

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**Estudio de la función del gen supresor de tumores  
p53 en control del  
crecimiento y homeostasis de tejidos.**

Juan Andrés Sánchez

Director de Tesis: Dr. Andrés Dekanty

Lugar de realización: Laboratorio de Biología Molecular- Instituto de  
Agrobiotecnología del Litoral - Facultad de Bioquímica y Ciencias  
Biológicas- Universidad Nacional del Litoral

**-2023-**

## *Agradecimientos*

*Al Dr. Dekanty por su dirección durante mi trabajo de tesis y sobre todo por motivarme siempre a seguir creciendo.*

*Al fly team, por el codo a codo en todo.*

*A las compañeras y compañeros del instituto por su aporte científico y humano durante esta etapa.*

*A la familia y amigos que me acompañan y apoyan siempre. Para ustedes que siempre es siempre.*

*A las instituciones que contribuyen en el crecimiento científico de nuestro país y que han permitido el desarrollo de esta tesis, CONICET, el Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y la FBCB de la Universidad Nacional del Litoral.*

## Aportes Científico-Tecnológicos

**1- Regulation and function of p53: A perspective from Drosophila studies. (Review)**

Autores: Ingaramo M. C., Sánchez J. A., Dekanty A.

Revista: Mechanisms of Development; 154:82-90

Año: Diciembre, 2018

**2- Eiger/TNF $\alpha$ -mediated Dilp8 and ROS production coordinate intra-organ growth in Drosophila.**

Autores: Sánchez J. A., Mesquita Duarte, Ingaramo M. C., Ariel F., Milán M., Dekanty A.

Revista: PLOS Genetics 15(8): e1008133

Año: Agosto, 2019

**3- Fat Body p53 Regulates Systemic Insulin Signaling and Autophagy under Nutrient Stress via Drosophila Upd2 Repression.**

Autores: Ingaramo M. C., Sánchez J. A., Perrimon N., Dekanty A.

Revista: Cell Reports, 33(4), 108321

Fecha: Octubre, 2020

## Índice

Aportes Científico-Tecnológicos.....	3
Abreviaturas y símbolos .....	6
Resumen .....	8
Abstract.....	9
<b>1. Introducción.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> como animal de experimentación.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. El primordio del ala de <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>13</b>
1.2.1. El desarrollo y crecimiento del ala se produce de manera organizada. ....	15
1.2.2. Proliferación celular durante el desarrollo del ala.....	17
1.2.3. Regulación autónoma del tamaño final del tejido.....	19
1.2.4. Regulación sistémica del crecimiento.....	19
<b>1.3. Robustez del desarrollo: el tamaño de los tejidos y sus proporciones.....</b>	<b>21</b>
1.3.1. Coordinación del crecimiento inter-tejido.....	22
1.3.2. Coordinación del crecimiento intra-tejido.....	24
1.3.3. Efectos de coordinación del crecimiento: proliferación, apoptosis y tamaño. ....	25
1.3.4. Rol de p53 y la vía apoptótica en acomodación. ....	27
<b>1.4. Rol de p53 y la vía JNK en respuesta a estrés en tejidos. ....</b>	<b>28</b>
1.4.1. p53: un factor de transcripción con múltiples respuestas.....	28
1.4.2. Activación de p53.....	29
1.4.3. La vía JNK en el camino del estrés. ....	31
1.4.4. Activación de la vía JNK.....	32
1.4.5. Mecanismos celulares de respuesta a estrés. ....	34
<b>1.5. Hipótesis del proyecto .....</b>	<b>37</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>38</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Mantenimiento y líneas de moscas .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Sistema de expresión binario GAL4-UAS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Inmunohistoquímica de discos imaginales.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1. Incorporación de BrdU y tinción de células apoptóticas con TUNEL. ....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Sincronización y medidas de tiempo de pupariación. ....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. Tratamiento con antioxidantes .....</b>	<b>41</b>
<b>3.4. Medición de alas adultas y densidad celular. ....</b>	<b>41</b>
<b>3.5. Extracción de ARN y PCR en tiempo real.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos.....</b>	<b>43</b>
<b>3.7. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). ....</b>	<b>43</b>
<b>3.8. Análisis estadístico. ....</b>	<b>44</b>
<b>3.9. Análisis del microarreglo.....</b>	<b>44</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>46</b>

<b>4.1. Estudio de coordinación del crecimiento utilizando el primordio de ala de <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>46</b>
4.1.1. Regulación del número de células mediante proliferación. ....	47
4.1.2. Regulación del número de células mediante muerte celular. ....	48
4.1.3. Cambios transcripcionales en coordinación del crecimiento y rol de p53. ....	49
4.1.4. Análisis de blancos putativos de p53 durante la coordinación del crecimiento. ....	50
<b>4.2. Estudio de <i>eiger</i> en la coordinación del tamaño del tejido. ....</b>	<b>52</b>
4.2.1. Estudio de <i>eiger</i> en la coordinación del número de células del tejido. ....	53
4.2.2. Estudio de la expresión de <i>eiger</i> en coordinación del crecimiento. ....	54
4.2.3. Expresión de <i>eiger</i> corriente abajo de p53. ....	56
4.2.4. Activación de la vía JNK en coordinación del crecimiento. ....	57
4.2.5. Rol de la vía JNK en coordinación del crecimiento. ....	58
4.2.6. P53 activa la vía JNK mediante Eiger. ....	59
<b>4.3. Efectos sistémicos de coordinación inter-tejido. ....</b>	<b>61</b>
4.3.1. Estudio de la expresión de dLIP 8 en coordinación del crecimiento. ....	62
4.3.2. Efectos de coordinación del crecimiento inter-tejido dependen de dLIP8. ....	63
4.3.3. Rol de dLIP8 en coordinación del crecimiento intra-tejido. ....	64
4.3.4. dLIP8 actúa corriente abajo de la vía JNK. ....	65
4.3.5. Xrp-1 no interviene en la regulación de dLIP8. ....	66
<b>4.4. Especies reactivas son producidas durante la coordinación del crecimiento. ....</b>	<b>68</b>
4.4.1. Especies reactivas son generadas en las células dañadas. ....	69
4.4.2. Especies reactivas regulan la proliferación no autónoma. ....	70
<b>4.5. Estudio de la activación de p53 en el contexto de coordinación del crecimiento. ....</b>	<b>71</b>
4.5.1. El factor de transcripción Hr51, ¿activador o efector de p53?.....	72
<b>4.6. Ruido biológico durante el desarrollo y robustez del crecimiento. ....</b>	<b>75</b>
4.6.1. Robustez del desarrollo en mutantes p53 y Eiger. ....	76
4.6.2. Robustez del desarrollo autónoma de tejido.....	77
<b>5. Discusión.....</b>	<b>80</b>
<b>5.1. El factor de transcripción p53 media la homeostasis tisular frente a estrés.....</b>	<b>80</b>
<b>5.2. Eiger/TNF-alpha media la activación de la vía JNK.....</b>	<b>82</b>
<b>5.3. La producción de especies reactivas del oxígeno contribuye en el control del número de células del tejido. ....</b>	<b>83</b>
<b>5.4. En condiciones de estrés los tejidos controlan su tamaño de forma sistémica mediante la acción de Dilp8.....</b>	<b>84</b>
<b>5.5. Distintos niveles de coordinación disminuyen el ruido biológico durante el desarrollo. ....</b>	<b>86</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>88</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>89</b>
<b>8. Anexo.....</b>	<b>102</b>

