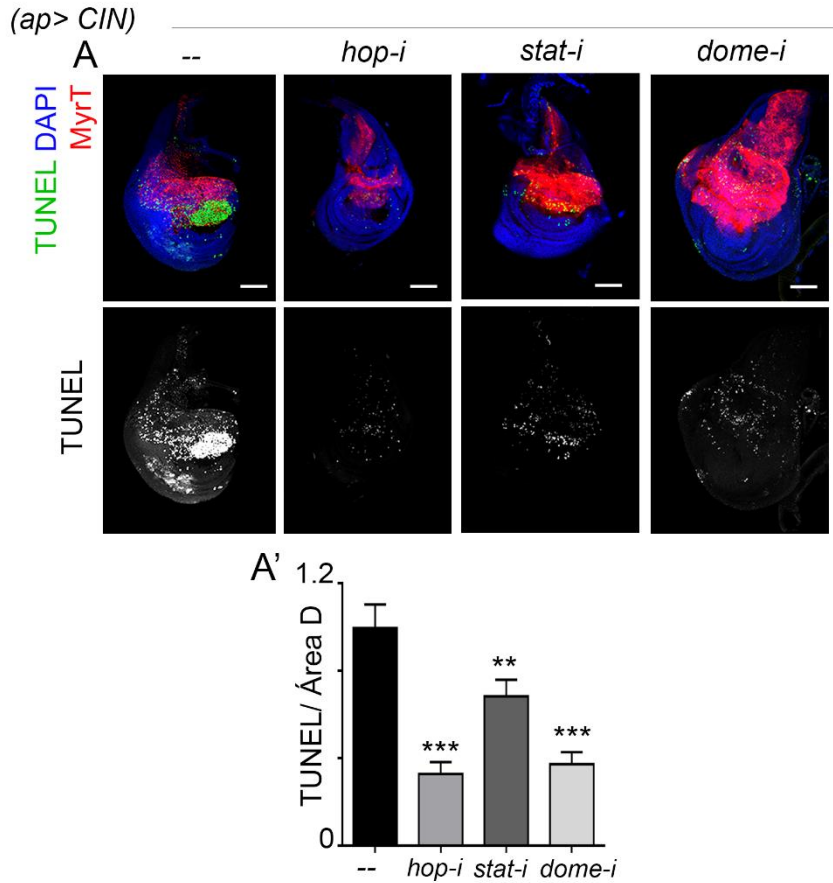
(*ap>CIN; p35*)



**Figura 58A-A'. JAK/STAT en migración.** Cuantificación de la invasividad celular al bloquear la vía de JAK/STAT en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) mediante *hop-i*, *stat-i* y *dome-i*.

**Figura 58B. Efecto en crecimiento tumoral de JAK/STAT.** Medición del tamaño tumoral mediante la ratio D/T del disco de ala.

Respecto a la capacidad de bloquear muerte, su cuantificación mediante TUNEL frente a los bloqueos de *hop-ARNi*, *stat-ARNi* y *dome-ARNi* en tejidos CIN (muerte activa) mostró una importante reducción de la muerte celular en todos los casos (Figura 59).



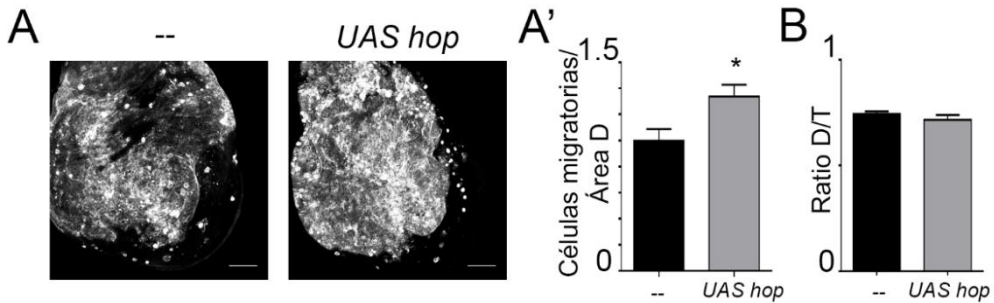
**Figura 59. Muerte celular ante el bloqueo de JAK/STAT.** Cuantificación por TUNEL del rescate de muerte celular inducido in tejidos CIN (*apGAL4>MyrT*, *bub3-ARNi*) al bloquear la vía de JAK/STAT mediante *hop-RNAi*, *stat-RNAi* y *domeRNA-i*.

### 5.3 JAK/STAT actúa como activador de la vía de las caspasas

De acuerdo con los datos obtenidos se asumió que JAK/STAT podía estar actuando como activador de la vía de las caspasas al rescatar tanto muerte como invasividad celular. Para corroborar su implicación directa se desarrollaron distintos experimentos para demostrar su relación en la activación de la vía apoptótica.

En primer lugar, la sobreexpresión de la vía de JAK/STAT mediante el uso de *UAS hop* fue capaz de incrementar la invasividad celular (Figura 60A), sin afectar al Ratio D/T de los tumores CIN (Figura 60B), de igual forma que se obtuvo al sobreexpresar directamente la vía de las caspasas.

(*ap>CIN;p35*)



**Figura 60A. Sobreexpresión de HOP en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) al sobreexpresar la vía de JAK/STAT mediante un *UAS hop* en tumores CIN.

**Figura 60B. Efecto en crecimiento tumoral de sobreexpresar HOP.** Tamaño tumoral calculado mediante el Ratio Dorsal/Total.

Acto seguido, se analizó si la vía de JAK/STAT era suficiente por si sola para inducir muerte celular, resultado que se corroboró mediante el análisis por TUNEL de la sobreexpresión de *UAS hop*, la cual mostró una importante inducción de muerte celular en tejidos nativos (Figura 61).

Dado que los datos obtenidos señalaron tanto por exclusión con JNK como por la capacidad de rescatar la migración y la muerte, JAK/STAT se aceptó como el candidato capaz de controlar la activación de las caspasas. Dicha hipótesis se demostró dado que el bloqueo de la vía de JAK/STAT fue capaz de inducir un rescate eficiente de la expresión de *hid* en los tumores CIN (Figura 62), así como de la activación de los sensores de *hid LacZ* (Figura 63) y de caspasas (Figura 64).



(*ap>*; *UAS hop*) \_\_\_\_\_

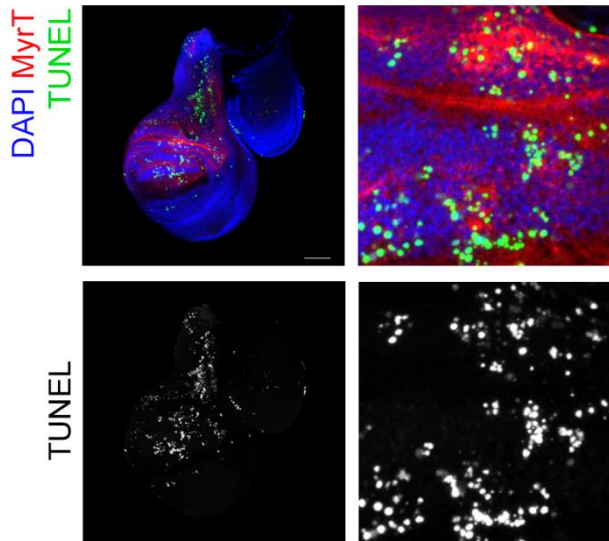


Figura 61. **HOP inductor de muerte.** Muerte celular detectada mediante TUNEL inducida al sobre expresar la vía de JAK/STAT en el disco de ala de un tejido nativo (*apGAL4>MyrT*).

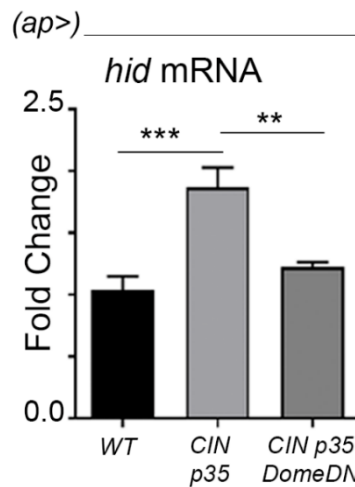
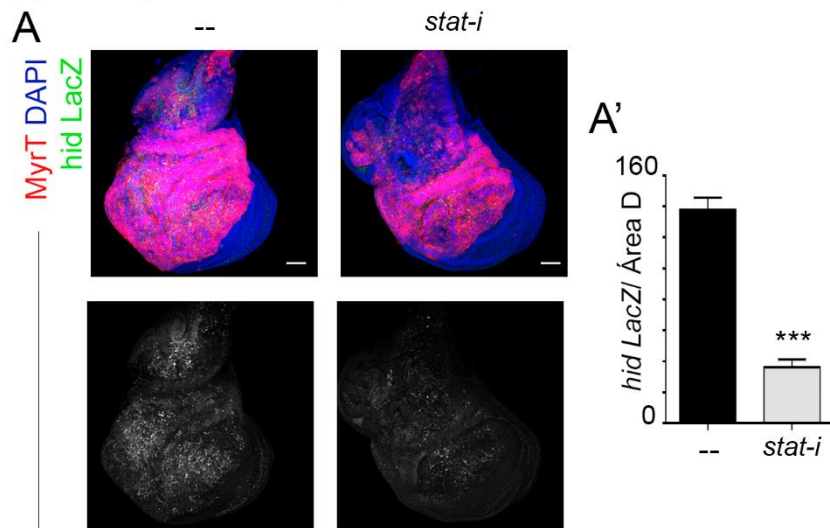


Figura 62. **QPCR al bloquear JAK/STAT.** QPCR de *hid* comparando una situación nativa, un tumor CIN o un tumor CIN con la vía de JNK bloqueada mediante un mutante *dome DN* (Dominante Negativo).

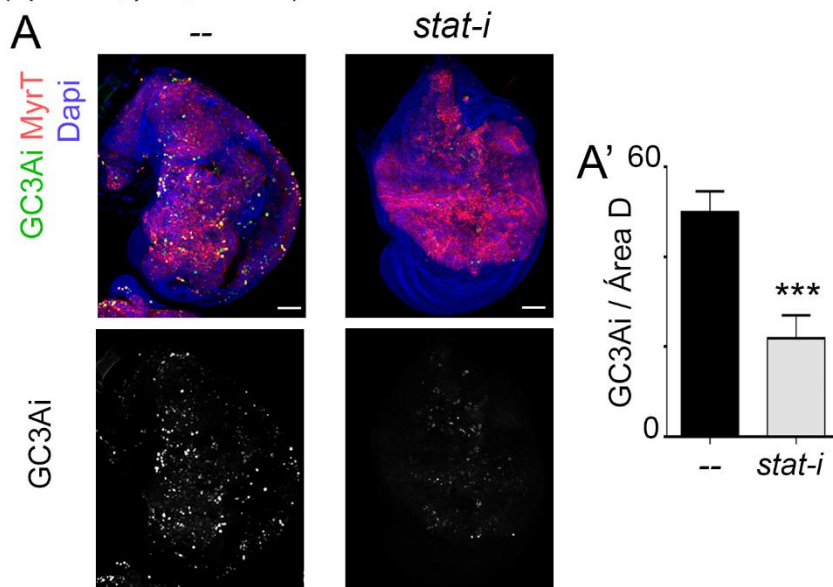


(*ap>CIN; p35, hid LacZ*)



**Figura 63A-A'.** Reducción de *hid* al bloquear JAK/STAT. Rescate de la activación del sensor de *hid LacZ* en tumores CIN al bloquear con *stat-RNAi* la vía de JAK/STAT.

(*ap>CIN; p35, GC3Ai*)

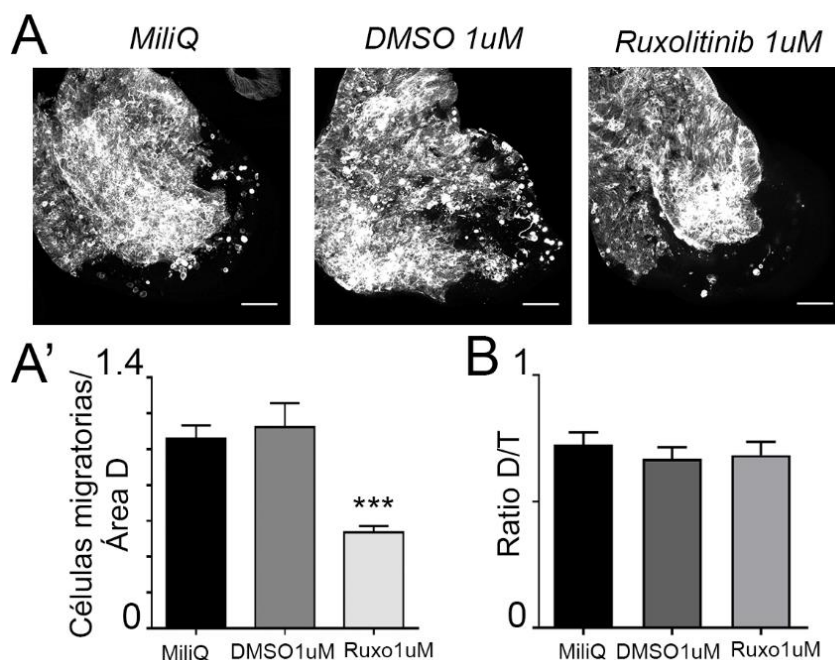


**Figura 64A-A'.** Reducción de GC3Ai al bloquear JAK/STAT. Rescate de la activación del sensor de caspasas GC3Ai en tumores CIN al bloquear con *stat-RNAi* la vía de JAK/STAT.

A la vista de dichos resultados se aceptó que la vía de JAK/STAT es clave para la activación de las caspasas, así como para del fenómeno invasivo inducido por las mismas.

#### 5.4 Reducción de capacidad invasiva del tumor mediante el tratamiento con Ruxolitinib

De acuerdo con los resultados obtenidos en que la vía de JAK/STAT es capaz de promover la migración de las células en tumores CIN, se decidió realizar un tratamiento mediante Ruxolitinib, un medicamento utilizado en el tratamiento quimioterápico en humanos, que actúa como bloqueador a ( $ap > CIN; p35$ )

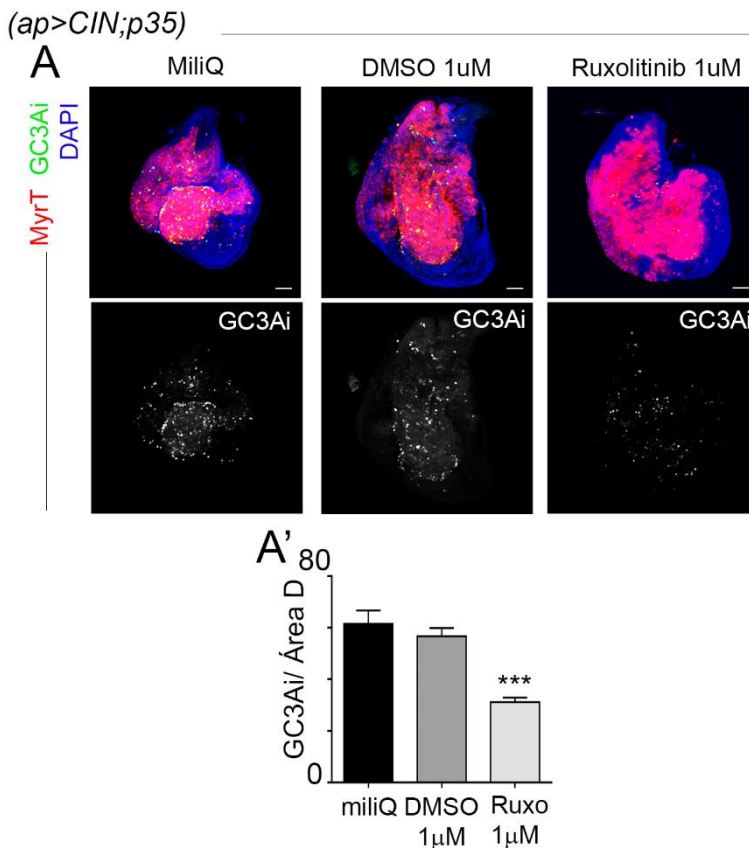


**Figura 65A. Tratamiento con Ruxolitinib en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN ante el tratamiento con Ruxolitinib. En la figura se muestra tanto la activación del sensor en el tejido control con agua MiliQ, el tejido control con DMSO y el tejido tratado con Ruxolitinib

**Figura 65B. Efecto en crecimiento tumoral del tratamiento con Ruxolitinib.** Tamaño tumoral calculado por el Ratio Dorsal/Total

nivel de las proteínas JAK, y en nuestro caso a nivel de HOP. (Sharma and Larkin 2019). De acuerdo con lo esperado, el resultado de dicha administración generó una reducción significativa del fenotipo invasivo (Figura 65A), sin afectar al tamaño tumoral (Figura 65B).

También se testó el efecto de dicha administración directamente en la activación de las caspasas mediante el sensor GC3Ai, obteniendo una fuerte disminución de su activación en los tumores CIN (Figura 66), y corroborando de nuevo que la vía de JAK/STAT es la responsable de la migración inducida por caspasas.



**Figura 66. Reducción de GC3Ai ante el tratamiento con Ruxolitinib.** Reducción en los niveles de activación del sensor de caspasas GC3Ai mediante el tratamiento con Ruxolitinib en tejidos CIN. En la figura se muestra tanto la activación del sensor en el tejido control con agua MiliQ, el tejido control con DMSO y el tejido tratado con Ruxolitinib.

Los datos obtenidos durante este apartado concluyen que la vía de JAK/STAT es capaz de inducir la activación de las caspasas en los tumores CIN, contribuyendo con ello al fenotipo invasivo que los caracteriza.

## CAPÍTULO 6: La migración inducida por JAK/STAT depende de ligandos proinflamatorios

### 6.1 La citoquina Upd3 activa el fenotipo invasivo de JAK/STAT

Como se explicó en la introducción, la vía de JAK/STAT se activa mediante la unión de interleucinas proinflamatorias llamadas UPDs, al receptor de membrana, DOME.

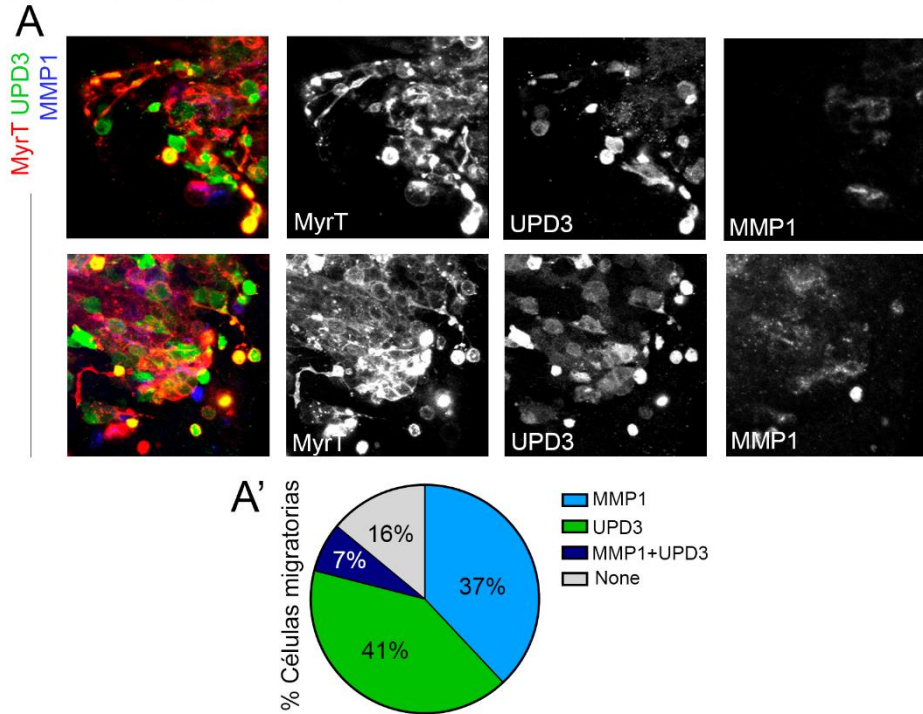
Por esta razón el siguiente objetivo fue corroborar que la activación de dicha vía es dependiente de ligando, así como estudiar si la vía concreta de las caspasas en los modelos tumorales CIN presenta especificidad por alguna de las interleucinas.

De las tres interleucinas existentes, UPD1, UPD2 y UPD3, solamente se testaron en este estudio la 1 y 3 por ser las que habían presentado fenotipo en nuestro laboratorio como se demostró en el artículo Ferreira et al. 2020.

Siguiendo el mismo esquema que en apartados anteriores, en primer lugar, se estudió la colocalización en la población migratoria de la citoquina proinflamatoria UPD3 mediante el uso del reportero transcripcional *upd3-LacZ*. El resultado obtenido mostró una alta exclusión con la vía de JNK (Figura 67A-A'), obteniendo un 41% de células positivas para UPD3, un 37% positivo para JNK, un 7% positivas para ambos y un 16% negativa para cualquier marcador.

Es importante destacar que dichos porcentajes fueron muy similares a los obtenidos en las poblaciones del sensor de caspasas (Figura 42A) sugiriendo la implicación de UPD3 en el modelo migratorio inducido por caspasas.

(*ap>CIN; p35, upd3 Lac Z*)

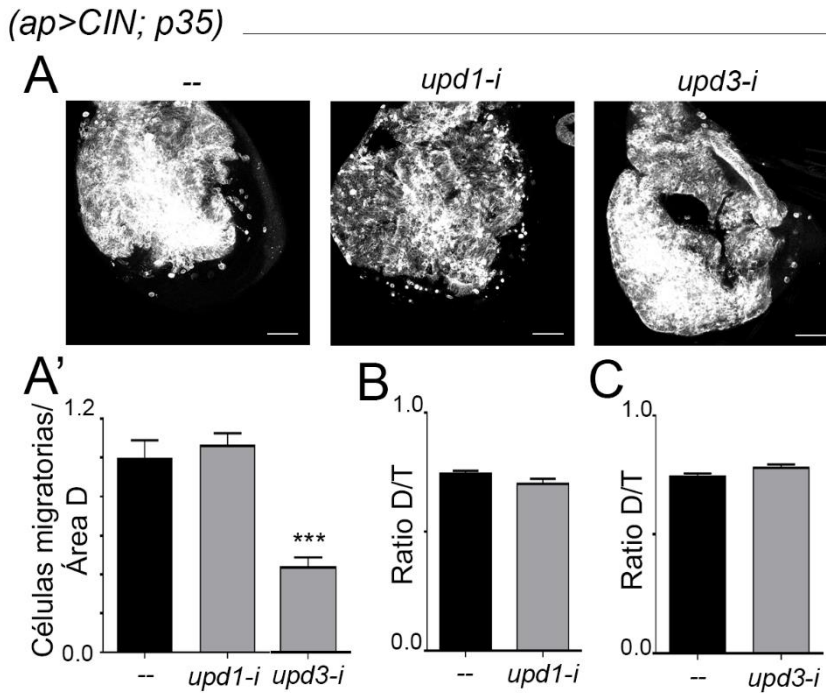


**Figura 67A-A'.** Población migratoria UPD3. Porcentaje de células migratorias positivas para el reportero transcripcional *upd3-LacZ* o de MMP1 como reportero de la vía de JNK en tumores CIN. Se obtuvo un 41% de células positivas para UPD3, un 37% positivo para JNK, un 7% positivas para ambos y un 16% negativa para cualquier marcador.

## 6.2 El bloqueo de Upd3 rescata la invasividad y la muerte celular

De igual manera que en los apartados anteriores se analizó la contribución a la migración celular mediante ARNis específicos tanto para UPD1 como UPD3. El resultado obtenido mostró que solo *upd3-ARNi*, y no *upd1-ARNi*, fue capaz de rescatar la invasividad de las células (Figura 68A). En ninguno de los casos dichas depleciones generaron

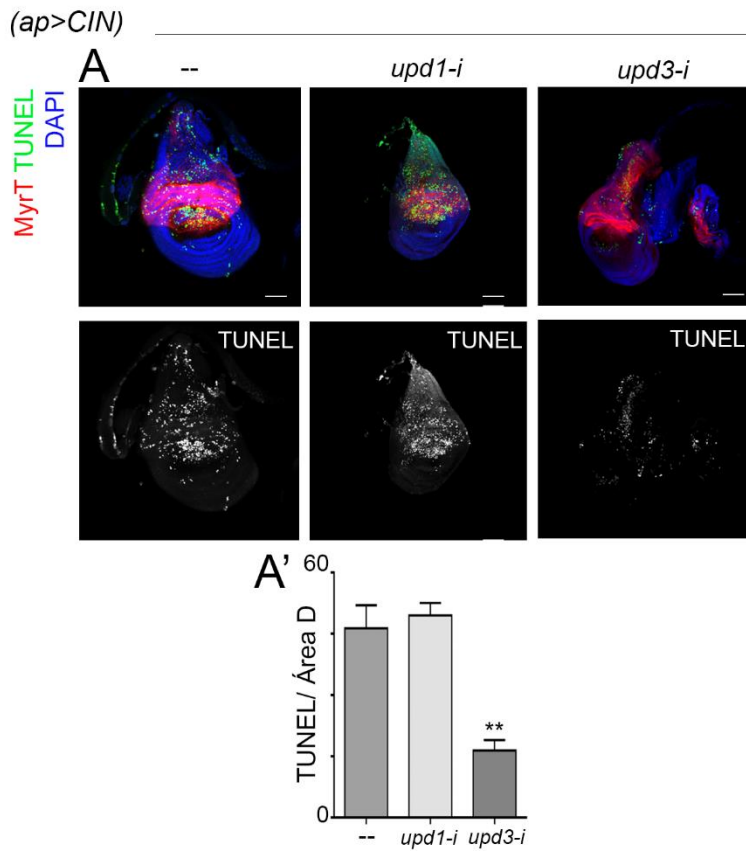
alteraciones del Ratio D/T de igual manera que en los casos anteriores (Figura 68B-C).



**Figura 68A. UPDs en invasividad.** Cuantificación de la invasividad celular en tumores CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi; p35*) al bloquear la vía de JAK/STAT por medio de ARNis específicos para las interleucinas proinflamatorias *upd1* y *upd3*, respectivamente.

**Figura 68B-C. Efecto en crecimiento tumoral de los UPDs.** Tamaño tumoral calculado mediante el Ratio Dorsal/Total.

Respecto a su capacidad de rescatar muerte también se logró un rescate significativo por la depleción de UPD3, de manera contraria a los resultados que se obtuvieron en el caso de UPD1 (Figura 69).



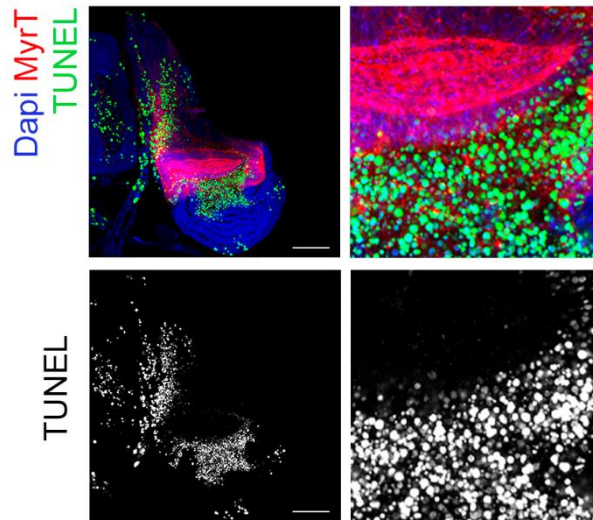
**Figura 69. Muerte celular ante el bloqueo de los UPD.** Cuantificación por TUNEL del rescate de muerte en tejidos CIN (*apGAL4>MyrT, bub3-ARNi*) producido por el bloqueo de las interleucinas proinflamatorias UPD1 y UPD3 respectivamente mediante *upd1-ARNi* y *upd3-ARNi*.

### 6.3 La sobreexpresión de UPD3 induce altos niveles de muerte celular

A pesar de que el modelo genético utilizado no permitía testar que la sobreexpresión de UPD3 indujera un aumento de la invasividad, se analizó el efecto de la sobreexpresión del mismo en un tejido nativo (Figura 70), lo cual generó altas cantidades de muerte celular, mostrando así que UPD3 era suficiente para inducir altos niveles de muerte celular.



(*ap>myrT;UAS Upd3*)



**Figura 70. UPD3 inductor de muerte.** Sobreexpresión de UPD3 en un tejido nativo (*apGAL4>MyrT*) induciendo grandes cantidades de muerte.

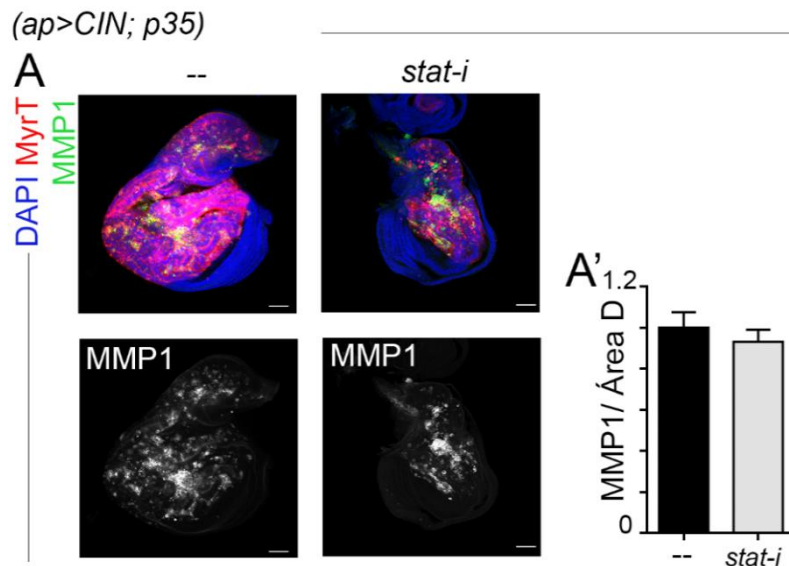
Todo ello en conjunto indicó que la vía de caspasas y su efecto como inductora de invasividad en los tumores CIN era regulado por la vía de JAK/STAT y cuya fuente de activación era específicamente la citoquina proinflamatoria UPD 3.

## CAPÍTULO 7: Relación entre JNK y JAK/STAT, exclusión y expresión en el tiempo

### 7.1 Las vías de JNK y JAK/STAT no presentan un bloqueo mutuo

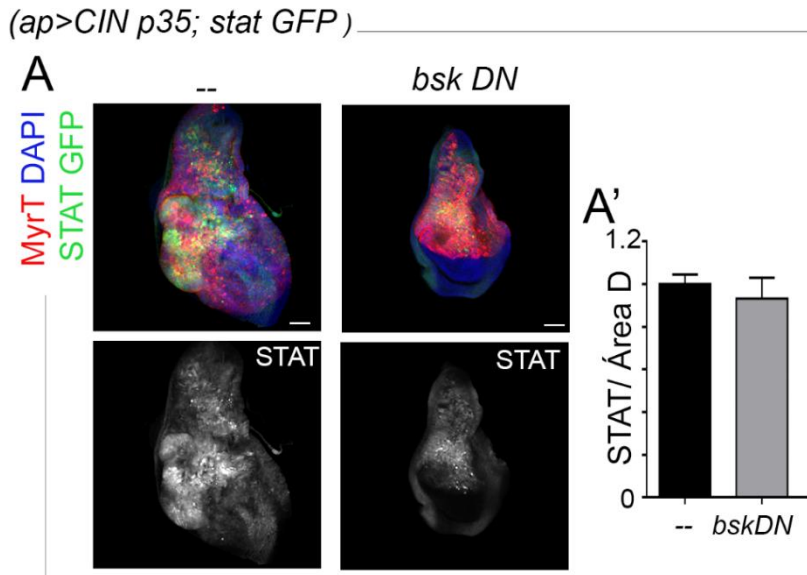
En vista de los resultados obtenidos durante los capítulos anteriores, cabe preguntarse de qué manera interaccionan las vías de JNK y JAK/STAT y si existe un bloqueo entre ambas dos por el que se genera una exclusión tan alta. Por ello el objetivo de este último apartado consistió en estudiar la relación existente entre ellas y si la exclusión podía deberse a que una población induzca el bloqueo de la otra.

En el caso de la vía de JNK (Figura 71A), el bloqueo de la vía de JAK/STAT mediante *stat-ARNi* no indujo variaciones significativas en los niveles de MMP1 (Figura 71A').



**Figura 71A-A'. Actividad de JNK al bloquear JAK/STAT.** Cuantificación de los niveles de STAT en tumores CIN al bloquear la vía de JAK/STAT mediante *stat-ARNi*.

Por otro lado, la vía de JAK/STAT tampoco presentó alteraciones ante el bloqueo mediante *bsk DN* de la vía de JNK (Figura 72A-A').