## Abreviaturas y símbolos

<b>3' UTR</b>	3' Untranslated region
<b>5' UTR</b>	5' Untranslated region
<b>A</b>	Anterior (compartimento)
<b>AA</b>	Aminoácidos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEL</b>	After Egg Laying, Desde la ovipuesta
<b>Ap</b>	apterous
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNi o RNAi</b>	RNA interference, ARN de interferencia
<b>Bp</b>	Base pair, pares de bases
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridine
<b>Ci</b>	Cubitus interruptus
<b>D</b>	Dorsal
<b>Dcr-1</b>	Dicer-1
<b>Diap-1</b>	<i>Drosophila</i> inhibitor of apoptosis protein-1
<b>dILP</b>	<i>Drosophila</i> insulin-like peptide
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>Dp53</b>	<i>Drosophila</i> p53
<b>dsRNA</b>	Double strand ribonucleic acid
<b>Egr</b>	Eiger
<b>En</b>	Engrailed
<b>FB</b>	Fat body, cuerpo graso
<b>F.C.</b>	Fold Change, Niveles de cambio
<b>FOXO</b>	Forkhead Box O
<b>FRT</b>	Filippase recognition target, sitio de reconocimiento de la flipasa
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>GO</b>	Gene Ontology, Ontología de genes
<b>gr</b>	gramos
<b>Hh</b>	Hedgehog
<b>Hid</b>	Head involution defective
<b>hs</b>	horas
<b>HS</b>	Shock térmico (Heat Shock)
<b>IIS</b>	Insulin/Insulin-growth factor (IGF) Signaling
<b>IPCs</b>	Insulin-Producing Cells, células productoras de insulina
<b>IR</b>	Radiación ionizante (Ionizing radiation)
<b>JNK</b>	Jun N-terminal Kinase
<b>KO</b>	Knock-out
<b>L1</b>	Estadio larvario 1
<b>L2</b>	Estadio larvario 2
<b>L3</b>	Estadio larvario 3
<b>miRNA/miR</b>	Micro ARN
<b>mmp1</b>	Metaloproteasa de matriz 1 (matrix metalloprotease-1)
<b>mRNA o ARNm</b>	ARN mensajero (Messenger Ribonucleic Acid)

<b>n.s.</b>	No significativo
<b>P</b>	Posterior
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Phosphate-Buffered Saline, buffer fosfato
<b>PCD</b>	Programmed cell death
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PH3</b>	Phospho histone 3
<b>pri-miRNA</b>	Micro ARN primario
<b>Ptc</b>	Patched
<b>Puc</b>	Puckered
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno (reactive oxygen species)
<b>Rpr</b>	Reaper
<b>RT</b>	Room temperature, Temperatura ambiente
<b>RT-PCR</b>	Retrotranscripción PCR
<b>STV</b>	Starvation, hambreado
<b>TAD</b>	Transactivation domain
<b>UAS</b>	Upstream Activation Sequence
<b>V</b>	Ventral
<b>WF</b>	Well Fed, condiciones control en comida estándar
<b>β-Gal</b>	β-Galactosidasa

## Resumen

Durante el desarrollo de los organismos superiores, una serie de eventos complejos y coordinados determinan el tamaño y la forma adecuada de los tejidos para que cumplan correctamente sus funciones. Evidenciar los mecanismos encargados de mantener las relaciones de proporcionalidad de los individuos ha sido un reto de la biología del desarrollo y un área de constante estudio. Recientemente se ha demostrado que frente a un estrés durante el desarrollo, se activa un mecanismo de homeostasis encargado de mantener la simetría del ala de *Drosophila melanogaster*. Este mecanismo implica la activación de p53 en las células estresadas, necesario para coordinar una respuesta en las células sanas del mismo tejido mediante fenotipos descritos como “acomodación” del crecimiento. El estudio de p53 en este contexto resulta clave para comprender los mecanismos de coordinación, como también funciones no canónicas emergentes de este conservado gen supresor de tumores y por tanto es eje central del presente trabajo. En este estudio encontramos que las células afectadas generan dos tipos de señales, de corto y largo alcance, con respuestas distintivas. Para que ello ocurra se debe producir la activación de p53 y la vía JNK de forma consecutiva. Lo que dará lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), importantes para la señalización de corto alcance y controlar la proliferación de las células sanas del mismo tejido. Paralelamente, una señal de largo alcance llamada dILP8 (un péptido de tipo insulina) producirá la activación de un circuito neuroendócrino que detiene el crecimiento de forma sistémica y aumenta la ventana de desarrollo del individuo. De esta manera se produce el fenotipo de “acomodación”, importante para que todas las partes del individuo sean proporcionadas entre sí. Estos hallazgos aportan al entendimiento de la coordinación del crecimiento y los efectos no autónomos que ocurren en respuesta a daño durante el desarrollo. A su vez, que el mecanismo molecular corriente abajo de p53 podría ser relevante para entender sus funciones paracrinas en distintos contextos de estrés.



## Abstract

During development of higher organisms, a series of complex and coordinated events determine the appropriate size and shape of the tissues so that they can correctly fulfill their functions. Evidencing the mechanisms responsible for maintaining the proportions of the animals has been a challenge in developmental biology and an area of constant study. It has recently been shown that upon stress during development, a homeostasis mechanism responsible for maintaining wing symmetry in *Drosophila melanogaster* is activated. This mechanism involves the activation of p53 in stressed cells, necessary to coordinate a response in healthy cells of the same tissue through phenotypes described as "accommodation" of growth. The study of p53 in this context is key to understanding the coordination mechanisms, as well as emerging non-canonical functions of this conserved tumor suppressor gene and is therefore the central axis of the present work. In this study we found that the affected cells generate two types of signals, short-range and long-range, with distinctive responses. In this regard, activation of p53 and the JNK pathway must occur consecutively. This leads to the generation of reactive oxygen species (ROS), important for short-range signaling and controlling the proliferation of healthy cells in the same tissue. While simultaneously, a long-range signal called dILP8 (an insulin-like peptide) causes the activation of a neuroendocrine circuit that stops growth systemically and increases the developmental window of the individual. In this way, the "accommodation" phenotype is produced, which is important for all parts of the individual to be in proportion to each other. These findings contribute to the understanding of growth coordination and the non-autonomous effects that occur in response to damage during development. While the molecular mechanism downstream p53 could be relevant to understand its paracrine functions in different stress contexts.

## 1. Introducción

Durante el desarrollo animal los tejidos crecen de forma controlada para generar órganos con las proporciones adecuadas para su correcto funcionamiento. Los procesos que conducen a la formación de tejidos complejos en condiciones normales han sido ampliamente estudiados en las últimas décadas. Sin embargo, resultan desconocidos los mecanismos encargados de mantener un robusto control del crecimiento aún en condiciones de estrés, permitiendo la formación de tejidos con el tamaño y la simetría adecuada. En este sentido, el estudio de las extremidades de los animales ha contribuido en gran medida en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que tienen lugar durante el desarrollo de tejidos dada su facilidad de manipulación y la posibilidad de realizar comparaciones entre los miembros contralaterales en los organismos bilaterales.

Recientemente, mediante el estudio del ala de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), un tejido sencillo y bien caracterizado, se ha logrado comprometer a los mecanismos que sostienen la simetría de los tejidos y las proporciones de los individuos (1). De forma que aparece como un tejido atractivo para estudiar las mecánicas celulares y moleculares involucradas en dicho aspecto de robustez del desarrollo. Para evidenciar este mecanismo se incurre a la afección del crecimiento de una subpoblación celular del primordio de ala y se observa cómo ello afecta a las células sanas vecinas (efectos no autónomos). Se ha demostrado que en dichas condiciones las células sanas del mismo tejido son capaces de disminuir su crecimiento y proliferación de manera que en forma conjunta el tejido se mantiene proporcionado y simétrico. Este fenotipo se ha descrito como “acomodación”, ya que hace posible observar como las distintas poblaciones celulares coordinan su crecimiento durante el desarrollo.