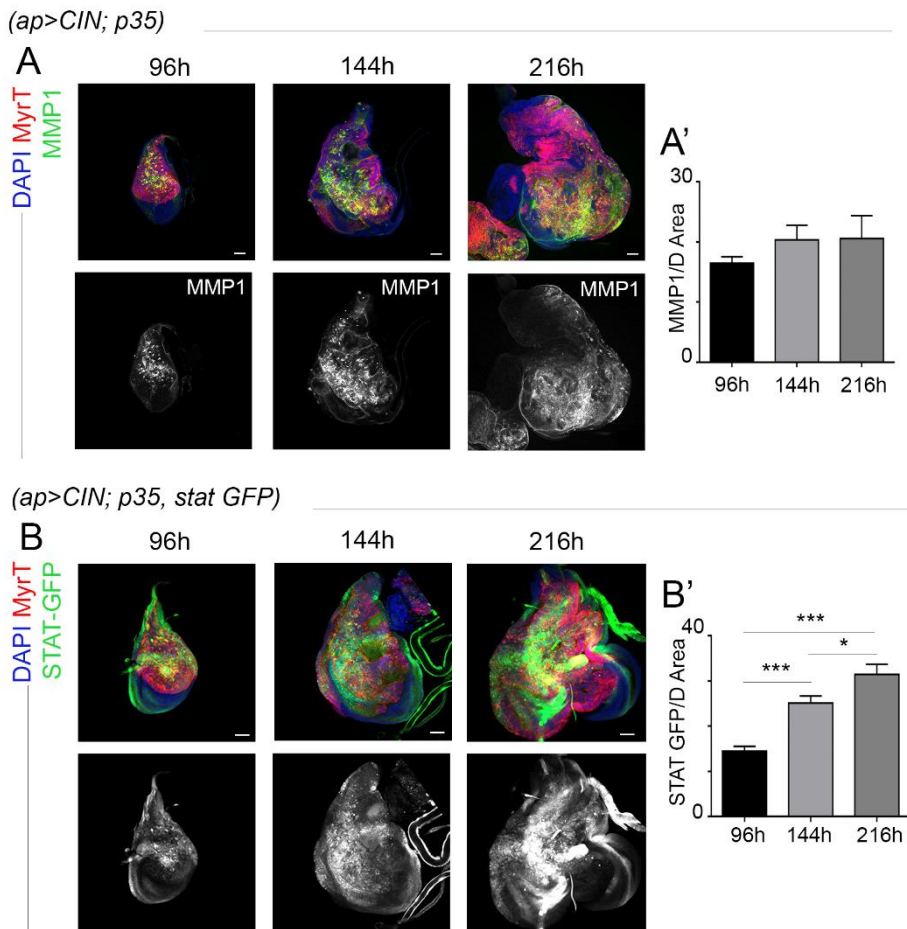
**Figura 72A-A'.** Actividad de JAK/STAT al bloquear JNK. Cuantificación de los niveles de STAT GFP en tumores CIN al bloquear la vía de JNK mediante *bsk DN*.

Los datos obtenidos sugieren que no existe una interacción excluyente entre ambas ya que el bloqueo de una vía no generó en ninguno de los casos la sobreexpresión de la otra.

## 7.2 Las vías de JNK y JAK/STAT evolucionan de diferente manera durante la vida del tumor.

Como se vio en resultados anteriores (Figura 25), la expresión de los genes proapoptóticos no es igual en fases iniciales o fases más avanzadas del tumor. Por esta razón se quiso estudiar también de qué forma evolucionaban las dos poblaciones a lo largo del tiempo, y si existía una transición temporal también entre las vías de JNK y JAK/STAT en

vista de que no parecían presentar exclusión mutua. Con este fin se testó la evolución de ambas vías (Figura 73) en tres tiempos para mostrar su evolución desde estadios tempranos a tardíos de los tumores CIN. El resultado obtenido mostró que la vía de JNK sufría un leve incremento a lo largo del tiempo sin llegar a ser significativo (Figura 73A-A'), mientras que la vía de JAK/STAT sufrió un fuerte incrementando a lo largo del tiempo (Figura 73B-B').



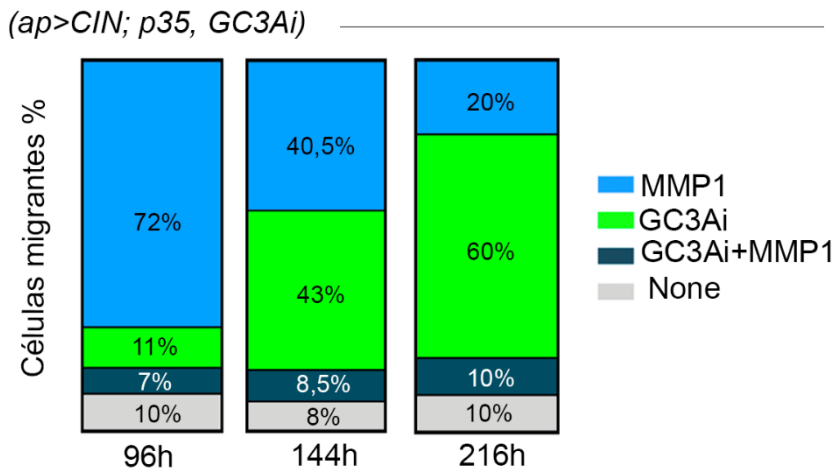
**Figura 73A-A'.** Nivel de activación de JNK durante el tiempo. Cuantificación de la activación de la vía de JNK mediante MMP1 en tumores CIN a las 96 horas, 144 horas y 216 horas desde la puesta.

**Figura 73B-B'.** Nivel de activación de JAK/STAT durante el tiempo. Cuantificación de la activación de la vía de JAK STAT en tumores CIN a las 96 horas, 144 horas y 216 horas desde la puesta.

### 7.3 Las poblaciones celulares sufren una transición temporal durante el desarrollo tumoral.

En consecuencia, a los datos que se acaban de presentar, y dado que cada una de las vías se ha demostrado que corresponde a una de las dos poblaciones mayoritarias que adquieren la capacidad invasiva, la siguiente pregunta fue que de qué forma oscilaban dichas poblaciones a lo largo del tiempo.

Para ello se analizaron las poblaciones a las 96, 144 y 216 horas de la puesta (Figura 74). El resultado fue una transición temporal donde la vía de JNK era mayoritaria en la población migratoria inicialmente, constituyendo el 72% del total de células migratorias, frente a tan solo un 11% de la población positiva para caspasas. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, la población mayoritaria pasa a ser la población de caspasas que supone el 60% de las células migratorias totales a las 216 horas, contrastando con tan solo un 20% de las positivas para la vía de JNK.



**Figura 74. Evolución temporal de las poblaciones celulares.** Evolución de las poblaciones celulares a lo largo del tiempo en tumores CIN del disco de ala a 96, 144 y 216 horas.



## **DISCUSIÓN**





## 1. Funciones de los genes proapoptóticos en migración

Como se ha explicado a lo largo de este proyecto, la vía apoptótica se inicia por la activación de los genes proapoptóticos. Durante este trabajo se analizó concretamente la contribución de *rpr* y *hid* al evento de migración. Los resultados obtenidos muestran que ambos tienen una función como inductores de muerte celular, dado que su bloqueo es capaz de rescatar la muerte detectada tanto por TUNEL como por la picnosis de los núcleos generada en los tejidos CIN (Figura 28). Sin embargo, es interesante destacar la presencia de una segunda función diferencial entre ambos, una función no apoptótica relacionada con la adquisición de capacidad invasiva.

Se sabe que las proteínas proapoptóticas RPR, HID y GRIM a pesar de ser homólogos responsables de la activación de la misma vía, tienen realmente pocas similitudes a nivel estructural, lo que se asocia a funciones específicas desempeñadas por cada uno de ellos (Vucic, Kaiser et al. 1998). Este es el caso, de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, ya que se demuestra que tanto RPR como HID presentan un papel directo como activadores de muerte celular, pero en contraste, sólo HID es responsable del fenómeno invasivo.

Además, el hecho de que *hid-ARNi* por sí solo fenocopiase el efecto obtenido por el *miRHG* (Figura 27), sugiere tanto que es necesario para la migración de dichas células, como que es el principal gen proapoptótico responsable del fenotipo invasivo, dado que su bloqueo individual es equiparable al bloqueo de los tres genes en paralelo.

Respecto a si RPR o GRIM podrían tener también un cierto efecto sobre la invasividad celular, aunque sea de forma más leve, no puede descartarse por completo dado que ambos también son activadores de la vía apoptótica y por tanto de las caspasas, responsables de inducir

migración. Por tanto, la pregunta es qué interacciones presenta HID para generar el fenotipo invasivo.

La respuesta podría estar relacionada con una de las características más importantes de las proteínas proapoptóticas, ya que, además de actuar como activadores de las caspasas, son proteínas con múltiples interacciones, capaces de desempeñar funciones concretas en la muerte celular que van más allá de la mera activación de DRONC (Thomenius and Kornbluth 2006). Ejemplo de ello es su interacción directa con ciertos elementos de la mitocondria, responsables de inducir su fragmentación (Abdelwahid, Yokokura et al. 2007).

Además, un aspecto importante en la especificidad de HID por la invasividad celular podría relacionarse con su localización en la membrana mitocondrial, a diferencia de RPR y GRIM. Esto podría influir en la supervivencia celular ante un estrés determinado o directamente en el suministro energético de la célula, fundamental para un proceso activo de desplazamiento.

En este contexto es fundamental entender que en procesos biológicos que median respuestas a estrés celular, las concentraciones de distintos elementos constituyen un factor fundamental para definir el futuro de cada célula. Las señales que afectan a las células aneuploides, en estadios tempranos o más avanzados, también son muy diferentes. De hecho, la activación de los genes proapoptóticos ante distintos estímulos no ocurre de la misma forma. Ejemplo de ello es el caso de la respuesta a la ecdisona durante el desarrollo, la cual induce la activación directa de *rpr*, convirtiéndolo en una respuesta primaria a dicho estímulo, a diferencia de la activación de *hid*, que al presentar un mecanismo de mayor complejidad corresponde a una respuesta más tardía o secundaria (Jiang, Lamblin et al. 2000). Dichas diferencias se ponen de manifiesto de acuerdo con los datos obtenidos, donde el pico de *rpr* se da en

momentos más iniciales del tumor y luego mantiene un nivel de actividad constante, mientras que *hid* sufre un incremento exponencial con el paso del tiempo.

Por otro lado, un punto interesante que mencionar respecto a la activación de la vía apoptótica, es la contradicción que puede suponer que la misma vía que es inductora de muerte sea capaz de actuar también en un contexto de supervivencia y migración. Sin embargo, si dichas capacidades se sitúan en un contexto biológico diferente del tumoral, no resulta tan extraño. De hecho, el proceso de proliferación inducida por apoptosis (AiP) está también basado en la reorganización de las nuevas células, sustitutas de aquellas que han sido eliminadas, para lo cual, la movilización celular es un proceso fundamental para recuperar la homeostasis del tejido. Por tanto, existe la posibilidad de que no sea más que un mal funcionamiento de un sistema reservado a regenerar el tejido, pero que en células tumorales con potencial ilimitado de supervivencia y crecimiento ocasiona un efecto contrariamente dañino para el organismo que lo padece.

## 2. Implicaciones de los elementos de la vía apoptótica relevantes en migración

Uno de los objetivos de este trabajo fue elucidar cuál o cuáles eran las caspasas implicadas en el evento de migración. Los datos obtenidos mostraron que el bloqueo de las tres caspasas afectaba a la invasividad celular, siendo el más fuerte el bloqueo inducido por *dcp1-ARNi*, seguido de *drice-ARNi* y *dronc-ARNi*.

Dichos resultados muestran la clara implicación de DrICE y DCP1 como inductoras de migración al ser elementos finales de la vía. En contraste, el efecto del DRONC se relacionó más con su capacidad como activador

de las caspasas efectoras, dado que tanto su bloqueo como su sobreexpresión generaron un fenotipo menos eficiente en términos de migración. A pesar de ello, no se descarta que tenga cierta relevancia como inductor de invasividad de forma directa, aunque su papel no sea tan necesario como el de las caspasas efectoras.

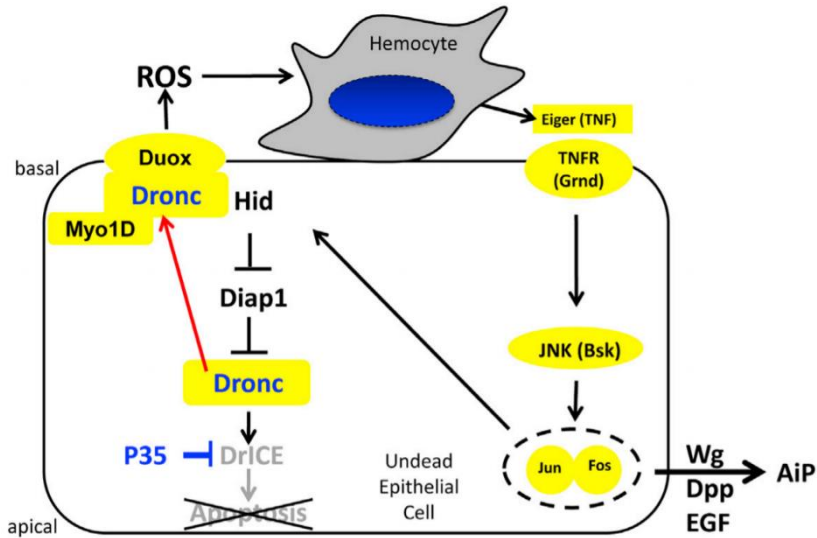
Respecto a las caspasas efectoras, el caso que supuso el mayor rescate se obtuvo en el caso de *dcp1-ARNi*, el cual llegó a ser superior incluso a los obtenidos con el *miRHG* y de *hid-ARNi* (Figura 26 y Figura 29). Dado que son herramientas diferentes es difícil saber exactamente si una de las caspasas efectoras presenta mayor afinidad por el proceso invasivo que la otra, sin embargo, hay dos datos que sugieren una mayor especificidad como inductor de invasividad de DCP1. Por un lado, el rescate de muerte celular obtenido con *drice-ARNi* es uno de los más importantes, comparable de hecho al obtenido con el *miRHG*, lo que implica una alta eficiencia del ARNi. Sin embargo, su capacidad de rescatar la invasividad fue menor que la de *dcp1-ARNi* (Figura 29 y Figura 30). Por otro lado, en el caso de la sobreexpresión, *UAS drice* generó el fenotipo de mayor picnosis nuclear, haciendo ver de nuevo que la herramienta es plenamente funcional, sin embargo, no fue capaz de inducir un incremento significativo de la invasividad, en contraste con *UAS dcp1* que mostró una menor picnosis, pero una mayor capacidad de inducir invasividad (Figura 32 y Figura 33).

Sin embargo, otra opción sería que DRICE, dada su fuerte relación como inductor de muerte celular no llegue a inducir un fenotipo tan llamativo en términos de invasividad porque dichas células no llegan a sobrevivir incluso en presencia del bloqueo de p35. Esto implicaría que ambas son capaces de inducir la invasividad de las células, pero solo DCP1 presenta una capacidad realmente invasiva debido a su menor capacidad de inducir muerte celular en los tejidos.

Con relación a la función de las caspasas iniciadoras en el fenómeno invasivo, DRONC y DREDD también demostraron ser capaces de rescatar la migración celular (Figura 29 y Figura 39). Sin embargo, la baja eficiencia obtenida y el efecto nulo en el bloqueo de la muerte por TUNEL (Figura 30 y Figura 40), sugeriría que podría deberse a una acción solapada entre ambas. Esto implicaría que la función de activación seguiría vigente al bloquear solo una de ellas y, por tanto, sería necesario un bloqueo combinado para obtener un fenotipo más fuerte. Otras opciones también factibles en vista de los resultados serían la presencia de otro componente que actúe como activador intermedio, opción poco probable ya que la implicación de otros candidatos ha sido ampliamente estudiada en este organismo modelo; o bien la capacidad autocatalítica de las caspasas efectoras ante una situación apoptótica. Dentro de esta última opción cabría la posibilidad de su interacción directa con HID, en este caso como regulador del evento invasivo, o con otra de las proteínas proapoptóticas, dado que actualmente no se ha descrito que las caspasas efectoras sean capaces de inducir su propio procesamiento *in vivo*.

También son importantes, dada su relación directa con DRONC (Amcheslavsky, Wang et al. 2018), los resultados obtenidos en referencia al sistema propuesto por Andreas Bergman (Figura 75). El hecho de que el bloqueo de DUOX fuera capaz de incrementar la invasividad (Figura 38), descarta que contribuya al evento de migración celular, al menos como activador. Hay varias opciones que podrían explicar dicho resultado. Una opción sería que su interacción con DRONC supone un evento competitivo y que, al no ser capaz de inducir su arresto en la membrana celular, induce mayores niveles de DRONC en el citoplasma, quedando disponible para actuar como activador de las caspasas efectoras. Sin embargo, esto no explicaría porque *myo1D-ARNi* no generó el mismo efecto, a menos que se asuma que el simple transporte

de DRONC no evita su función como inductor de migración. Otra posibilidad sería la disminución del tamaño tumoral que generó (Figura 38B), lo cual podría estar alterando el resultado y explicaría por qué *myo1D-ARNi* no generó el mismo incremento de invasividad.



**Figura 75. Modelo apoptótico DUOX-MYO1D.** Modelo de interacción de las proteínas DUOX y MYO1D con la vía de las caspasas, donde contribuye con la activación en bucle la vía de JNK (Amcheslavsky, Wang et al. 2018).

### 3. Relevancia de la vía de JNK en nuestro modelo

La información aportada sobre la relación existente entre JNK y la vía de las caspasas en los tumores CIN mostró en algunos experimentos dificultades para detectar la contribución real. Uno de los factores clave que se consideran responsables de dicho hecho es que la utilización de sensores en el disco de ala bajo el promotor *apterous* da en numerosas ocasiones problemas debido a las grandes malformaciones tumorales donde múltiples capas de células se solapan y donde llega a generarse porcentajes importantes de muerte no autónoma debido a la secreción

de moléculas al espacio extracelular. Este hecho, sumado a la disminución del tamaño de la región de estudio al usar *bskDN*, pudo ser la responsable de los resultados obtenidos, dado que, al afectar al área de medición se generaban discos más pequeños, donde la separación de las regiones de muerte no autónoma no era tan eficiente.

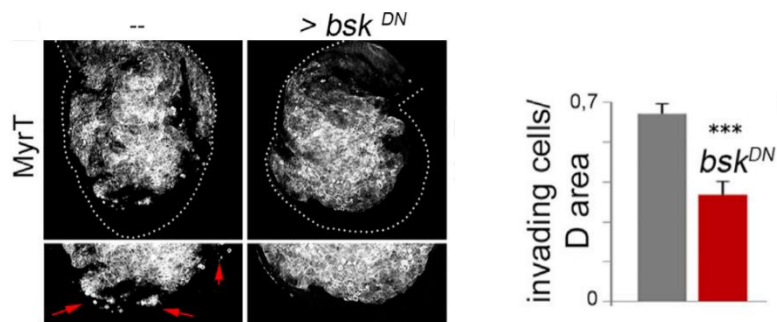
Por ello, aunque los resultados con TUNEL solo mostraron una tendencia descendente, el análisis en detalle del tejido detectó la presencia de una población de células más sanas y no picnóticas (Figura 48), la cual había sufrido una fuerte delaminación a la región más apical de los discos, enmascarando así parte del resultado. Más concretamente, en la región basal del *pouch*, se pudo detectar una población celular donde la vía de JNK es determinante en la muerte celular.

Dada la presencia de esta población particular que parecía estar concentrada concretamente en la parte basal del *pouch*, se relacionó, como se ha comentado en numerosas ocasiones, con el concepto de que las combinaciones y/o concentraciones de las señales que están presentes sobre cada célula particular son determinantes para definir de qué forma reacciona a un estrés. Por tanto, de igual forma que células en distintos puntos del disco, están sometidas a gradientes diferenciales durante el desarrollo para definir la conformación del tejido (Barrio and Milán 2017), dicha combinación podría resultar crucial en este caso.

Respecto a de qué manera JNK induce muerte de una forma más dirigida a esta población celular, una hipótesis que se ha barajado en esta dirección es que JNK tenga una mayor afinidad por el gen proapoptótico *rpr*, como parecieron indicar los resultados de la qPCR (Figura 45). En dichos resultados se obtuvo que el mayor rescate de *rpr* se generó mediante el bloqueo de JNK llegando a ser prácticamente igual que en tejido control, mientras que el mayor rescate de *hid* fue obtenido mediante el bloqueo de la vía de JAK/STAT. Además, referente a una relación más

estrecha entre JNK y RPR, se han descrito tanto que presentan una interacción específica, como que RPR per se induce muerte celular de forma no dependiente de las caspasas efectoras por la disrupción de la membrana mitocondrial. (Kuranaga, Kanuka et al. 2002) (Abdelwahid, Yokokura et al. 2007)

Resultados como el rescate de la expresión de *hid* y *rpr* mediante el bloqueo de la vía de JNK (Figura 46), la presencia inequívoca y excluyente en prácticamente la mitad de la población migratoria (Figura 42), así como los datos publicados de la importante capacidad de rescate de la invasividad descritos en publicaciones anteriores (Figura 76) (Benhra et al 2018) denotan la gran relevancia de esta vía como elemento inicial en el desarrollo tumoral y el evento migrante.



**Figura 76. JNK en invasividad.** El evento invasivo generado en los tumores CIN sufrió un importante impacto al bloquear la vía de JNK mediante *bsk<sup>DN</sup>*, demostrando así la importante relevancia de dicha vía en el modelo migratorio descrito (Benhra et al 2018).

#### 4. Relevancia de p53 y el ciclo celular en nuestro modelo

Como se planteó en la introducción, Dp53 presenta una estrecha reacción con la vía de JNK, sin embargo, en vista de los resultados obtenidos, no parece indicar que dicho componente tenga un papel fundamental en el evento invasivo de los tumores CIN. Este hecho descartaría la presencia mayoritaria de un bucle de amplificación entre



JNK y Dp53 en nuestro modelo, sin descartar por completo que puedan presentar cierta interacción, dados los resultados obtenidos en las poblaciones celulares, donde un 18% de las células migratorias presentaban colocalización de ambas vías (Figura 47).

Sin embargo, estuvo presente en un porcentaje muy elevado de las células excluyentes a JNK, que correspondería a la población activa para JAK/STAT. En vista de que el bloqueo tanto por *Dp53-ARNi* como *ampk-ARNi* no fueron capaces de rescatar la muerte (Figura 49) ni la invasividad (Figura 48), se descartó que fuera el elemento responsable de la activación de caspasas, y, en consecuencia, su alta colocalización en dicha población se relacionó como un efecto de la actividad de la vía apoptótica, la cual como se describió con anterioridad induce numerosos efectos sobre las células. Uno de ellos es la fragmentación mitocondrial que puede ocurrir por acción directa de HID y RPR con elementos mitocondriales (Kuranaga, Kanuka et al. 2002) (Abdelwahid, Yokokura et al. 2007), esto se traduciría directamente en un aumento del estrés proteotóxico y podría ser el desencadenante de activar de Dp53. Todo ello conjunto implicaría por tanto que la activación de Dp53 no es causa, si no consecuencia de la activación de la vía apoptótica.

En referencia a la forma en que el bloque por *Dp53-ARNi* y *ampk-ARNi* generan un incremento de la invasividad celular, se sugirió que podría ser debido a que Dp53 induce arresto en el ciclo celular, que se ha descrito ocurre entre las fases G1 y S (Owusu-Ansah, Yavari et al. 2008). Por ello, se decidió elucidar si la población migratoria se encontraba mayoritariamente en un estadio celular diferente de estos, en este caso en G2, y que el arresto en las fases iniciales del ciclo celular actuaba en detrimento de la migración celular.

Los datos obtenidos por Fly Fucci corroboraron dicha hipótesis mostrando que las células migratorias se encontraban en fase G2 en los

tumores CIN (Figura 54). Además, los bloqueos realizados tanto con la *CycE-ARNi* como con *E2F-ARNi*, los cuales también favorecían el arresto en las primeras fases del ciclo celular, generaron una importante disminución de la invasividad (Figura 53). Dichos datos implican que tanto el modelo migratorio dependiente de JNK, como el dependiente de JAK/STAT inducían paralelamente el arresto en el mismo punto del ciclo celular, hecho que ha sido relacionado en ocasiones con una mayor supervivencia celular (Cosolo, Jaiswal et al. 2019).

Por todo ello, aunque la evidencia definitiva de que Dp53 actuase arrestando la población migratoria en las fases G1 y S no se pudo corroborar por las limitaciones técnicas del modelo, sí que los datos obtenidos presentaron fuertes evidencias acerca de la fuerte conexión entre la migración y el arresto en la fase G2, la cual, aunque no pertenecía a la línea principal de este trabajo, abría una nueva línea de investigación del evento invasivo en nuestro modelo.

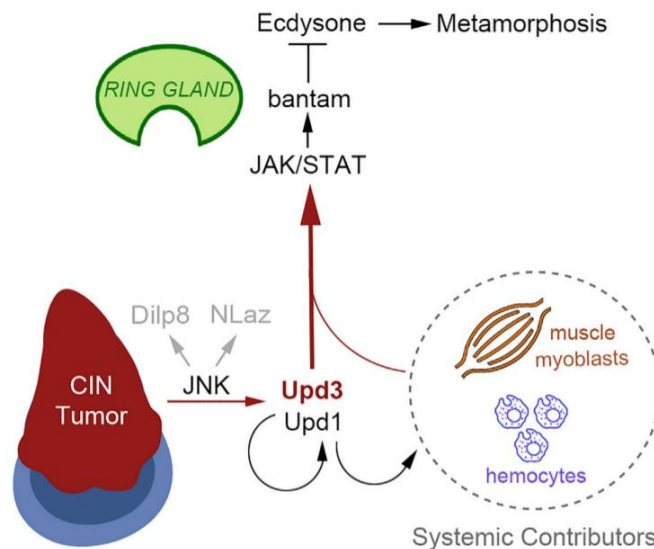
### 5. Evolución temporal de las dos vías y de las poblaciones migratorias

Los resultados obtenidos mostraron cómo la vía de JAK/STAT, presente en los tumores CIN, era fundamental para la regulación y activación del fenómeno invasivo inducido por caspasas y que además dicha inducción era independiente de la vía de JNK. Este dato introdujo el concepto de coexistencia de distintas poblaciones celulares en los tumores CIN p35, donde las células podían adquirir la capacidad invasiva de formas diferentes.

Dado que ambas vías se mostraron excluyentes en los análisis poblacionales (Figura 57), sumado a la constante presencia de pequeño porcentaje de células positivas para ambas, se aceptó que tanto JAK/STAT como JNK podían inducir migración celular por sí solas o también actuando de forma simultánea. Sin embargo, un factor que se erigió como fundamental en la coexistencia de dichas poblaciones pasó

a ser el tiempo, dado que los tumores CIN presentaron una evolución donde inicialmente la progresión tumoral era orquestada por la vía de JNK, pero a medida que avanzaba el tiempo, era desplazada por una activación creciente de la vía de JAK/STAT. (Figura 73)

El incremento exponencial de la vía de JAK/STAT, descrito previamente en nuestro laboratorio (Romão, Muzzopappa et al. 2021), era generado debido a un efecto sistémico desencadenado por el organismo ante el tumor, donde otros tejidos como el intestino o el musculo se convierte en fuente de citoquinas proinflamatorias, induciendo la activación crónica de la vía (Figura 77)



**Figura 77. Efectos sistémicos de los tumores CIN.** Los tumores CIN generados en el disco de ala tienen un efecto sistémico en todo el organismo generando que diferentes tejidos se conviertan en fuente de los UPD y afectando el proceso de metamorfosis a través del bloqueo de la ecdisona (Romão, Muzzopappa et al. 2021)

El incremento de activación de la vía de JAK/STAT a medida que el tumor entraba en fases más avanzadas inducía en consecuencia también la activación creciente del gen proapoptótico *hid*, el cual se ha descrito por

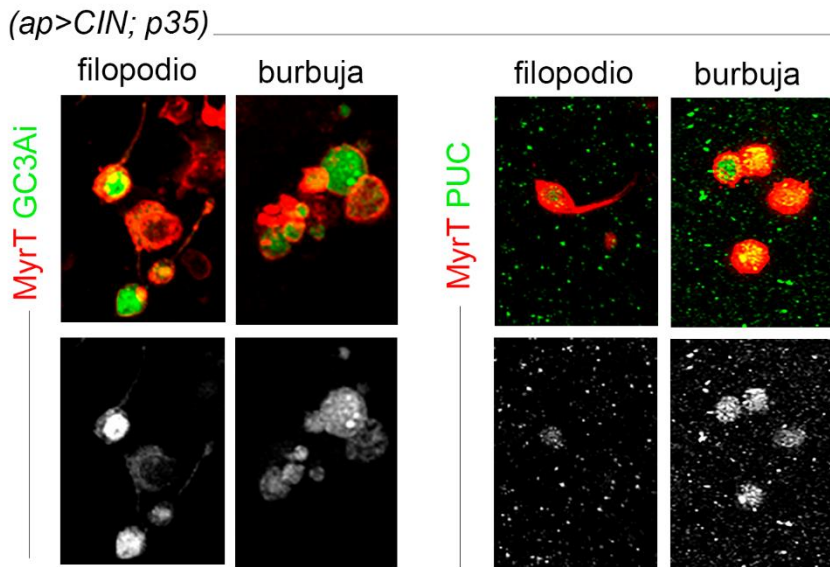
ser diana directa de esta vía (Borensztein, Boissoneau et al. 2013, Maurya, Surabhi et al. 2021). Todo ello generaba la consecuente activación de la vía de las caspasas, otorgando así a las células aneuploides la capacidad de migrar a otros tejidos en los tumores CIN.

Es interesante destacar también que, de acuerdo con los resultados obtenidos de las distintas citoquinas proinflamatorias, sólo UPD3 influía específicamente en la inducción de la migración celular. Dicha información correlaciona con evidencias previas que relacionan la IL-8, homólogo en mamífero de UPD3, con la migración de células epiteliales y la formación de filopodios y estructuras invasivas (Lai, Shen et al. 2011).

Sin embargo, recientemente se describió que ante el estímulo por activación de RasV12, era la citoquina proinflamatoria UPD1 la que actuaba como factor proinvasivo en el disco imaginal de ojo y cerebro, a través también de la interacción con la vía de JAK/STAT (Enomoto, Takemoto et al. 2021). Todo ello en conjunto indica que estímulos concretos desempeñan diferencias sutiles, pero de crucial importancia en las vías que se activarán en respuesta a ello.

También se mencionó al inicio del trabajo la existencia de dos poblaciones celulares con dos conformaciones distintas: conformación de filopodio (conformación menos habitual) o conformación de burbuja (conformación migratoria mayoritaria). Dado que durante el desarrollo de los análisis se mostró también que existían dos poblaciones respectivas a las vías de JNK y JAK/STAT, se hipotetizó con la posibilidad de que cada una correspondiera con una de las vías; sin embargo no se llegó a relacionar la conformación con una vía específica dado que se encontraron células migratorias de ambas conformaciones pertenecientes tanto a la población JNK como en la población JAK/STAT (Figura 78), aunque ciertamente el número de células que mostraban estructuras filopoidales fue mayoritariamente perteneciente a la segunda

población. Este hecho no es de extrañar puesto que la inducción de este tipo de estructuras por la vía de JAK/STAT ha sido descrito en numerosas ocasiones por ser determinante en procesos de adhesión y la alteración de la morfología celular en células migrantes al inducir alteraciones en el citoesqueleto (Lai, Shen et al. 2011) (Kuai, Wang et al. 2012).



**Figura 78. Conformaciones celulares en las vías de JNK y de caspasas.** En la población migratoria tanto la población de la vía de caspasas, como la de JNK, mostraron células con ambas conformaciones descritas.

A pesar de que no se logró relacionar ninguna de las poblaciones con una vía concreta, surge la pregunta acerca de qué diferencias funcionales existen entre ambas y, en consecuencia, si dicha diferencia se correlaciona con un fenotipo invasivo más agresivo o exitoso a la hora de migrar y asentarse en un tejido concreto. La formación de estructuras extracelulares como los filopodios es un mecanismo utilizado por muchos tipos celulares distintos, donde su función es actuar como medio para explorar la matriz extracelular, la superficie de otras células, identificar

dianas para su adhesión o para generar fuerzas de contracción para desplazarse (Xue, Janzen et al. 2010).

Sin embargo, también se ha relacionado ante la actividad de caspasas con la formación de un entramado de microtúbulos apoptóticos o AMN (*apoptotic microtubule network*). Dichas estructuras se ha sugerido que funcionarían como una barrera física que permitiría aislar ciertas regiones de la célula en un entorno libre de caspasa, evitando el clivaje de proteínas esenciales para la célula. Sin embargo, un signo característico de dichas células es también la externalización de la fosfatidilserina (PS), que pertenece al grupo de señales conocidas como señales “*eat me*” para que dicha célula sea fagocitada. (Oropesa-Ávila, Fernández-Vega et al. 2013).