Durante el estudio de coordinación del crecimiento que tiene lugar en la acomodación, se ha demostrado un rol central del factor de transcripción p53. Esto evidencia por un lado la existencia de un mecanismo molecular encargado de señalar activamente las distintas poblaciones celulares que forman parte de los tejidos en desarrollo, mientras que por el otro exhibe un rol no autónomo celular de p53, ya que el mismo es activado en las células estresadas. p53 es capaz de generar de forma no autónoma celular la disminución de la proliferación, muerte celular y arresto del crecimiento. Por lo que el delicado balance de estos procesos celulares resulta clave para resolver el estrés dentro del tiempo de desarrollo apropiado.

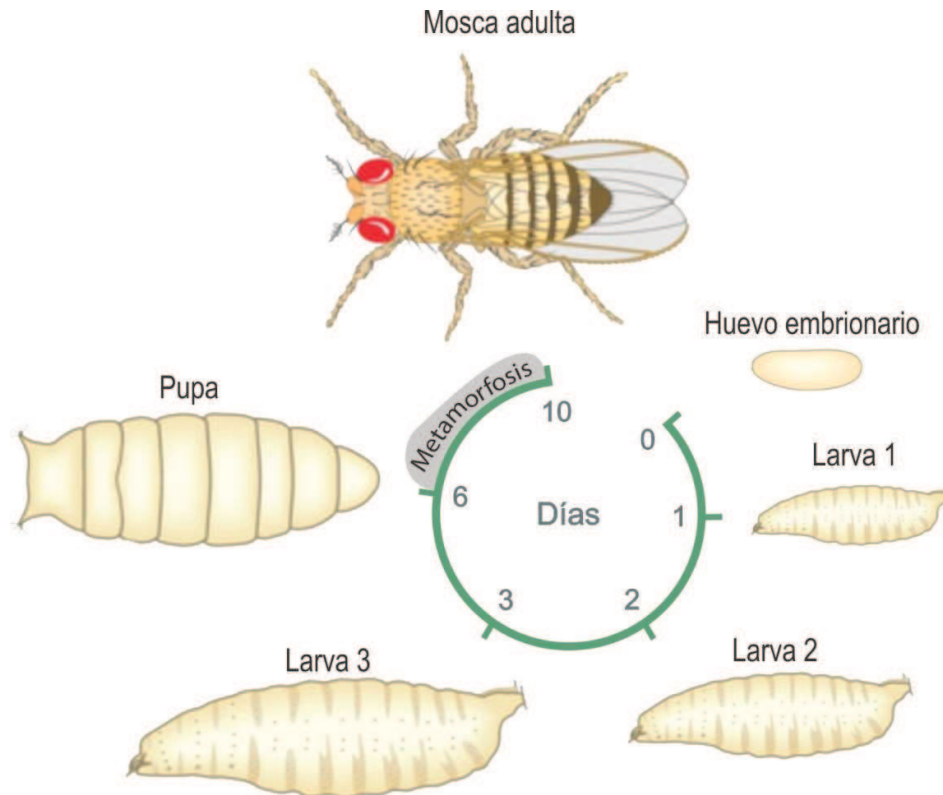
Durante este trabajo de tesis profundizamos en la función de p53 en el proceso de coordinación del crecimiento entre poblaciones celulares adyacentes durante el desarrollo del disco imaginal de ala en condiciones de “acomodación”. Para comprender el contexto biológico de estudio, introduciremos brevemente las bases fundamentales del crecimiento del disco imaginal del ala de *Drosophila melanogaster*. Posteriormente se presentará el estado del arte de las mecánicas de coordinación del crecimiento. Y por último el conocimiento acerca de p53 y la vía JNK, los cuales son relevantes para los resultados hallados en esta tesis.

### 1.1. *Drosophila melanogaster* como animal de experimentación

La mosca de la fruta ha sido ampliamente utilizada en el campo científico por sus facilidades de manipulación y mantenimiento desde que T.H. Morgan descubriera el gen *white* de *Drosophila melanogaster* hace más de 100 años (2). Desde entonces la genética de *Drosophila* ha sido exhaustivamente estudiada, lo que ha permitido grandes contribuciones en áreas como genética, herencia y biología del desarrollo. Además, las mismas presentan una anatomía con importantes similitudes a la de mamíferos: un cerebro con miles de neuronas y circuitos discretos, sistema nervioso, corazón, intestino, sistema reproductivo, tejido graso, ojos, extremidades, sistema inmune innato, etc. Por eso mismo, en la actualidad, es utilizada en la mayoría de los campos de investigación animal como envejecimiento, modelado de enfermedades humanas como Alzheimer, Parkinson y cáncer, incluso para comprender procesos biológicos complejos como los ritmos circadianos, el aprendizaje, la memoria y comportamientos como la agresión o el cortejo (3).

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo, es decir que previo a la adultez debe atravesar estadios de larva y pupa. Demora aproximadamente 24hs desde que el huevo embrionario alcanza el primer estadio larvario (L1). Los estadios larvarios son tres y toma alrededor de 24hs en pasar de L1 a L2 (segundo estadio larvario) a 25°C y el mismo tiempo en pasar de L2 a L3 (tercer estadio larvario), siendo posible identificar cada uno de ellos por cambios morfológicos y la muda de cutícula. Durante la última fase larvaria los individuos crecen durante unas 30-40 horas hasta alcanzar el estadio de pupa. Las pupas son estacionarias y en general se ubican fuera de la comida donde producen la metamorfosis y la formación de la mosca adulta, o también llamada imago. Durante la metamorfosis se lisan la mayoría de las estructuras larvarias con excepción de algunos órganos que son preservados como los discos imaginales y los histoblastos, mientras que otros sufren reestructuraciones como el sistema nervioso. Luego de los 3 a 4 días de metamorfosis eclosiona la mosca adulta; por lo que el ciclo total demora entre 8 a 10 días desde el huevo hasta que emerge el adulto (**Figura 1**).

Las moscas adultas demoran horas en volverse sexualmente activas, las hembras alcanzan su máxima producción de huevos entre los días cuatro y siete después de la eclosión, momento en el cual son capaces de generar oviposiciones de 50-70 huevos por día. Por lo que el corto periodo de desarrollo y la gran progenie que se puede obtener en poco tiempo son dos de las principales ventajas que presenta esta especie. Información detallada acerca del desarrollo de *Drosophila melanogaster* puede hallarse en el capítulo escrito por Lamoureaux y Sperber en 1995 (4). Otra ventaja que presentan estos individuos son sus costos de mantenimiento y las facilidades de manipulación (5). Debido a los bajos requerimientos nutricionales (medios con ingredientes sencillos) y la posibilidad de mantener las moscas en pequeños viales en incubadoras a temperatura constante (25°C para experimentos o 18°C para stocks). Para adormecer los adultos puede utilizarse un sistema de dióxido de carbono, lo que hace sencillo el traspaso de un vial al otro o la realización de cruces de distintas líneas de moscas. Lo que ha permitido que los laboratorios cuenten con cientos de líneas de moscas y la formación de grandes stocks o colecciones que agrupan miles de genotipos distintos como el stock Bloomington (<https://bdsc.indiana.edu/>), Kyoto (<http://www.dgrc.kit.ac.jp/>) y Viena (VDRC).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C.** La embriogénesis es seguida de tres fases larvianas, donde se produce el crecimiento de los discos imaginales. La fase larvaria 3 es la más extensa y culmina con un arresto en el crecimiento de los tejidos y el comienzo de la metamorfosis. En el estadio de pupa se produce la transformación completa de los tejidos larvianos, adaptándose la estructura adulta. La metamorfosis culmina con la eclosión de la mosca adulta, aproximadamente 10 días después de la oviposición.