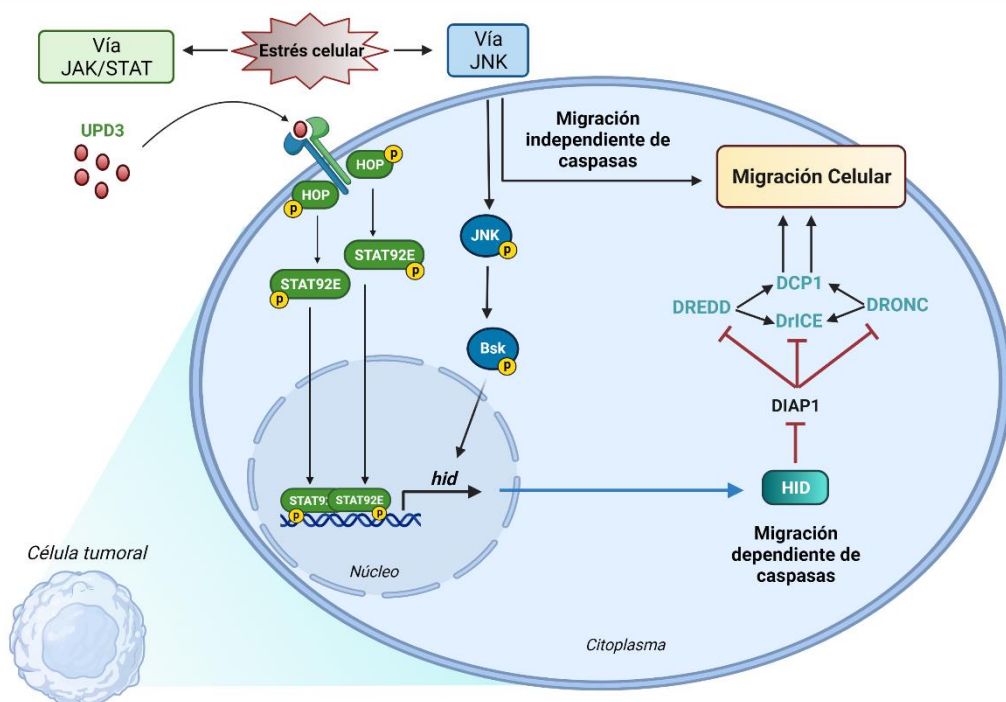
En conclusión, no existe un consenso claro de si la formación de filopodios genera una ventaja o una desventaja en el evento migrante respecto a la conformación en burbuja, dejando una puerta abierta para nuevos estudios de la capacidad invasiva de ambas conformaciones a otros tejidos.

## 6. Modelo final

Poniendo en conjunto los datos obtenidos durante este trabajo, el modelo propuesto se basó en la presencia de dos modelos migratorios: uno dependiente de las caspasas efectoras y otro independiente de las mismas. A su vez, la migración dependiente de caspasas mostró poder ser activada tanto por la vía de JNK como por la vía de JAK/STAT, siendo esta última la principal activadora. En contraste, la vía de JNK fue la principal responsable de la migración independiente de caspasas, actuando a través de otros elementos descritos en publicaciones previas de este laboratorio, como el citoesqueleto de actomiosina (Benhra et al

2018), y regulando la señal generada en etapas más tempranas del tumor.

Respecto a la migración dependiente de caspasas, en la cual se centró este trabajo, se describió como un evento inducido específicamente por el gen proapoptótico *hid*, que concluía en la activación de la vía apoptótica, donde las caspasas efectoras DrICE y DCP1 demostraron ser los elementos fundamentales del evento invasivo. La principal activación de este modelo era llevada a cabo por la vía de JAK/STAT, la cual, a través de la citoquina proinflamatoria UPD3, generaba una activación exponencial de la vía en etapas tardías del tumor.



**Figura 79. Modelo Final.** Descripción esquemática de las vías presentes en las células tumorales confrontando dos modelos: la migración dependiente de caspasas, guiada principalmente por UPD3 y la vía de JAK/STAT; y la migración independiente de caspasas, principalmente guiada por JNK.

## 7. Perspectivas futuras

Un tema que no se desarrolló durante este trabajo fue de qué manera las caspasas efectoras eran capaces de inducir el fenotipo invasivo. En este sentido son muchas las hipótesis que se han barajado. Una alternativa considerada fue que el centro activo que interacciona afectando la invasividad fuera diferente del centro activo responsable de los efectos catalíticos sobre las distintas moléculas. Por esta razón, ante la presencia de p35, el cual afecta directamente a la región DEVD de las caspasas efectoras (Fisher, Cruz et al. 1999), es la situación de migración óptima para las células (tumores CIN p35). En dicha situación, donde la muerte celular es rescatada en un alto porcentaje, las caspasas efectoras serían capaces de ejercer su función invasiva antes de ser degradadas. En dicha hipótesis cobra especial relevancia que la invasividad es un evento que incrementa con el tiempo, paralelamente a la saturación del proteasoma (Joy, Barrio et al. 2021). De esta forma, lo que se genera es una situación celular donde, hay un número creciente de caspasas con la función primaria truncada, y el sistema responsable de su degradación saturado, permitiendo una mayor permanencia de dichos complejos en el citoplasma, a expensas de desarrollar otras posibles interacciones.

Otra hipótesis también podría ser que tanto ellas como otros elementos de la vía induzcan una ventaja directa en la supervivencia celular. Esto podría realizarse mediante alteraciones proteicas, postranscripcionales, o incluso a nivel transcripcional, de igual manera que se ha caracterizado en las células tumorales (Fernald and Kurokawa 2013). Un ejemplo de interacción independiente de muerte es la forma inactiva de DCP1, donde dicha procaspasa interacciona con SesB estabilizándolo y regulando de esa manera el flujo autofágico de la célula (DeVorkin, Go et al. 2014). Otro ejemplo de ello sería la función no apoptótica descrita para la caspasa 3 (homóloga de DrICE en mamíferos), que es capaz de prevenir la muerte celular debida a estrés oxidativo (Kim, Ha et al. 2018).



Como estas, van en aumento las múltiples interacciones de las caspasas con diversos elementos celulares, demostrando así que son mucho más que simples precursores de muerte y abriendo por tanto nuevas vías de estudio acerca de su relación con la progresión de tumores epiteliales.

La información presentada durante esta tesis respalda uno de los puntos que se ha reiterado numerosas veces a lo largo de este trabajo, dado que los factores desencadenantes o activadores como es el tipo de estímulo, el tiempo que está una célula sometida a dicho estrés o simplemente, las condiciones o tejido donde se genera son factores cruciales y determinantes. Pero también indica que el evento invasivo en las situaciones tumorales no es un fenómeno único, sino que existen múltiples modelos migratorios derivados de someter células a estreses concretos. Muchas son las vías diferentes que se han descrito relacionadas con distintos eventos invasivos cuyo único punto común hasta la fecha es que la respuesta ante una situación de estrés desencadena un efecto migratorio de dichas células.

A pesar de ello, es cierto que la información obtenida da un enfoque un tanto diferente de las terapias actuales contra el cáncer. Por un lado, los tratamientos antiinflamatorios son empleados principalmente para paliar el dolor y efectos adversos, que como una terapia dirigida en sí misma para el tratamiento tumoral en etapas avanzadas. Ello, unido a que la vía apoptótica pueda tornarse en un factor determinante en la progresión carcinogénica en sí mismo, denota la gran importancia de la vía de JAK/STAT en la progresión tumoral. Por otro lado, también la implicación de la vía de JNK queda subrayada al ser mediadora de un modelo de migración paralelo e independiente. Todo ello implica que el control de ambas vías altamente conservadas en el reino animal es determinante para entender y tratar dicha enfermedad.

En vista de estos resultados, y dado que el factor que ha convertido el cáncer en uno de los mayores retos biológicos de nuestra historia radica en su variedad y capacidad de adaptación, es posible que un enfoque más simplificado, desde una perspectiva más centrada en los estímulos o estreses responsables de su inducción, más que en su clasificación dependiendo del tipo de patología o la genética, podría contribuir a la búsqueda de tratamientos más efectivos.

Todo ello en conjunto implica por un lado que los niveles son un factor fundamental en la regulación de numerosas funciones no apoptóticas de las caspasas, pero también que, dado el creciente abanico de interacciones con las que se asocian a día de hoy, apenas hemos empezado a entender el alcance de su repercusión en los sistemas biológicos.

# CONCLUSIONES



- La migración celular en tumores CIN es un proceso que incrementa de forma progresiva a lo largo del tiempo y es independiente del tamaño tumoral.
- Los genes proapoptóticos *hid* y *rpr* se encuentran sobreexpresados en los tumores CIN.
- La expresión de *hid* incrementa de forma continuada a lo largo del tiempo, en contraste con *rpr*, cuya concentración se estabiliza.
- Tanto *hid* como *rpr* tienen un papel en muerte celular en los tumores CIN, pero solo *hid* demostró ser necesario para la migración celular.
- Las caspasas efectoras DrICE y DCP1 presentan una función no apoptótica regulando el evento migratorio de las células en tumores CIN.
- La invasividad celular detectada en los tumores CIN es un proceso activo, donde un gran porcentaje de la población de células migratorias es negativo para marcadores de muerte incluso presentando altos niveles de caspasas activas.
- La caspasa iniciadora DREDD contribuye al proceso invasivo en tumores CIN.
- La población migratoria inducida por caspasas es mayoritariamente excluyente con la vía de JNK.
- La vía de JNK regula parcialmente la activación de la vía apoptótica, indicando la existencia de una segunda vía de activación.
- Dp53 no es responsable de la activación de la vía de las caspasas en los tumores CIN.
- Las células migratorias se encuentran arrestadas en fase G2 del ciclo celular.
- La vía de JAK/STAT es la principal vía reguladora de la invasividad inducida por caspasas.

- El tratamiento con Ruxolitinib generó tanto el rescate en migración como el bloqueo de las caspasas.
- La citoquina proinflamatoria UPD3, pero no UPD1, demostró ser la fuente implicada en la inducción de invasividad celular en tumores CIN.
- Las vías de JNK y JAK/STAT no presentan una interacción a nivel de activación o bloqueo mutuo.
- La vía de JNK alcanza el punto máximo de activación a las 144 horas, y dicho valor se mantiene de forma lineal en etapas posteriores de los tumores CIN.
- La vía de JAK/STAT aumenta exponencialmente a lo largo del tiempo durante el desarrollo de los tumores CIN.
- Existe una transición de las poblaciones existentes en los tumores CIN, siendo prevalente la población JNK en las células migratorias en estadios iniciales y la población JAK/STAT en estadios más avanzados.

# MATERIAL Y MÉTODOS





## 1. Materiales y protocolos

### 1.1 Líneas de *Drosophila*

Las siguientes líneas fueron provistas por BDSC (Bloomington Drosophila Stock Center): *ap-GAL4*; *UAS-myristoylated-Tomato* (32222); *UAS-p35* (5073); *UAS-GFP ARNi* (41550); *ap-GAL4*; *UAS-myristoylated-Tomato*, *UAS-bub3 ARNi*; *UAS-wg-ARNi* (32994); *UAS-bskDN* (6409); *UAS-*; *UAS-duox ARNi* (2593); *UAS-Myo1D ARNi* (33971); *UAS-hid ARNi* (82096); *hid-LacZ* (38010); *UAS-dronc GFP* (56758); *rpr-LacZ* ; *UAS-dredd ARNi* (84070); *UAS Dcp1 (III)*; *UAS-E2F ARNi (III)*; *UAS-Cyclin E (III)*; *UAS-ciclina E ARNi*; *UAS-p53 ARNi* (36814); *puc-lacZ*; *UAS-ampk ARNi* (32371); *UAS-FlyFUCCI* (55099); *hid-EGFP 5'F-WT (p53 sensor (III))* (50750); *UAS-Dome ARNi* (36356); *UAS-Dronc-i* (32963); *UAS-upd3 ARNi*(27186); *UAS-Upd1 ARNi* (33680); *UAS-hop ARNi (III)*; *UAS-stat ARNi (II)*; *UAS-stat ARNi* (33637); *UAS-Mito HA GFP* (8443).

Líneas provistas por VDRC (Vienna Drosophila ARNi Center): *UAS-bub3-ARNi* (21037); *UAS-drice ARNi* (28064); *UAS-dcp1 ARNi* (34328); *UAS-dronc ARNi*; *UAS-rpr ARNi* (12045); *UAS-dronc ARNi* (30339); *UAS-drice* (7781).

Además se obtuvieron de otras fuentes las siguientes líneas: *UAS-GC3Ai* artículo (Schott, Ambrosini et al. 2017); *miRHG* (Siegrist et al 2010); *upd3-LacZ* donado por H. Jiang ; *UAS hop* donado por J.Castelli; *UAS Upd3* donado por D.Harrison; *UAS-DomeDN (III)* donado por James Hombria; *STAT GFP10x* donado por M. Dominguez.

## 1.2 Puesta de embriones y tiempos de desarrollo

Inducción tumoral: Se realizaron puestas de una duración de 24 horas a 25°C, tras lo cual se realizó el cambio de las moscas adultas a un nuevo tubo. La puesta se mantuvo otras 24 horas a 25°C, seguido de su pase a un baño a 29°C durante 96 horas más. Pasadas las 144 horas totales se realizó la disección de las larvas en estadio L3.

Experimentos de Ruxolitinb: Se realizaron puestas de una duración de 24 horas a 25°C, tras lo cual se realizó el cambio de las moscas adultas a un nuevo tubo. La puesta se mantuvo otras 24 horas a 25°C, seguido de su pase a un baño a 29°C durante 96 horas más. El tratamiento se inició durante este último periodo a 29°C, empezando tras 24 horas a 29°C e incluyendo el tratamiento hasta el mismo día de la disección a las 144 horas, donde se seleccionó y diseccionó las larvas en estadio L3.

Experimentos de evolución temporal: Los experimentos se realizaron en tres momentos temporales correspondientes a 96, 144 y 216 horas.

- En el caso de 96 horas: se realizó la puesta durante 24 horas a 25°C, tras lo cual se realizó el cambio de las moscas adultas a un nuevo tubo. La puesta se mantuvo otras 24 horas a 25°C, seguido de 48 horas a 29°C, tras lo cual se procedió a la disección de larvas L3 tempranas.
- En el caso de 144: se realizó la puesta durante 24 horas a 25°C, tras lo cual se realizó el cambio de las moscas adultas a un nuevo tubo. La puesta se mantuvo otras 24 horas a 25°C, seguido de 96 horas a 29°C.
- En el caso de 216: se realizó la puesta durante 24 horas a 25°C, tras lo cual se realizó el cambio de las moscas adultas a un nuevo tubo. La puesta se mantuvo otras 24 horas a 25°C, seguido de 96 horas a 29°C. Tras ello se volvió a poner la puesta a 25°C hasta el momento de la disección.

### **1.3 Inmunohistoquímica**

Los discos imaginales de ala en estadio L3 fueron diseccionados en PBS1 a 4°C, fijados en formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron tres lavados de 15 minutos en PBT (PBS1X, 0,3% TritonX-100) y el bloqueo durante media hora en BBT (5% NaCl, 1% de BSA 30%, 1% Triton al 10% y 93% PBS1X). Posteriormente los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en 50µL de BBT durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MMP1 de ratón (1:2) (14A3D2, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB); anti-GFP de conejo y de ratón (1:600) (Molecular Probes, A6455 y A11120; respectivamente), anti-β-GAL(1:600) (Cappel; 0855976), anti-cleaved-Dcp1 de ratón (1:100) (9578S, CST). Al día siguiente, tras realizar tres lavados de PBT incubó durante 90 minutos de los anticuerpos secundarios en concentración 1:200 en BBT. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Cy2 (AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG), Cy5 (AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG), y Alexa 647 (AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG), obtenido de “Jackson ImmunoResearch”, junto con DAPI (1:100). Tras ello se realizaron 3 lavados más de PBT y el tejido se pasó al medio de montaje (45% Glicerol, 5% PBS10x, 400ul nPG at 50% in Etanol (nPropyl gallate, Sigma#3130-100G, 50% ddH2O).

### **1.4 TUNEL verde**

Los discos imaginales de ala en estadio L3 fueron diseccionados en PBS1 a 4°C, fijados en formaldehído al 4% durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron cuatro lavados de 15 minutos en PBT (PBS1X, 0,3% TritonX-100) y el bloqueo durante una hora en BBT (5% NaCl, 1% de BSA 30%, 1% Triton al 10% y 93% PBS1X). Posteriormente se los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en

50µL de BBT durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras realizar cuatro lavados de PBT a 4°C, se realizó la incubación durante 4 horas de los anticuerpos secundarios en concentración 1:200 en BBT a 4°C. Tras ello se realizaron 3 lavados más de PBT y se dejó en BBT hasta el día siguiente. Al tercer día, cada muestra se incubó durante 30 minutos a 65°C en 495µl de 100mM Na-Citrato y 2,5µl de TritonX-100 al 20%. Tras hacer tres lavados inmediatos en PBT, se incubó durante 5 minutos en 50ul de TUNEL-Dilution buffer (Roche), y pasado ese tiempo se repitió la incubación por otros 5 minutos. Después se realizó una nueva incubación durante 30 minutos a 37°C en 30µl de Labeling solution (in situ cell death detection TMR green kit, Roche). Acto seguido se añadió 3µl de la solución enzimática (Enzyme solution-in situ cell death detection TMR green kit, Roche) y se mantuvo a 37°C durante hora y media. Posteriormente se realizaron 3 lavados rápidos de PBT y se realizó una incubación de 10 minutos con DAPI (1:100) en 100µl de BBT a 4°C. Tras realizar cuatro lavados de 15 minutos en PBT, y el tejido se pasó al medio de montaje (45%Glicerol, 5% PBS10x, 400µl nPG at 50% in Etanol (nPropyl gallate, Sigma#3130-100G, 50% ddH220).

### **1.5 TUNEL en rojo lejano**

Los discos imaginales de ala en estadio L3 fueron diseccionados en PBS1 X frío, fijados en formaldehído al 4% durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBT (PBS1X, 0,3% TritonX-100) y el bloqueo durante una hora en BBT (5% NaCl, 1% de BSA 30%, 1%Triton al 10% y 93% PBS1X). Posteriormente se los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en 50µL de BBT durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, tras realizar cuatro lavados de PBT a 4°C, se realizó la incubación durante 4 horas de los anticuerpos secundarios en concentración 1:200 en BBT a 4°C. Tras ello

se realizaron 3 lavados más de PBT y se dejó en BBT hasta el día siguiente. Al tercer día, cada muestra se incubó durante 30 minutos a 65°C en 495µl de 100mM Na-Citrato y 2,5µl de TritonX-100 al 20%. Tras hacer tres lavados inmediatos en PBT, se incubó durante 5 minutos en 50µl de TUNEL-Dilution buffer (Roche), y pasado ese tiempo se repitió la incubación por otros 5 minutos. Acto seguido se realizó la incubación durante 2 horas a 37°C en el TUNEL-Reaction-Mix (1ul de Enzima TdT y 50µl de TUNEL-Reaction-Buffer, Component A, Biotium). Posteriormente se realizaron 3 lavados rápidos en PBT y se incubó de 10 minutos con DAPI (1:100) en 100µl de BBT a 4°C. Tras realizar tres lavados de 10 minutos en PBT, y el tejido se pasó al medio de montaje (45%Glicerol, 5% PBS10x, 400µl nPG at 50% in Etanol (nPropyl gallate, Sigma#3130-100G, 50% ddH220).

### **1.6 Medición de intensidades:**

Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD] se midió tanto el tamaño del área dorsal (D) de los discos (marcados mediante el fluoróforo myrT) como la intensidad de los distintos sensores en dicha región. Las fotos se sacaron utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM780 con el objetivo de inmersión en glicerol 40X para cada disco con secciones ópticas de 1,5 µm para cubrir el grosor completo de cada disco. Para controlar que el crecimiento de los discos se realizara de manera paralela, se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura y tiempo de inducción y se analizaron en paralelos los distintos genotipos, su significancia fue medida por el análisis t-test mediante el software estadístico Prism 7.0 (Graphpad).

## 1.7 RT-PCR Cuantitativa

Para la cuantificación de los niveles de mRNA, el ARN fue extraído de los discos de ala de larva L3 usando Trizol-Reagent (Invitrogen). De cada muestra se hizo la extracción de 80 discos.

Un total de 1.5 µg de ARN se trataron con DNase y la síntesis del cDNA se realizó utilizando Maxima-Reverse-Transcriptase (Thermo Scientific). Para la reacción de amplificación se utilizó Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(Thermo Scientific) y se llevó a cabo en QuantStudio 6 Pro Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems).

Las muestras se normalizaron respecto al gen control Mnf y los niveles de cada muestra fueron calculados utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$ . Para este estudio se utilizaron triplicados de tres muestras biológicas de cada genotipo.

Para la reacción se utilizaron los siguientes primers: Mnf-Fw:5'-GAGCAGAAGAGCCCCTACCT -3', Mnf-Rv: 5'- AAT GAA ACC CTG ACG TGG AC -3' (Ponton et al., 2011); Rpr-Fw: 5'- TTG CGG GAG TCA CAG TGG A -3',Rpr-Rv: 5'-TGC GAT GGC TTG CGA TAT TT-3' (Zhang and Cohen 2013); Hid-Fw: 5'-CCT CTA CGA GTG GGT CAG GA-3', Hid-Rv: 5'-CGT GCG GAA AGA ACA CAT C-3' (Zhang and Cohen 2013).

## 1.8 Tratamiento con Ruxolitinib

Se realizaron puestas de una duración de 24 horas a 25°C, tras lo cual se realizó el cambio de las moscas adultas a un nuevo tubo. La puesta se mantuvo otras 24 horas a 25°C, seguido de su pase a un baño a 29°C durante 96 horas más. El tratamiento se inició tras 24 horas a 29°C y se administró durante los cuatro días siguientes, incluyendo el tratamiento hasta el mismo día de la disección a las 144 horas. Para este análisis se estudió paralelamente un tratamiento con agua, DMSO en una

concentración 1 $\mu$ M y Ruxolitinib en una concentración 1 $\mu$ M. Tras dicho proceso se seleccionaron y diseccionaron las larvas en estadio L3.

## **2. Cuantificaciones y análisis**

### **2.1 Procesamiento y análisis de las imágenes**

Migración celular: Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD], se midió el tamaño del área dorsal (D) de los discos (marcados mediante DAPI y el fluoroforo myrT respectivamente). Las fotos se sacaron utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5 MP, con el objetivo seco 20X para cada disco y realizando fotos de un único plano basal. Paralelamente se analizó también el número de células migratorias de cada disco también utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5 MP, con el objetivo de inmersión en glicerol 40X para cada disco con secciones ópticas de 1,5  $\mu$ m para cubrir el grosor completo de cada disco. Para controlar que el crecimiento de los discos se realizara de manera paralela, se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura y tiempo de inducción y se analizaron en paralelo los distintos genotipos, su significancia fue medida por el análisis t-test mediante el software estadístico Prism 7.0 (Graphpad).

Ratio D/T: Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD], se midió el tamaño del área total (T) y dorsal (D) de los discos (marcados mediante DAPI y el fluoroforo myrT respectivamente). Las fotos se sacaron utilizando el microscopio confocal Leica TCS SP5 MP, con el objetivo seco 20X para cada disco y realizando fotos de un único plano basal. Para controlar que el crecimiento de los discos se realizara de manera paralela, se mantuvieron las mismas

condiciones de temperatura y tiempo de inducción y se analizaron en paralelo los distintos genotipos, su significancia fue medida por el análisis t-test mediante el software estadístico Prism 7.0 (Graphpad).

Poblaciones celulares: Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD], se cuantificó número de células migratorias de cada población en los distintos discos. Las imágenes se obtuvieron utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM780, con el objetivo de inmersión en glicerol 40X para cada disco con secciones ópticas de 1,5  $\mu\text{m}$  para cubrir el grosor completo de cada disco.

## **2.2 Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron de manera genérica por el unpaired equal-variance two-tail t-test. Se consideró significativo cuando el valor p era inferior a 0.001 (\*\*\*) , 0,01 (\*\*), o 0.05(\*). Todos los genotipos en cada histograma fueron analizados en paralelo. Para ellos se analizaron un número mínimo de 10 discos por cada genotipo. Todos los datos fueron representados mediante el software estadístico Prism 7.0 (Graphpad).

## **2.3 Cuantificación del tamaño tumoral (Ratio D/T)**

Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD] se realizó la medición tanto del área total del disco (T) como del área dorsal (D). La media entre ambas denominado Ratio D/T se realizó dividiendo la región Dorsal por la Total para todos los genotipos y su significancia se testó estadísticamente por el t-test. Para ellos se analizaron un número mínimo de 10 discos por cada genotipo. En cada



caso la medición fue realizada enfrentando cada situación con un control tumoral.

## **2.4 Cuantificación de la invasividad celular**

Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD] se realizó la cuantificación del número de células del compartimento correspondiente al promotor apterous (ap>) consideradas células migratorias. Se consideraron migratorias aquellas células que habían abandonado el compartimento de origen y no mantenían contacto con el mismo y, a su vez se encontraban en la región ventral de los discos. El seguimiento de dichas células se realizó mediante la proteína fluorescente MyrTomato, que hizo que pudieran seguirse sin necesidad de un tratamiento inmunohistoquímico específico. A su vez se realizó la medición del compartimento Dorsal (D) de cada disco. Para ellos se analizaron un número mínimo de 10 discos por cada genotipo. La invasividad celular se normalizó en cada situación dividiendo el número de células migratorias de cada disco, por el área dorsal del mismo y se realizó el análisis estadístico mediante el t-test.

## **2.5 Cuantificación de la muerte celular por TUNEL**

La muerte celular fue monitorizada mediante la marcación por inmunohistoquímica con TUNEL de los discos. Se realizaron imágenes de los planos basales positivos para la marcación por TUNEL midiendo el área positiva correspondiente. Dicho valor fue normalizado por el área Dorsal de cada disco. Para cada estudio se realizó la medición de al menos 10 discos de cada genotipo y su significancia fue medida por el análisis t-test.

## **2.6 Cuantificación de la intensidad de los distintos sensores**

La intensidad de los distintos sensores fue monitorizada mediante la marcación por inmunohistoquímica con los anticuerpos correspondientes. Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD] se cuantificaron las imágenes de los planos basales positivos para la marcación midiendo en el área dorsal correspondiente. Dicho valor fue normalizado por el área Dorsal de cada disco. Para cada estudio se realizó la medición de al menos 10 discos de cada genotipo y su significancia fue medida por el análisis t-test.

## **2.7 Cuantificación de las poblaciones celulares o número de células apoptóticas**

Mediante el uso del software Fiji [National Institute of Health (NIH) Bethesda, MD] se realizó la cuantificación del número de células del compartimento correspondiente al promotor *apterous* (*ap>*) consideradas células migratorias. Se consideraron migratorias aquellas células que habían abandonado el compartimento de origen y no mantenían contacto con el mismo y, a su vez se encontraban en la región ventral de los discos. El seguimiento de dichas células se realizó mediante la proteína fluorescente MyrTomato. Tras ello se fue analizando una por una cada célula determinando para qué sensores eran positivas cada una. Para ellos se analizaron un número mínimo de 10 discos por cada genotipo. Una vez obtenidas el número de célula positivas para cada sensor se realizó el porcentaje respecto al número total de células.

# ÍNDICE DE FIGURAS



## **Introducción:**

<b>Figura 1.</b>	Incidencia de cánceres en España .....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b>	Sellos distintivos del cáncer según Hanahan y Weinberg .....	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b>	Microambiente tumoral .....	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b>	Aneuploidía y carcinogénesis .....	<b>22</b>
<b>Figura 5A.</b>	Prometafase con los genes SAC activos .....	<b>24</b>
<b>Figura 5B.</b>	Metafase-Anafase con los genes SAC apagados .....	<b>24</b>
<b>Figura 6A.</b>	Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 6B.</b>	Disco imaginal dispuesto en orientación lateral	<b>26</b>
<b>Figura 6C.</b>	Disco imaginal dispuesto en orientación frontal	<b>26</b>
<b>Figura 6D-E.</b>	Sistema UAS/GAL4 .....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b>	Acumulación de MMP1 en tejidos <i>CIN p35</i> .....	<b>29</b>
<b>Figura 8.</b>	Inducción de migración celular en tejidos <i>CIN p35</i> .....	<b>30</b>
<b>Figura 9.</b>	Conformaciones de células migrantes en tejidos <i>CIN p35</i> .....	<b>31</b>
<b>Figura 10.</b>	Etapas de la apoptosis .....	<b>33</b>
<b>Figura 11.</b>	Interacción de las proteínas proapoptóticas HID, GRIM y RPR .....	<b>38</b>
<b>Figura 12.</b>	Estructura de las 7 caspasas caracterizadas en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 13.</b>	Esquema de activación de las caspasas .....	<b>42</b>
<b>Figura 14.</b>	Interacciones de DIAP1 .....	<b>43</b>
<b>Figura 15.</b>	Modelo migrante de inestabilidad cromosómica	<b>47</b>

<b>Figura 16.</b>	Bucle de activación entre JNK y vía apoptótica	<b>49</b>
<b>Figura 17.</b>	Vía de JNK.....	<b>50</b>
<b>Figura 18.</b>	Interacción de las caspasas con la membrana mitocondrial .....	<b>54</b>
<b>Figura 19.</b>	Inflamación y carcinogénesis.....	<b>56</b>
<b>Figura 20.</b>	Vía de JAK/STAT .....	<b>57</b>
<b>Figura 21</b>	Modelo de generación de filopodios .....	<b>58</b>

### **Resultados:**

<b>Figura 22.</b>	Esquema temporal del modelo de estudio <i>CIN</i> <i>p35</i> .....	<b>67</b>
<b>Figura 23A.</b>	Incremento temporal de la invasividad .....	<b>68</b>
<b>Figura 23B.</b>	Invasividad independiente de crecimiento.....	<b>68</b>
<b>Figura 24.</b>	Agrupaciones migratorias .....	<b>69</b>
<b>Figura 25A-B.</b>	Patrón de expresión del gen pro-apoptótico <i>hid</i>	<b>70</b>
<b>Figura 25C-D.</b>	Patrón de expresión del gen pro-apoptótico <i>rpr</i> .	<b>70</b>
<b>Figura 26 A-B.</b>	Expresión temporal <i>hid</i> y <i>rpr</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 27A-A'.</b>	Genes proapoptóticos en invasividad .....	<b>72</b>
<b>Figura 27B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de los genes proapoptóticos .....	<b>72</b>
<b>Figura 28A-A'.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de genes proapoptóticos .....	<b>74</b>
<b>Figura 28B.</b>	Genes proapoptóticos y picnosis nuclear .....	<b>74</b>
<b>Figura 29.</b>	Genes proapoptóticos en invasividad en tejidos <i>CIN</i> .....	<b>75</b>
<b>Figura 30A-A'.</b>	Caspasas en invasividad.....	<b>77</b>

<b>Figura 30B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral por las caspasas .....	<b>77</b>
<b>Figura 31A-A'.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de las caspasas	<b>78</b>
<b>Figura 31B.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de DRONC.....	<b>78</b>
<b>Figura 31C.</b>	Caspasas y picnosis nuclear.....	<b>78</b>
<b>Figura 32A-A'.</b>	Caspasas efectoras en invasividad en tejidos CIN .....	<b>79</b>
<b>Figura 32B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de las caspasas efectoras en tejidos CIN .....	<b>79</b>
<b>Figura 33A-A'.</b>	Incremento invasivo por la sobreexpresión de las caspasas.....	<b>81</b>
<b>Figura 33B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de la sobreexpresión de las caspasas.....	<b>81</b>
<b>Figura 34.</b>	Picnosis celular ante la sobreexpresión de las caspasas.....	<b>82</b>
<b>Figura 35.</b>	cDCP1 ante la sobreexpresión de las caspasas .....	<b>82</b>
<b>Figura 36.</b>	cDCP1 en células migratorias.....	<b>83</b>
<b>Figura 37A-A'.</b>	TUNEL de la población migrante.....	<b>84</b>
<b>Figura 38A-A'.</b>	Colocalización TUNEL y sensor GC3Ai.....	<b>86</b>
<b>Figura 39A-A'.</b>	DUOX y MYO1D en invasividad .....	<b>87</b>
<b>Figura 39B-C.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de DUOX y MYO1D.....	<b>87</b>
<b>Figura 40A-A'.</b>	DREDD en invasividad.....	<b>87</b>
<b>Figura 40B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de DREDD.....	<b>88</b>
<b>Figura 41A-A'.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de DREDD.....	<b>89</b>

<b>Figura 42A-A'.</b>	Poblaciones migratorias .....	<b>91</b>
<b>Figura 43A-A'.</b>	Población migratoria PUC .....	<b>92</b>
<b>Figura 44A-A'.</b>	Bloqueo GC3Ai por <i>bskDN</i> . .....	<b>93</b>
<b>Figura 44B-B'.</b>	Bloqueo GC3Ai por <i>miRHG</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 45A-A'.</b>	Bloqueo de <i>hid</i> por <i>bskDN</i> .....	<b>94</b>
<b>Figura 46A.</b>	QPRC de <i>hid</i> al bloquear JNK.....	<b>95</b>
<b>Figura 46B.</b>	QPRC de <i>rpr</i> al bloquear JNK .....	<b>95</b>
<b>Figura 47.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de JNK en tejidos CIN .....	<b>96</b>
<b>Figura 48A-B.</b>	Rescate de la picnosis nuclear por <i>bskDN</i> .....	<b>96</b>
<b>Figura 49.</b>	Poblaciones migratorias Dp53.....	<b>98</b>
<b>Figura 50A-A'.</b>	Dp53 en invasividad.....	<b>99</b>
<b>Figura 50B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de Dp53.....	<b>98</b>
<b>Figura 51A-A'.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de Dp53 en tejidos CIN .....	<b>100</b>
<b>Figura 52A-B.</b>	Fragmentación mitocondrial en células migratorias .....	<b>101</b>
<b>Figura 53A-A'.</b>	DRP1 en invasividad .....	<b>101</b>
<b>Figura 53B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de DRP1 .....	<b>102</b>
<b>Figura 54A-A'.</b>	E2F en invasividad.....	<b>103</b>
<b>Figura 55A-A'.</b>	Cyc E en invasividad .....	<b>104</b>
<b>Figura 56A.</b>	Arresto en G2 de las células migratorias .....	<b>105</b>
<b>Figura 56B.</b>	Sistema Fly-FUCCI .....	<b>105</b>
<b>Figura 57.</b>	Poblaciones celulares STAT GFP .....	<b>107</b>
<b>Figura 58A-A'.</b>	JAK/STAT en migración .....	<b>107</b>
<b>Figura 58B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de JAK/STAT...	<b>107</b>