Por último, la genética de *D. melanogaster* es tan extensa como sofisticada y constituye uno de los pilares fundamentales para su uso en los laboratorios. El kit de herramientas genéticas disponibles para este organismo incluye una gran variedad de líneas mutantes, sobrexpresantes, sistemas de expresión tejido específicos como el GAL4/UAS, colecciones de líneas reporteras y “*enhancer trap*”, cromosomas balanceadores, sistemas inducibles, ARNs de interferencia, mosaicos genéticos y combinaciones de todos ellos. Esto se debe a un gran esfuerzo colectivo y colaborativo de muchos años y grupos que aportan activamente al crecimiento del mismo. Más aún, el genoma completo de *D. melanogaster* ha sido secuenciado en el año 2000 al mismo tiempo que el de humanos (6). Este mismo es mucho más sencillo y compacto que el de humanos, en donde unos 13600 genes son agrupados en 3 pares de cromosomas somáticos y un par de cromosomas sexuales. Además, la información que rodea al mundo de *D. melanogaster* puede ser encontrada en bases de datos curadas de acceso gratuito entre las que se encuentran FlyBase (<http://flybase.org/>), modENCODE (<http://modencode.org/>), entre otras (3).

Las características antes expuestas son fundamentales para elegir a este organismo como animal de experimentación en este proyecto. En particular nos hemos propuesto entender la robustez que sostiene las proporcionalidades de un tejido en desarrollo por lo que hicimos uso de las alas de los individuos, dado que son uno de los tejidos más sencillos y estudiados de *Drosophila*.

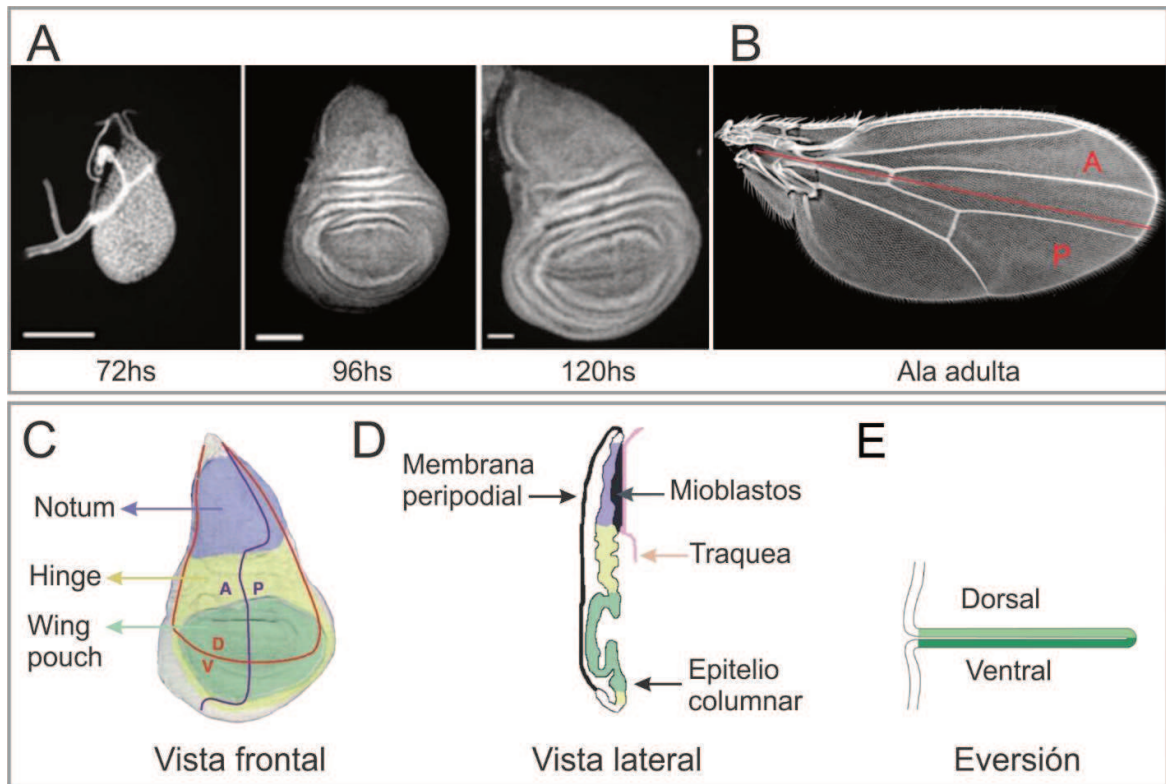
Brevemente se describirán las bases moleculares que sostienen el crecimiento del primordio del ala hasta formar su versión adulta en el imago.

## 1.2. El primordio del ala de *Drosophila melanogaster*

Las células que formaran el ala de la mosca adulta se especifican tan temprano como la embriogénesis, momento que determina el comienzo del disco imaginal de ala. Los primordios larvarios de los órganos adultos se denominan discos imaginales, debido a que permanecen en el imago. Existen 19 discos imaginales dispuestos en 9 pares bilaterales: labial, cípeo-labro, húmero, antena- ojo, ala, halterio (balancín), tres pares de discos de pata y un único disco genital. Los discos imaginales son invaginaciones de la epidermis que forman una vesícula recubierta de una membrana basal. Los mismos crecen en uno de sus lados formando estructuras plegadas, mientras que el lado opuesto permanece como una capa fina que recubre el lado plegado llamada membrana peripodial (7). Los discos imaginales se encuentran suspendidos dentro de la larva alrededor del árbol traqueal, compuestos de células indiferenciadas pero determinadas, que crecen hasta alcanzar el estadio de pupa.

El disco imaginal de ala se encuentra conformado inicialmente por unas 40-50 células que experimentan aproximadamente 9 rondas de división celular durante los estadios larvarios hasta alcanzar unas 50000 células (8) (**Figura 2.A**). Este tejido posee características comunes con otros epitelios, como una arquitectura apico-basal, con su lado apical hacia el lumen; y la presencia de una membrana peripodial escamosa que no contribuirá en las estructuras adultas. El disco en sí mismo se encuentra conformado por una única capa de células columnares, mientras que otros tipos celulares como mioblastos (precursores musculares) y la tráquea (provee de oxígeno a las células del disco) se ubican hacia el exterior del disco donde se encuentra la lámina basal.

El primordio de ala se encuentra subdividido en cuatro dominios o compartimentos del desarrollo, cuyas células poseen interacciones adhesivas distintivas entre sí. Esto genera que las células de cada compartimento no se mezclen con las de otro y por tanto la aparición de los límites o fronteras de los compartimentos (*boundaries*) (**Figura 2**). Los compartimentos anterior y posterior son especificados en los parasegmentos del embrión y por tanto se encuentran presentes en la formación inicial del disco, mientras que los compartimentos dorsal y ventral son definidos en el segundo estadio larvario (8). A su vez, y conforme avanza el desarrollo de este tejido se define el eje próximo-distal y tres regiones distintivas que darán lugar a diferentes estructuras en el adulto: la región del tórax (*notum*), la región bisagra (*hinge*) que conecta el ala con el tórax, y la región del ala propiamente dicha (*wing pouch*) (**Figura 2**).



**Figura 2. El primordio del ala de *Drosophila*.** (A) Desarrollo del disco imaginal de ala desde larva 3 temprano (72hs) hasta larva 3 tardío (120hs). Imagen adaptada de Neto-Silva *et. al.*, 2009 (9). (B) Ala adulta de *Drosophila* y delimitación de los compartimentos A (anterior) y P (posterior). (C) Disco imaginal de ala y principales regiones que lo componen, el *notum* (violeta) formará estructuras torácicas, el *hinge* (amarillo) formará la bisagra que conecta la extremidad con el cuerpo y el *wing pouch* (verde) se transformará en el ala propiamente dicha. (D) Imagen lateral del disco de ala y su conformación celular. El disco se encuentra formado por un epitelio columnar pseudo estratificado que conformará al tejido adulto, protegido por una membrana peripodial de células escamosas. Además, otras células como mioblastos y tráqueas darán lugar a tejido muscular y vías respiratorias respectivamente. Imagen adaptada de Butler *et al.*, 2003 (10). (E) Durante la metamorfosis se produce la eversión del *wing pouch* a través del eje dorso-ventral para la formación del ala adulta. A: anterior, P: posterior, D:dorsal, V: ventral.

Al finalizar los estadios larvarios, el disco imaginal del ala sufre dos rondas más de proliferación en el estadio de pupa y comienza la diferenciación. El disco cambia su disposición en un proceso llamado eversión, donde el lado apical se pliega hacia dentro en el límite de los compartimentos dorsal y ventral con la subsecuente ruptura de la membrana peripodial (11). Como resultado, el lado apical del tejido queda hacia afuera y la región del ala se expande y elonga después de 8 horas de pupariación. Durante las horas subsiguientes el ala acumula líquido entre los dominios dorsal y ventral, se produce el patrón de venación y la constricción de la región bisagra mediante mecanismos que aún son objeto de estudio. El ala posee aún una forma plegada hasta después de la eclosión del imago, momento en el que el bombeo de líquido a través de las venas produce la expansión del primordio en el ala adulta en respuesta a la hormona Bursicon.

### 1.2.1. El desarrollo y crecimiento del ala se produce de manera organizada.

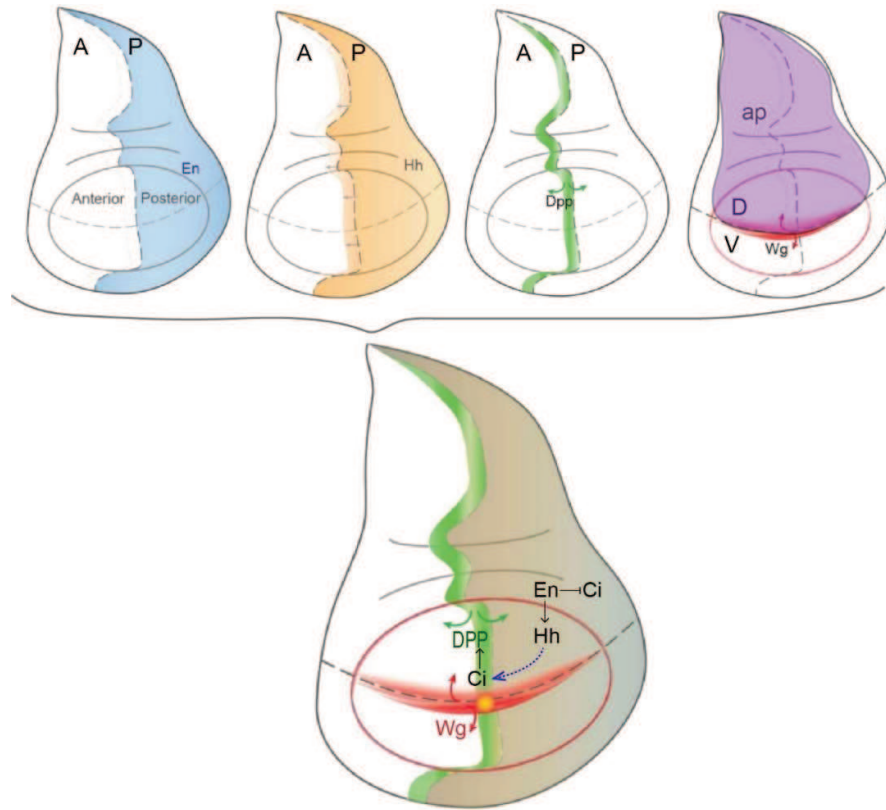
El disco imaginal de ala crece aproximadamente unas 1000 veces en número de células y volumen en solo 4 a 5 días para alcanzar un tamaño final apropiado, una estructura y forma proporcionada y una cantidad de células suficientes para producir un ala adulta funcional. Para que ello ocurra, existen organizadores del crecimiento que orquestan un programa de desarrollo efectivo a lo largo y ancho de todo el tejido mediante la señalización mediada por morfógenos.

Las investigaciones de García Bellido cerca del 1970 con análisis de linaje y mosaicos genético demostraron que el crecimiento en los tejidos se encuentra ordenado y subdividido en compartimentos (**Figura 3**). Esto significa que existen poblaciones celulares distintivas, dentro de cada tejido, que no se mezclan entre sí pero que interactúan para formar un tejido apropiado. Actualmente la formación de los compartimentos del primordio de ala se encuentra bien estudiada y guarda relación con el desarrollo de extremidades de otros organismos (12).

Los compartimentos anterior y posterior son especificados en etapas temprana del desarrollo. En el caso del compartimento posterior, *engrailed* e *invected* son los genes selectores que establecen su identidad (13). Estos mismos actúan de dos maneras, mediante la generación de una señal de corto alcance llamada Hedgehog y al mismo tiempo convierten en refractarias a las células posteriores a la señalización de Hedgehog mediante la represión del gen *cubitus interruptus* (*ci*). Las células del dominio anterior cercanas al límite del compartimento son las únicas que presentan la versión activa de *Ci* y por tanto la activación de los genes blancos de Hedgehog, entre los cuales se encuentra *decapentaplegic* (*dpp*) que codifica para una proteína de la familia BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*). La proteína Dpp es una señal de largo alcance que se secreta a lo largo del límite antero-posterior y genera un gradiente que especifica el destino celular y promueve el crecimiento del tejido (13) (**Figura 3**).

Los compartimentos dorsal y ventral se especifican en estadios más avanzados del desarrollo por la acción del gen selector *apterous* (*ap*), un factor de transcripción cuya presencia determina el dominio dorsal y cuya ausencia el ventral (13). *Apterous* induce una señalización bidireccional a lo largo del límite dorso-ventral mediada por el receptor Notch. Alrededor de 2 a 4 células a lo largo del límite de los compartimentos dorso-ventral se produce la señalización de Notch y la activación de sus genes blancos entre los que se encuentra *wingless*, que codifica para una proteína de la familia Wnt. De esta manera se produce un gradiente de la señal de Wingless que promueve el crecimiento, la proliferación y la formación de patrones del desarrollo del ala (**Figura 3**).

La presencia de dos gradientes morfogenéticos transversales en la región central del *wing pouch* permite pensar al ala como un eje de coordenadas con un posicionamiento organizado, en donde cada célula del tejido posee una única combinación de señales que determinan su comportamiento durante el desarrollo del tejido.