<b>Figura 59.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de JAK/STAT..	<b>109</b>
<b>Figura 60A.</b>	Sobreexpresión de HOP en invasividad.....	<b>110</b>
<b>Figura 60B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de sobreexpresar HOP.....	<b>110</b>
<b>Figura 61.</b>	HOP inductor de muerte.....	<b>111</b>
<b>Figura 62.</b>	QPCR al bloquear JAK/STAT.....	<b>111</b>
<b>Figura 63A-A'.</b>	Reducción de <i>hid</i> al bloquear JAK/STAT.....	<b>112</b>
<b>Figura 64A-A'.</b>	Reducción de GC3Ai al bloquear JAK/STAT...	<b>112</b>
<b>Figura 65A.</b>	Tratamiento con Ruxolitinib en invasividad .....	<b>113</b>
<b>Figura 65B.</b>	Efecto en crecimiento tumoral del tratamiento con Ruxolitinib.....	<b>113</b>
<b>Figura 66.</b>	Reducción de GC3Ai ante el tratamiento con Ruxolitinib.....	<b>114</b>
<b>Figura 67A-A'.</b>	Población migratoria UPD3 .....	<b>117</b>
<b>Figura 68A.</b>	UPDs en invasividad .....	<b>118</b>
<b>Figura 68B-C.</b>	Efecto en crecimiento tumoral de los UPDs.....	<b>118</b>
<b>Figura 69.</b>	Muerte celular ante el bloqueo de los UPD.....	<b>119</b>
<b>Figura 70.</b>	UPD3 inductor de muerte.....	<b>120</b>
<b>Figura 71A-A'.</b>	Actividad de JNK al bloquear JAK/STAT .....	<b>121</b>
<b>Figura 72A-A'.</b>	Actividad de JAK/STAT al bloquear JNK .....	<b>122</b>
<b>Figura 73A-A'.</b>	Nivel de activación de JNK durante el tiempo.	<b>123</b>
<b>Figura 73B-B'.</b>	Nivel de activación de JAK/STAT durante el tiempo.....	<b>123</b>
<b>Figura 74.</b>	Evolución temporal de las poblaciones celulares .....	<b>124</b>

**Discusión:**

<b>Figura 75.</b>	Modelo apoptótico DUOX-MYO1D .....	<b>133</b>
<b>Figura 76.</b>	JNK en invasividad.....	<b>135</b>
<b>Figura 77.</b>	Efectos sistémicos de los tumores CIN .....	<b>138</b>
<b>Figura 78.</b>	Conformaciones celulares en las vías de JNK y de caspasas.....	<b>140</b>
<b>Figura 79</b>	Modelo final .....	<b>142</b>

## **BIBLIOGRAFÍA**



Abdelwahid, E., T. Yokokura, R. J. Krieser, S. Balasundaram, W. H. Fowle and K. White (2007). "Mitochondrial Disruption in Drosophila Apoptosis." Developmental Cell **12**(5): 793-806.

Akagawa, H., Y. Hara, Y. Togane, K. Iwabuchi, T. Hiraoka and H. Tsujimura (2015). "The role of the effector caspases drICE and dcp-1 for cell death and corpse clearance in the developing optic lobe in Drosophila." Developmental Biology **404**(2): 61-75.

Amcheslavsky, A., S. Wang, C. E. Fogarty, J. L. Lindblad, Y. Fan and A. Bergmann (2018). "Plasma Membrane Localization of Apoptotic Caspases for Non-apoptotic Functions." Dev Cell **45**(4): 450-464.e453.

Amcheslavsky, A., S. Wang, C. E. Fogarty, J. L. Lindblad, Y. Fan and A. Bergmann (2018). "Plasma Membrane Localization of Apoptotic Caspases for Non-apoptotic Functions." Developmental Cell **45**(4): 450-464.e453.

Bader, M. and H. Steller (2009). "Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system." Current opinion in cell biology **21**(6): 878-884.

Banerjee, S., A. Biehl, M. Gadina, S. Hasni and D. M. Schwartz (2017). "JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects." Drugs **77**(5): 521-546.

Barrio, L. and M. Milán (2017). "Boundary Dpp promotes growth of medial and lateral regions of the Drosophila wing." Elife **6**.

Benhra, N., L. Barrio, M. Muzzopappa and M. Milán (2018). "Chromosomal Instability Induces Cellular Invasion in Epithelial Tissues." Developmental Cell **47**(2): 161-174.e164.

Bergmann, A. (2010). "The role of ubiquitylation for the control of cell death in Drosophila." Cell death and differentiation **17**(1): 61-67.

Bergmann, A., M. Tugentman, B. Z. Shilo and H. Steller (2002). "Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling." Dev Cell **2**(2): 159-170.

Borensztein, A., E. Boissoneau, G. Fernandez, F. Agnès and A.-M. Pret (2013). "JAK/STAT autocontrol of ligand-producing cell number through apoptosis." Development **140**(1): 195-204.

Boveri, T. (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena, Gustav Fischer.

Brand, A. H. and E.-L. Dormand (1995). "The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the *Drosophila* nervous system." Current Opinion in Neurobiology **5**(5): 572-578.

Brodsky, M. H., W. Nordstrom, G. Tsang, E. Kwan, G. M. Rubin and J. M. Abrams (2000). "*Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus." Cell **101**(1): 103-113.

Brumby, A. M. and H. E. Richardson (2005). "Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways." Nat Rev Cancer **5**(8): 626-639.

Carmi, Y., S. Dotan, P. Rider, I. Kaplanov, M. R. White, R. Baron, S. Abutbul, M. Huszar, C. A. Dinarello, R. N. Apte and E. Voronov (2013). "The Role of IL-1 $\beta$  in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response." The Journal of Immunology **190**(7): 3500-3509.

Clavier, A., A. Rincheval-Arnold, J. Colin, B. Mignotte and I. Guénel (2016). "Apoptosis in *Drosophila*: which role for mitochondria?" Apoptosis **21**(3): 239-251.

Clemente-Ruiz, M., J. M. Murillo-Maldonado, N. Benhra, L. Barrio, L. Pérez, G. Quiroga, A. R. Nebreda and M. Milán (2016). "Gene Dosage Imbalance Contributes to Chromosomal Instability-Induced Tumorigenesis." Dev Cell **36**(3): 290-302.

Cosolo, A., J. Jaiswal, G. Csordás, I. Grass, M. Uhlirova and A. K. Classen (2019). "JNK-dependent cell cycle stalling in G2 promotes survival and senescence-like phenotypes in tissue stress." Elife **8**.

Cotran, R. S., V. Kumar, T. Collins and S. L. Robbins (1999). Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia, Saunders.

Chai, J. and Y. Shi (2014). "Apoptosome and inflammasome: conserved machineries for caspase activation." National Science Review **1**(1): 101-118.

Charles Jay, M. and P. Eric (2009). "Targeting JAK/STAT Signaling Pathway in Inflammatory Diseases." Current Signal Transduction Therapy **4**(3): 201-221.

Chen, Z., C. Zhang, M. Zhang, B. Li, Y. Niu, L. Chen, J. Yang, S. Lu, J. Gao and L. Shen (2019). "Chromosomal instability of circulating tumor DNA reflect therapeutic responses in advanced gastric cancer." Cell Death & Disease **10**(10): 697.

D'Brot, A., P. Chen, M. Vaishnav, S. Yuan, C. W. Akey and J. M. Abrams (2013). "Tango7 directs cellular remodeling by the Drosophila apoptosome." Genes & development **27**(15): 1650-1655.

Dekanty, A., L. Barrio, M. Muzzopappa, H. Auer and M. Milán (2012). "Aneuploidy-induced delaminating cells drive tumorigenesis in Drosophila epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(50): 20549-20554.

Denecker, G., D. Vercaemmen, W. Declercq and P. Vandenabeele (2001). "Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **58**(3): 356-370.

DeVorkin, L., N. E. Go, Y.-C. C. Hou, A. Moradian, G. B. Morin and S. M. Gorski (2014). "The Drosophila effector caspase Dcp-1 regulates mitochondrial dynamics and autophagic flux via SesB." Journal of Cell Biology **205**(4): 477-492.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol **35**(4): 495-516.

Elrod-Erickson, M., S. Mishra and D. Schneider (2000). "Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*." Current Biology **10**(13): 781-784.

Elliott, D. A. and A. H. Brand (2008). The GAL4 System. Drosophila: Methods and Protocols. C. Dahmann. Totowa, NJ, Humana Press: 79-95.

Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu and S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.

Enomoto, M., D. Takemoto and T. Igaki (2021). "Interaction between Ras and Src clones causes interdependent tumor malignancy via Notch signaling in *Drosophila*." Developmental Cell **56**(15): 2223-2236.e2225.

Fan, Y. and A. Bergmann (2010). "The cleaved-Caspase-3 antibody is a marker of Caspase-9-like DRONC activity in *Drosophila*." Cell Death & Differentiation **17**(3): 534-539.

Fan, Y., T. V. Lee, D. Xu, Z. Chen, A. F. Lamblin, H. Steller and A. Bergmann (2010). "Dual roles of *Drosophila* p53 in cell death and cell differentiation." Cell death and differentiation **17**(6): 912-921.

Fernald, K. and M. Kurokawa (2013). "Evading apoptosis in cancer." Trends in Cell Biology **23**(12): 620-633.

Fisher, A., W. Cruz, S. Zoog, C. Schneider and P. Friesen (1999). "Crystal structure of baculovirus P35: Role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition." The EMBO journal **18**: 2031-2039.

Foley, E. A. and T. M. Kapoor (2013). "Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore." Nature reviews. Molecular cell biology **14**(1): 25-37.

Fuchs, Y. and H. Steller (2015). "Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells." Nat Rev Mol Cell Biol **16**(6): 329-344.

Fuchs, Y. and H. Steller (2015). "Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells." Nature reviews. Molecular cell biology **16**(6): 329-344.

Gao, X., T. P. Neufeld and D. Pan (2000). "*Drosophila* PTEN Regulates Cell Growth and Proliferation through PI3K-Dependent and -Independent Pathways." Developmental Biology **221**(2): 404-418.



Gerlach, S. U., T. Eichenlaub and H. Herranz (2018). "Yorkie and JNK Control Tumorigenesis in Drosophila Cells with Cytokinesis Failure." Cell Reports **23**(5): 1491-1503.

Gerlach, S. U., M. Sander, S. Song and H. Herranz (2019). "The miRNA *bantam* regulates growth and tumorigenesis by repressing the cell cycle regulator *tribbles*." Life Science Alliance **2**(4): e201900381.

Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, Inflammation, and Cancer." Cell **140**(6): 883-899.

Haining, W. N., C. Carboy-Newcomb, C. L. Wei and H. Steller (1999). "The proapoptotic function of *Drosophila* Hid is conserved in mammalian cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(9): 4936-4941.

Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." Cancer Cell **21**(3): 309-322.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hawkins, C. J., S. L. Wang and B. A. Hay (1999). "A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of *Drosophila* IAP1 as an inhibitor of the *Drosophila* caspase DCP-1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2885-2890.

Hay, B. A. (2000). "Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*." Cell Death & Differentiation **7**(11): 1045-1056.

He, Q., B. Au, M. Kulkarni, Y. Shen, K. J. Lim, J. Maimaiti, C. K. Wong, M. N. H. Luijten, H. C. Chong, E. H. Lim, G. Rancati, I. Sinha, Z. Fu, X. Wang, J. E. Connolly and K. C. Crasta (2018). "Chromosomal instability-induced senescence potentiates cell non-autonomous tumourigenic effects." Oncogenesis **7**(8): 62.

Herrera, S. C. and E. A. Bach (2019). "JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: from *Drosophila* to vertebrates." Development **146**(2).

Hietakangas, V. and S. M. Cohen (2009). "Regulation of Tissue Growth through Nutrient Sensing." Annual Review of Genetics **43**(1): 389-410.

Hingorani, S. R., L. Wang, A. S. Multani, C. Combs, T. B. Deramandt, R. H. Hruban, A. K. Rustgi, S. Chang and D. A. Tuveson (2005). "Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice." Cancer Cell **7**(5): 469-483.

Hong, B., A. P. van den Heuvel, V. V. Prabhu, S. Zhang and W. S. El-Deiry (2014). "Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities." Curr Drug Targets **15**(1): 80-89.

Hotchkiss, R. S., A. Strasser, J. E. McDunn and P. E. Swanson (2009). "Cell Death." New England Journal of Medicine **361**(16): 1570-1583.

Hsu, C. D., S. M. Adams and J. E. O'Tousa (2002). "Rpr- and hid-driven cell death in *Drosophila* photoreceptors." Vision Res **42**(4): 507-516.

Huang, H., C. J. Potter, W. Tao, D. M. Li, W. Brogiolo, E. Hafen, H. Sun and T. Xu (1999). "PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development." Development **126**(23): 5365-5372.

Igaki, T., H. Kanda, Y. Yamamoto-Goto, H. Kanuka, E. Kuranaga, T. Aigaki and M. Miura (2002). "Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway." The EMBO Journal **21**(12): 3009-3018.

Janssen, A., M. van der Burg, K. Szuhai, G. J. P. L. Kops and R. H. Medema (2011). "Chromosome Segregation Errors as a Cause of DNA Damage and Structural Chromosome Aberrations." Science **333**(6051): 1895.

Jiang, C., A.-F. J. Lamblin, H. Steller and C. S. Thummel (2000). "A Steroid-Triggered Transcriptional Hierarchy Controls Salivary Gland Cell Death during *Drosophila* Metamorphosis." Molecular Cell **5**(3): 445-455.

Joy, J., L. Barrio, C. Santos-Tapia, D. Romão, N. N. Giakoumakis, M. Clemente-Ruiz and M. Milán (2021). "Proteostasis failure and

mitochondrial dysfunction leads to aneuploidy-induced senescence." Developmental Cell **56**(14): 2043-2058.e2047.

Junttila, M. R. and F. J. de Sauvage (2013). "Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response." Nature **501**(7467): 346-354.

Kaiser, W. J., D. Vucic and L. K. Miller (1998). "The Drosophila inhibitor of apoptosis D-IAP1 suppresses cell death induced by the caspase drICE." FEBS Lett **440**(1-2): 243-248.

Kawamoto, Y., Y.-i. Nakajima and E. Kuranaga (2016). "Apoptosis in Cellular Society: Communication between Apoptotic Cells and Their Neighbors." International Journal of Molecular Sciences **17**(12): 2144.

Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics." British Journal of Cancer **26**(4): 239-257.

Khanna, P., J. S. Lee, A. Sereemasapun, H. Lee and G. H. Baeg (2018). "GRAMD1B regulates cell migration in breast cancer cells through JAK/STAT and Akt signaling." Scientific Reports **8**(1): 9511.

Kim, J. S., J. Y. Ha, S. J. Yang and J. H. Son (2018). "A Novel Non-Apoptotic Role of Procaspase-3 in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis Activators." J Cell Biochem **119**(1): 347-357.

Kondo, S., N. Senoo-Matsuda, Y. Hiromi and M. Miura (2006). "DRONC Coordinates Cell Death and Compensatory Proliferation." Molecular and Cellular Biology **26**(19): 7258-7268.

Kuai, W.-X., Q. Wang, X.-Z. Yang, Y. Zhao, R. Yu and X.-J. Tang (2012). "Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells." World journal of gastroenterology **18**(9): 979-985.

Kumar, S. (2007). "Caspase function in programmed cell death." Cell Death Differ **14**(1): 32-43.

Kumar, S. and J. Doumanis (2000). "The fly caspases." Cell Death & Differentiation **7**(11): 1039-1044.

Kuranaga, E., H. Kanuka, T. Igaki, K. Sawamoto, H. Ichijo, H. Okano and M. Miura (2002). "Reaper-mediated inhibition of DIAP1-induced DTRAF1 degradation results in activation of JNK in *Drosophila*." Nature Cell Biology **4**(9): 705-710.