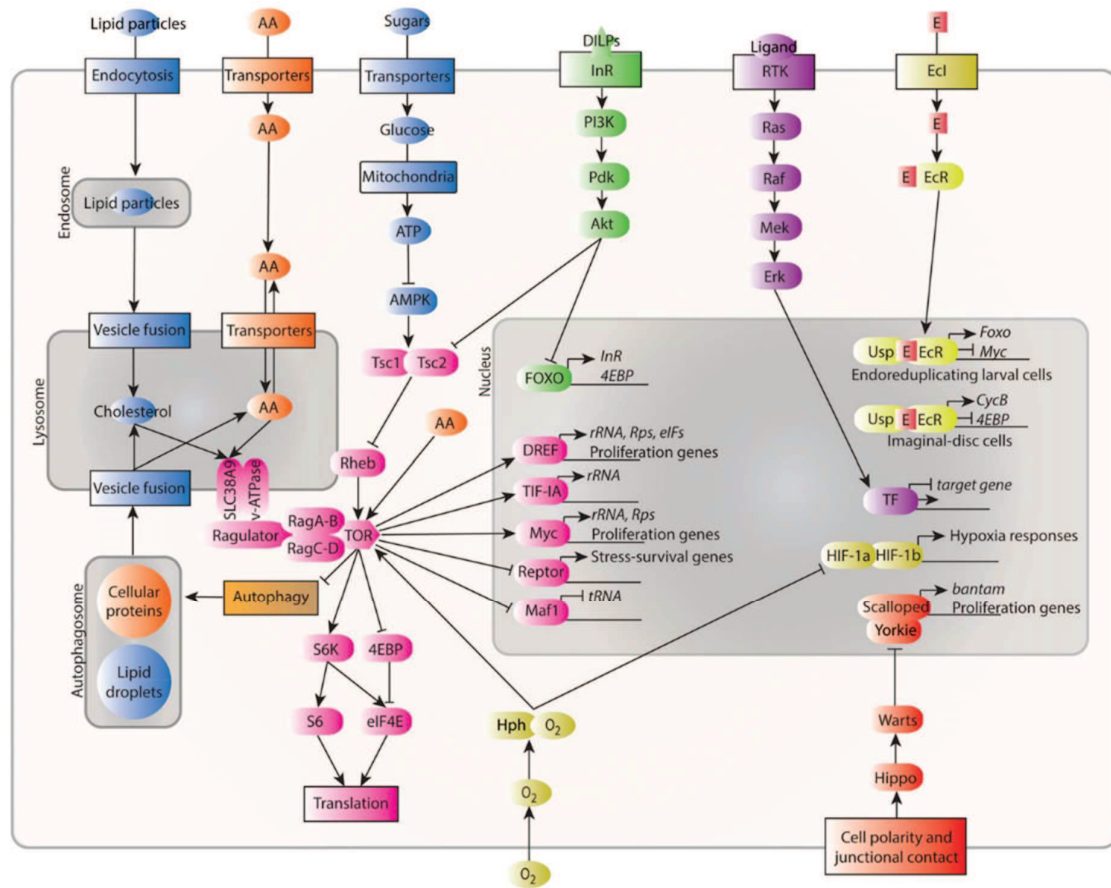


**Figura 3. Esquema del disco imaginal de ala y la formación de los compartimentos del desarrollo.** El disco imaginal de ala se encuentra dividido por los compartimentos Anterior (A)-Posterior (P) y Dorsal (D)-Ventral (V). Los genes selectores Engrailed (En) y Apterous (ap) definen los compartimentos posterior y dorsal respectivamente formando linajes celulares específicos que no se mezclan con las células de los otros compartimentos. En el límite de los compartimentos se secretan morfógenos que inducen el crecimiento y la formación de los patrones del ala, en el caso del límite A-P se secreta DPP mientras que en el límite D-V se produce Wg. Imagen adaptada de Beira *et al.*, 2016 (7).

Las señales en gradientes impactan en vías de crecimiento celular conservadas entre los metazoos como insulina/PI3 quinasa, Rheb/Tor, el receptor tirosina quinasa (RTK)/Ras, el factor de transcripción Myc, la vía JAK/STAT y la vía Hippo (14)(**Figura 4**). Estas últimas permiten a las células interpretar factores de crecimiento y/o percibir el estado nutricional de su microentorno para luego intervenir en la biosíntesis o degradación de macromoléculas. Las células que son aptas para el desarrollo del tejido y poseen un estado nutricional adecuado proliferan y crecen, mientras que aquellas que son potencialmente peligrosas o son deficientes son eliminadas del tejido por delaminación y apoptosis.

En general, el disco de ala crece en número de células (proliferación) debido a que el volumen celular no posee cambios significativos a lo largo de todo el desarrollo (15). Por lo que las vías mencionadas y los morfógenos mantienen un fino balance que impacta en genes involucrados en el ciclo celular y la proliferación.





**Figura 4. Vías de crecimiento celular.** Los mecanismos de señalización intracelular gobiernan el crecimiento celular y la proliferación. Colesterol (azul), aminoácidos (naranja), azúcares (azul) y oxígeno (amarillo) determinan el estado nutricional del entorno y estimulan el crecimiento de forma autónoma celular mediante la vía TOR (rosado). La vía de señalización Hippo/Warts (rojo) responde a señales locales de interacción célula-célula, los receptores tirosina/quinasa (RTK) (púrpura) responden a señales parácrinas y/o sistémicas. Otras señales sistémicas como los péptidos de tipo insulina (verde) y la hormona Ecdisona (amarillo) también influyen en el crecimiento celular. Imagen tomada de Texada *et al.*, 2020 (14).

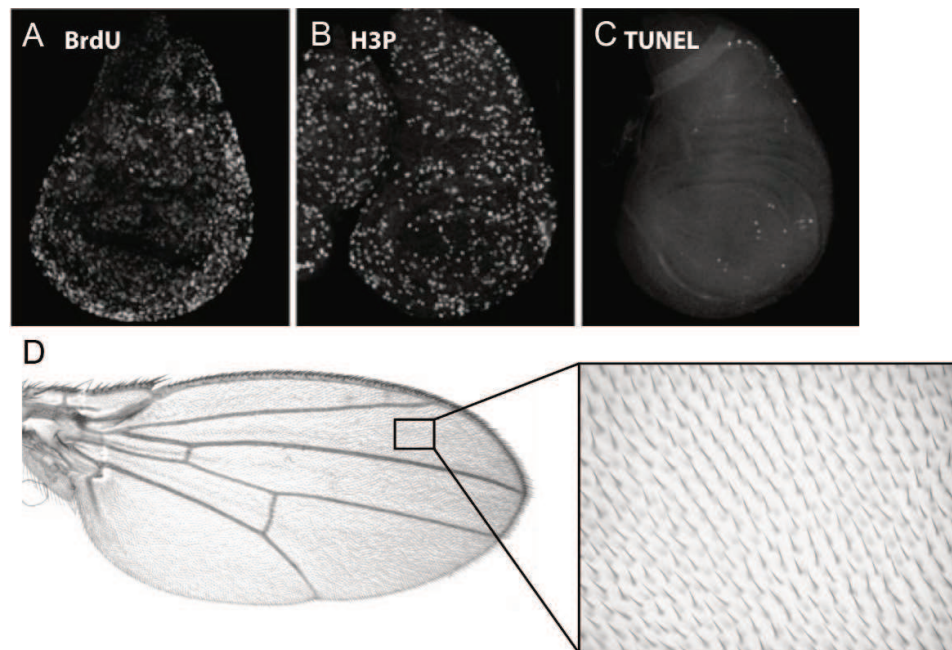
### 1.2.2. Proliferación celular durante el desarrollo del ala.