Kurosaka, K., M. Takahashi, N. Watanabe and Y. Kobayashi (2003). "Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages." The Journal of Immunology **171**(9): 4672-4679.

La Fortezza, M., M. Schenk, A. Cosolo, A. Kolybaba, I. Grass and A.-K. Classen (2016). "JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress." Development **143**(16): 2907-2919.

La Marca, J. E. and H. E. Richardson (2020). "Two-Faced: Roles of JNK Signalling During Tumourigenesis in the *Drosophila* Model." Frontiers in Cell and Developmental Biology **8**(42).

Ladds, M. J. G. W. and S. Laín (2019). "Small molecule activators of the p53 response." Journal of Molecular Cell Biology **11**(3): 245-254.

Lai, Y., Y. Shen, X.-H. Liu, Y. Zhang, Y. Zeng and Y.-F. Liu (2011). "Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway." International journal of biological sciences **7**(6): 782-791.

Lane, D. P. (1992). "p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-16.

Levy, D. E. (1999). "Physiological significance of STAT proteins: investigations through gene disruption in vivo." Cell Mol Life Sci **55**(12): 1559-1567.

Li, F., Z. He, J. Shen, Q. Huang, W. Li, X. Liu, Y. He, F. Wolf and C. Y. Li (2010). "Apoptotic caspases regulate induction of iPSCs from human fibroblasts." Cell Stem Cell **7**(4): 508-520.

Liu, J. and A. Lin (2005). "Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword." Cell Research **15**(1): 36-42.

Mandal, S., P. Guptan, E. Owusu-Ansah and U. Banerjee (2005). "Mitochondrial Regulation of Cell Cycle Progression during Development

as Revealed by the tenured Mutation in Drosophila." Developmental Cell **9**(6): 843-854.

Marchesi, I. and L. Bagella (2013). Role of Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Protein and Its Significance in Tumor Progression and Cell Differentiation.

Martínez-Morentin, L., L. Martínez, S. Piloto, H. Yang, E. A. Schon, R. Garesse, R. Bodmer, K. Ocorr, M. Cervera and J. J. Arredondo (2015). "Cardiac deficiency of single cytochrome oxidase assembly factor scox induces p53-dependent apoptosis in a Drosophila cardiomyopathy model." Human molecular genetics **24**(13): 3608-3622.

Masuda, A. and T. Takahashi (2002). "Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis." Oncogene **21**(45): 6884-6897.

Maurya, B., S. Surabhi, R. Das, P. Pandey, A. Mukherjee and M. Mutsuddi (2021). "Maheshvara regulates JAK/STAT signaling by interacting and stabilizing hopscotch transcripts which leads to apoptosis in Drosophila melanogaster." Cell Death & Disease **12**(4): 363.

McIlwain, D. R., T. Berger and T. W. Mak (2013). "Caspase functions in cell death and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(4): a008656.

Meier, P., A. Finch and G. Evan (2000). "Apoptosis in development." Nature **407**(6805): 796-801.

Meier, P., J. Silke, S. J. Leever and G. I. Evan (2000). "The Drosophila caspase DRONC is regulated by DIAP1." Embo j **19**(4): 598-611.

Mirzoyan, Z., M. Sollazzo, M. Allocca, A. M. Valenza, D. Grifoni and P. Bellosta (2019). "Drosophila melanogaster: A Model Organism to Study Cancer." Frontiers in Genetics **10**(51).

Morais da Silva, S., T. Moutinho-Santos and C. E. Sunkel (2013). "A tumor suppressor role of the Bub3 spindle checkpoint protein after apoptosis inhibition." J Cell Biol **201**(3): 385-393.

Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." Nature Reviews Molecular Cell Biology **8**(5): 379-393.

Muzzopappa, M., L. Murcia and M. Milán (2017). "Feedback amplification loop drives malignant growth in epithelial tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(35): E7291-e7300.

Muzzopappa, M., L. Murcia and M. Milán (2017). "Feedback amplification loop drives malignant growth in epithelial tissues." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(35): E7291.

Nakamura, M., S. Ohsawa and T. Igaki (2014). "Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*." Nature Communications **5**(1): 5264.

Negrini, S., V. G. Gorgoulis and T. D. Halazonetis (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 220-228.

Norbury, C. J. and I. D. Hickson (2001). "Cellular Responses to DNA Damage." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **41**(1): 367-401.

Oropesa-Ávila, M., A. Fernández-Vega, M. de la Mata, J. G. Maraver, M. D. Cordero, D. Cotán, M. de Miguel, C. P. Calero, M. V. Paz, A. D. Pavón, M. A. Sánchez, A. P. Zaderenko, P. Ybot-González and J. A. Sánchez-Alcázar (2013). "Apoptotic microtubules delimit an active caspase free area in the cellular cortex during the execution phase of apoptosis." Cell Death & Disease **4**(3): e527-e527.

Owusu-Ansah, E., A. Yavari, S. Mandal and U. Banerjee (2008). "Distinct mitochondrial retrograde signals control the G1-S cell cycle checkpoint." Nat Genet **40**(3): 356-361.

Pastor-Pareja, J. C. and T. Xu (2013). "Dissecting Social Cell Biology and Tumors Using *Drosophila* Genetics." Annual Review of Genetics **47**(1): 51-74.

Pavelka, N., G. Rancati, J. Zhu, W. D. Bradford, A. Saraf, L. Florens, B. W. Sanderson, G. L. Hattem and R. Li (2010). "Aneuploidy confers

quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeast." Nature **468**(7321): 321-325.

Perri, F., S. Pisconti and G. Della Vittoria Scarpati (2016). "P53 mutations and cancer: a tight linkage." Ann Transl Med **4**(24): 522.

Pfau, S. J. and A. Amon (2012). "Chromosomal instability and aneuploidy in cancer: from yeast to man." EMBO Rep **13**(6): 515-527.

Pino, M. S. and D. C. Chung (2010). "The chromosomal instability pathway in colon cancer." Gastroenterology **138**(6): 2059-2072.

Puccini, J. and S. Kumar (2016). Caspases. Encyclopedia of Cell Biology. R. A. Bradshaw and P. D. Stahl. Waltham, Academic Press: 364-373.

Ranger, A. M., B. A. Malynn and S. J. Korsmeyer (2001). "Mouse models of cell death." Nature Genetics **28**(2): 113-118.

Reid, R. J. D., I. Sunjevaric, W. P. Voth, S. Ciccone, W. Du, A. E. Olsen, D. J. Stillman and R. Rothstein (2008). "Chromosome-Scale Genetic Mapping Using a Set of 16 Conditionally Stable *Saccharomyces cerevisiae* Chromosomes." Genetics **180**(4): 1799-1808.

Rodriguez, A., H. Oliver, H. Zou, P. Chen, X. Wang and J. M. Abrams (1999). "Dark is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway." Nat Cell Biol **1**(5): 272-279.

Romão, D., M. Muzzopappa, L. Barrio and M. Milán (2021). "The Upd3 cytokine couples inflammation to maturation defects in *Drosophila*." Current Biology **31**(8): 1780-1787.e1786.

Rothmeier, A. S., P. Marchese, B. G. Petrich, C. Furlan-Freguia, M. H. Ginsberg, Z. M. Ruggeri and W. Ruf (2015). "Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles." J Clin Invest **125**(4): 1471-1484.

Rudrapatna, V. A., E. Bangi and R. L. Cagan (2013). "Caspase signalling in the absence of apoptosis drives Jnk-dependent invasion." EMBO Rep **14**(2): 172-177.

Rudrapatna, V. A., E. Bangi and R. L. Cagan (2013). "Caspase signalling in the absence of apoptosis drives Jnk-dependent invasion." EMBO reports **14**(2): 172-177.

Ryoo, H. D., T. Gorenc and H. Steller (2004). "Apoptotic Cells Can Induce Compensatory Cell Proliferation through the JNK and the Wingless Signaling Pathways." Developmental Cell **7**(4): 491-501.

Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 401-410.

Sandu, C., H. D. Ryoo and H. Steller (2010). "Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death." The Journal of cell biology **190**(6): 1039-1052.

Santabárbara-Ruiz, P., J. Esteban-Collado, L. Pérez, G. Viola, J. F. Abril, M. Milán, M. Corominas and F. Serras (2019). "Ask1 and Akt act synergistically to promote ROS-dependent regeneration in Drosophila." PLoS Genet **15**(1): e1007926.

Santaguida, S. and A. Amon (2015). "Short- and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy." Nat Rev Mol Cell Biol **16**(8): 473-485.

Savill, J. and V. Fadok (2000). "Savill J, Fadok V Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature 407: 784-788." Nature **407**: 784-788.

Schott, S., A. Ambrosini, A. Barbaste, C. Benassayag, M. Gracia, A. Proag, M. Rayer, B. Monier and M. Suzanne (2017). "A fluorescent toolkit for spatiotemporal tracking of apoptotic cells in living Drosophila tissues." Development **144**(20): 3840-3846.

Sen, S. (2000). "Aneuploidy and cancer." Current Opinion in Oncology **12**(1).

Sharma, J. and J. Larkin, 3rd (2019). "Therapeutic Implication of SOCS1 Modulation in the Treatment of Autoimmunity and Cancer." Frontiers in pharmacology **10**: 324-324.



Shaulian, E., M. Schreiber, F. Piu, M. Beeche, E. F. Wagner and M. Karin (2000). "The Mammalian UV Response: c-Jun Induction Is Required for Exit from p53-Imposed Growth Arrest." Cell **103**(6): 897-908.

Sheltzer, J. M., E. M. Torres, M. J. Dunham and A. Amon (2012). "Transcriptional consequences of aneuploidy." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(31): 12644.

Shlevkov, E. and G. Morata (2012). "A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in Drosophila." Cell Death & Differentiation **19**(3): 451-460.

Silva, R. D., M. Mirkovic, L. G. Guilgur, O. S. Rathore, R. G. Martinho and R. A. Oliveira (2018). "Absence of the Spindle Assembly Checkpoint Restores Mitotic Fidelity upon Loss of Sister Chromatid Cohesion." Curr Biol **28**(17): 2837-2844.e2833.

Silver, D. L. and D. J. Montell (2001). "Paracrine Signaling through the JAK/STAT Pathway Activates Invasive Behavior of Ovarian Epithelial Cells in Drosophila." Cell **107**(7): 831-841.

Srinivasula, S. M., P. Datta, M. Kobayashi, J.-W. Wu, M. Fujioka, R. Hegde, Z. Zhang, R. Mukattash, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, J. B. Jaynes and E. S. Alnemri (2002). "<em>sickle</em>, a Novel <em>Drosophila</em> Death Gene in the <em>reaper/hid/grim</em> Region, Encodes an IAP-Inhibitory Protein." Current Biology **12**(2): 125-130.

Steller, H. (2008). "Regulation of apoptosis in Drosophila." Cell Death & Differentiation **15**(7): 1132-1138.

Takle, H. and Ø. Andersen (2007). "Caspases and apoptosis in fish." Journal of Fish Biology **71**(sc): 326-349.

Tang, F., G. Tang, J. Xiang, Q. Dai, M. R. Rosner and A. Lin (2002). "The absence of NF-kappaB-mediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation contributes to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis." Mol Cell Biol **22**(24): 8571-8579.

Tang, Y. C. and A. Amon (2013). "Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis." Cell **152**(3): 394-405.

Thomenius, M. and S. Kornbluth (2006). "Multifunctional reaper: sixty-five amino acids of fury." Cell Death & Differentiation **13**(8): 1305-1309.

Thompson, S. L. and D. A. Compton (2008). "Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells." Journal of Cell Biology **180**(4): 665-672.

Tonnus, W., C. Meyer, A. Paliege, A. Belavgeni, A. von Mässenhausen, S. R. Bornstein, C. Hugo, J. U. Becker and A. Linkermann (2019). "The pathological features of regulated necrosis." The Journal of Pathology **247**(5): 697-707.

Torres, E. M., B. R. Williams and A. Amon (2008). "Aneuploidy: Cells Losing Their Balance." Genetics **179**(2): 737-746.

Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Bar-Sagi, S. N. Jones, R. A. Flavell and R. J. Davis (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." Science **288**(5467): 870-874.

Tulotta, C., D. V. Lefley, K. Freeman, W. M. Gregory, A. M. Hanby, P. R. Heath, F. Nutter, J. M. Wilkinson, A. R. Spicer-Hadlington, X. Liu, S. M. J. Bradbury, L. Hambley, V. Cookson, G. Allocca, M. Kruithof de Julio, R. E. Coleman, J. E. Brown, I. Holen and P. D. Ottewell (2019). "Endogenous Production of IL1B by Breast Cancer Cells Drives Metastasis and Colonization of the Bone Microenvironment." Clin Cancer Res **25**(9): 2769-2782.

Turajlic, S. and C. Swanton (2016). "Metastasis as an evolutionary process." Science **352**(6282): 169-175.

Ugur, B., K. Chen and H. J. Bellen (2016). "Drosophila tools and assays for the study of human diseases." Disease Models & Mechanisms **9**(3): 235-244.

Voronov, E., D. S. Shouval, Y. Krelin, E. Cagnano, D. Benharroch, Y. Iwakura, C. A. Dinarello and R. N. Apte (2003). "IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(5): 2645-2650.

Voutsadakis, I. A. (2021). "The Landscape of Chromosome Instability in Breast Cancers and Associations with the Tumor Mutation Burden: An Analysis of Data from TCGA." Cancer Invest **39**(1): 25-38.

Vucic, D., W. J. Kaiser and L. K. Miller (1998). "Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by Drosophila proteins HID and GRIM." Molecular and cellular biology **18**(6): 3300-3309.

Wang, S. L., C. J. Hawkins, S. J. Yoo, H. A. J. Müller and B. A. Hay (1999). "The Drosophila Caspase Inhibitor DIAP1 Is Essential for Cell Survival and Is Negatively Regulated by HID." Cell **98**(4): 453-463.

Wei, W., Y. Cheng and B. Wang (2016). Chapter 27 - Cancer and Genomic Instability. Genome Stability. I. Kovalchuk and O. Kovalchuk. Boston, Academic Press: 463-486.

White, K., M. E. Grether, J. M. Abrams, L. Young, K. Farrell and H. Steller (1994). "Genetic control of programmed cell death in Drosophila." Science **264**(5159): 677-683.

Wilson, R., L. Goyal, M. Ditzel, A. Zachariou, D. A. Baker, J. Agapite, H. Steller and P. Meier (2002). "The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis." Nature Cell Biology **4**(6): 445-450.

Wodarz, A. and I. Näthke (2007). "Cell polarity in development and cancer." Nat Cell Biol **9**(9): 1016-1024.

Xu, D., Y. Wang, R. Willecke, Z. Chen, T. Ding and A. Bergmann (2006). "The effector caspases drICE and dcp-1 have partially overlapping functions in the apoptotic pathway in Drosophila." Cell Death Differ **13**(10): 1697-1706.

Xu, D., S. E. Woodfield, T. V. Lee, Y. Fan, C. Antonio and A. Bergmann (2009). "Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in Drosophila." Fly **3**(1): 78-90.

Xue, F., D. M. Janzen and D. A. Knecht (2010). "Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction." International Journal of Cell Biology **2010**: 507821.

Yang, Y., G. Jiang, P. Zhang and J. Fan (2015). "Programmed cell death and its role in inflammation." Military Medical Research **2**: 12-12.

Yee, C., W. Yang and S. Hekimi (2014). "The Intrinsic Apoptosis Pathway Mediates the Pro-Longevity Response to Mitochondrial ROS in *C. elegans*." Cell **157**(4): 897-909.

Yen, T. J. (2013). Cell Cycle: Mitotic Checkpoint. Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition). W. J. Lennarz and M. D. Lane. Waltham, Academic Press: 417-422.

Yu, C., Y. Minemoto, J. Zhang, J. Liu, F. Tang, T. N. Bui, J. Xiang and A. Lin (2004). "JNK Suppresses Apoptosis via Phosphorylation of the Proapoptotic Bcl-2 Family Protein BAD." Molecular Cell **13**(3): 329-340.

Zhang, W. and S. M. Cohen (2013). "The Hippo pathway acts via p53 and microRNAs to control proliferation and proapoptotic gene expression during tissue growth." Biol Open **2**(8): 822-828.

Zhu, J., H.-J. Tsai, M. R. Gordon and R. Li (2018). "Cellular Stress Associated with Aneuploidy." Developmental Cell **44**(4): 420-431.

Zielke, N., J. Korzelius, M. van Straaten, K. Bender, Gregor F. P. Schuhknecht, D. Dutta, J. Xiang and Bruce A. Edgar (2014). "Fly-FUCCI: A Versatile Tool for Studying Cell Proliferation in Complex Tissues." Cell Reports **7**(2): 588-598.

Ziraldó, R. and L. Ma (2015). "A mathematical model for apoptotic switch in *Drosophila*." Physical biology **12**: 056003.