La proliferación de las células del disco es necesaria para su crecimiento y por tanto el ciclo celular es un proceso finamente regulado durante el desarrollo. Las células del disco imaginal de ala atraviesan entre 9 a 11 rondas de proliferación en un patrón que es relativamente homogéneo en todo el disco (con pequeñas variaciones locales). La duración de cada ciclo aumenta conforme el individuo crece, desde 6hs en el segundo estadio hasta 30hs hacia el final del desarrollo larvario (15). Solo después del arresto de la proliferación tiene lugar la diferenciación de las células del epitelio del ala, por lo que el proceso de proliferación debe estar perfectamente coordinado con el desarrollo del individuo. La proliferación celular puede ser observada mediante técnicas como incorporación de BrdU, se tiñen células en fase S o bien mediante la marcación de la proteína Histona 3 fosforilada (PH3) en fase M (**Figura 5.A-B**). Además, dado que cada célula del *wing pouch* formará un pelo en el ala adulta, resulta posible cuantificar densidad celular en las diferentes regiones del ala mediante el recuento de pelos (**Figura 5.D**).

Si bien la proliferación celular y el crecimiento del disco son dos procesos estrechamente relacionados, los mismos pueden ser desacoplados. Hasta la actualidad no existe un claro

consenso en como estos procesos se detienen hacia el final del desarrollo y la influencia del uno sobre el otro. El disco imaginal de ala comienza su desarrollo a partir de 20 a 40 células, aunque experimentos que generan muerte celular en etapas tempranas de desarrollo demuestran que el tejido puede alcanzar un tamaño normal incluso cuando se desarrolla a partir de 10 células (16). En esta condición el tejido posee una menor cantidad de células de mayor volumen, y evidencia el desacople entre número de células y tamaño final del tejido. Por otro lado, es posible manipular los compartimentos para que los mismos crezcan a diferentes velocidades (17). Esto último se consigue al enfrentar un compartimento con células homocigotas salvajes con uno adyacente de crecimiento lento, con células heterocigotas para genes *Minute* (*M/+*). Como resultado el compartimento de crecimiento rápido no crece más allá de su tamaño normal pese a disponer de más tiempo para su desarrollo (las larvas *M/+* crecen lentamente) (17). Esto ha permitido concluir que la tasa de proliferación tampoco determina el tamaño final del tejido. Aunque resulta incierta la comprensión de este proceso, es evidente que cada compartimento posee capacidades autónomas para crecer y proliferar sin exceder las capacidades de crecimiento del tejido.

De lo antes expuesto, encontramos que la proliferación celular es un proceso finamente regulado, necesario para el crecimiento del tejido, pero no determinante del tamaño final del disco. Escenario que permite pensar en la presencia de mecanismos de coordinación de la proliferación y del crecimiento que se encuentran estrechamente vinculados con los tiempos de desarrollo del individuo.



**Figura 5. Proliferación celular durante el crecimiento del disco de ala.** (A) Disco imaginal de ala teñido con la técnica de incorporación de BrdU. Las células marcadas se encuentran en fase S. (B) Disco de ala teñido con un anticuerpo específico para la Histona 3 fosforilada (H3P), específica de células en mitosis. (C) Células que no pueden proliferar o son defectuosas desencadenan la apoptosis, marcada con la técnica de TUNEL. Notar que existen muy pocas células que sufren apoptosis durante el crecimiento normal del disco. (D) Imagen del ala adulta de la mosca. Con un aumento en la región entre venas es posible observar los pelos que provienen de células individuales. Imágenes A, B y C adaptadas de Neto-Silva *et al.*, 2009 (9).

### 1.2.3.Regulación autónoma del tamaño final del tejido.

La hipótesis de una regulación autónoma del tamaño final proviene de experimentos de trasplantes de discos imaginales de ala cultivados en abdómenes de hembras, donde los mismos no crecen más allá de su tamaño normal sin importar la cantidad de tiempo que permanezcan (18,19). Experimentos más actuales conducen a la misma conclusión, individuos genéticamente impedidos de alcanzar la pupariación permanecen como larvas, continúan alimentándose y aumentan su tamaño sin presentar cambios en el tamaño final de los discos imaginales (20,21). Por lo que existe un control estricto sobre el crecimiento de los tejidos imaginales que tiene lugar cuando los mismos alcanzan un tamaño apropiado.

Los morfógenos y los organizadores del crecimiento propios del tejido parecerían explicar en gran medida la autonomía del tejido para crecer (ver apartado 1.2.1). En el último tiempo, además, han emergido nuevos mecanismos que permitirían explicar de forma fina como los mismos determinan el crecimiento. Un ejemplo de ello, representa la presencia de contra-gradientes producidos desde las regiones donde la señalización de los morfógenos es más débil, tal es el caso de Brinker que detiene el crecimiento del tejido desde los márgenes y posee funciones opuestas a DPP y Wg (22).

Otro mecanismo autónomo de regulación involucra a las fuerzas mecánicas y las tensiones que se producen entre las células del propio tejido. Las mismas varían de forma espacial y temporal durante el desarrollo, contribuyendo en la elasticidad o rigidez del tejido. Las fuerzas de adhesión entre las células afectan el crecimiento mediante la vía Hippo, la cual parecería ser una integradora de señales de diferente naturaleza, eje para un correcto balance entre vías metabólicas, fuerzas mecánicas y proliferación (**Figura 4**)(23).

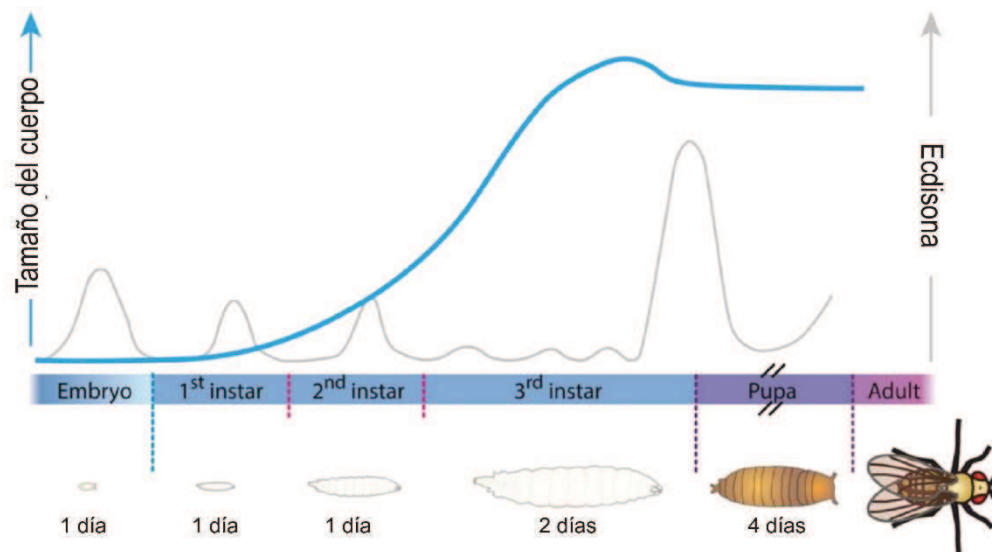
Un proceso que contribuye en el ajuste final del tejido es el reclutamiento celular (también conocido como *feed forward*), en donde las células del *wing pouch* son capaces de atraer a las células del *hinge* mediante la inducción en la proliferación de las células reclutadas por la señalización del gen *vestigial* (24). Este mecanismo contribuye en hasta 20% del tamaño final del tejido y refuerza la idea de que los tejidos poseen mecanismos propios para regular finamente su crecimiento, aunque no descarta la intervención de señales sistémicas.

### 1.2.4.Regulación sistémica del crecimiento.

*Drosophila*, al igual que los mamíferos, cuenta con un sistema neuro-endócrino que regula el crecimiento de forma sistémica y funciona como un centro de comunicación inter-tejido que se integra con el programa de desarrollo del individuo. Esto involucra principalmente la acción de glándulas secretoras de señales y circuitos neuronales específicos que interactúan entre sí en distintos niveles y cuyas vías de señalización convergen en cada tejido del organismo de manera diferencial (14,25). Entre las hormonas o señales sistémicas encontramos la hormona juvenil (JH), la hormona protoraxicotrópica (PTTH), los péptidos de tipo Insulina y la hormona esteroide Ecdisona (en su versión activa 20-E).

Las transiciones larvarias se encuentran reguladas por pulsos de inducción de la hormona Ecdisona, la cual es secretada por la glándula protorácica (una de las tres glándulas que componen

la llamada *ring gland*) (14). Ecdisona se une a un complejo receptor heterodimérico formado por EcR (Ecdysone receptor) y Usp (Ultraspiracle) lo cual promueve el crecimiento y la proliferación en bajas dosis y de forma tejida específica; o incluso puede disminuir el crecimiento en altas dosis para determinar la transición hacia la metamorfosis (**Figura 4**). Por otro lado, la glándula *corpus allatum* (cuerpo alado) que también forma parte de la *ring gland*, mantiene altas las concentraciones de la hormona juvenil durante las fases larvarias y disminuye hacia el final del estadio L3 para permitir la transición a pupa. El correcto balance entre ambas hormonas regula las transiciones del desarrollo y define puntos de control del crecimiento (**Figura 6**). La glándula productora de Ecdisona a su vez se encuentra afectada directa e indirectamente por los niveles de insulina y el estado nutricional del individuo, el fotoperíodo, el ritmo circadiano, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno; por lo que en la señalización de Ecdisona confluyen factores ambientales con los tiempos y las etapas de desarrollo del individuo (14).



**Figura 6. Regulación del crecimiento sistémica.** El crecimiento de la larva y de los discos imaginales es exponencial durante 4 días (desde el primer estadio larvario hasta alcanzar el estadio de pupa). Este crecimiento dramático implica que la larva mude dos veces de cutícula, entre los estadios (después del primer estadio y después del segundo). Imagen adaptada de Texada *et al.*, 2020 (14).

El crecimiento del disco imaginal de ala no escapa al circuito sistémico del crecimiento y por tanto se encuentra sujeto a los niveles de insulina y hormonas en circulación. En este sentido la hormona Ecdisona es capaz de regular la tasa de proliferación de las células del primordio de ala y la producción de los morfógenos Wg y Dpp que promueven el desarrollo del tejido (20). Por otro lado, estudios recientes demuestran que el morfógeno Dpp funciona como una señal endócrina que comunica a los discos imaginales con la glándula protorácica para reducir los niveles de Ecdisona sistémica (26). Por lo que las vías hormonales neuro-endócrinas revelan que existe un nivel sistémico de regulación sobre el crecimiento de los tejidos con mecanismos de retroalimentación que integra señales ambientales, comunicación entre tejidos y las diferentes etapas del desarrollo (27).

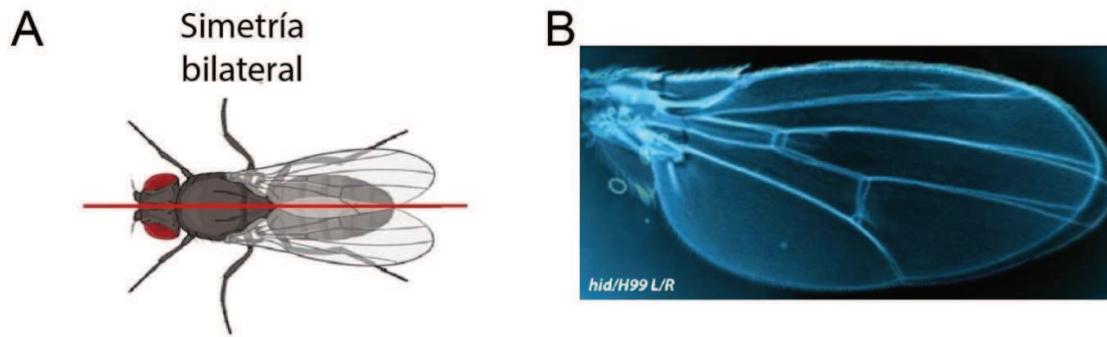
### 1.3. Robustez del desarrollo: el tamaño de los tejidos y sus proporciones.

Las proporciones entre los órganos de los individuos multicelulares son extremadamente precisas, esto se debe a que los mismos detienen su crecimiento cuando alcanzan el tamaño apropiado. Aunque resulta una pregunta abierta dentro de la biología del desarrollo entender como sucede esto, dado que existe en cada tejido una combinación única de factores intrínsecos y extrínsecos que determinan su tamaño final. Para ejemplificar esto, cuando múltiples bazoos fetales de ratón son trasplantados en un embrión cada uno de ellos crece menos que su tamaño normal, de forma que la sumatoria de todos ellos es equivalente a un único bazo, mientras que en el caso del timo, cuando múltiples timos fetales son trasplantados en un embrión los mismos crecen individualmente hasta alcanzar su tamaño normal (28).

La robustez con la que los diferentes organismos generan tejidos bien proporcionados y simétricos permite pensar en la existencia de mecanismos de coordinación del crecimiento, aunque han sido escasamente descritos por las dificultades intrínsecas que representa su estudio. En este sentido, el estudio de las extremidades de los animales ha resultado ventajoso para evidenciar efectos de coordinación dado las facilidades que implica cuantificar parámetros tales como la forma de la extremidad o también la simetría bilateral (izquierda-derecha) (29)(Figura 7.A).

Del estudio de las extremidades de vertebrados, se ha demostrado que la simetría izquierda-derecha se ve comprometida cuando se afecta los genes *R-spondin 2* y *footless* (28). Ratones mutantes para estos genes muestran defectos de crecimiento con mayor frecuencia en el lado izquierdo, por lo que se piensa que los mismos intervienen en equilibrar señales de crecimiento que provienen de fuentes ubicadas asimétricamente en el organismo. Por otro lado, ratones mutantes *Sall4* también poseen disrumpida la simetría izquierda-derecha, pero sin una preferencia de lateralidad (28).

En el caso de *Drosophila*, mayores niveles de asimetría izquierda-derecha se han encontrado en alas de individuos mutantes de *hsp90*, *hid*, *dilp8* y *lgr3*. La chaperona conservada Hsp90 se encuentra en la interfaz de múltiples vías del desarrollo y es un regulador central de la robustez del desarrollo, cuando se encuentra comprometida aparecen múltiples defectos de crecimiento entre ellos una gran asimetría bilateral (30). Por otro lado, *hid* es un gen pro-apoptótico que participa en diferentes procesos de homeostasis celular y en la eliminación de células defectuosas. Se ha descrito que los individuos mutantes *hid* o en varios genes pro-apoptóticos (mutante *H99*) poseen mayores niveles de asimetría bilateral, por lo que la regulación del tamaño final del tejido podría estar ligada al proceso apoptótico celular (31) (Figura 7.B). El péptido Dilp8 y su receptor Lgr3 forman parte de un mecanismo de comunicación entre los tejidos y el sistema neuroendocrino que coordina la secreción de Ecdisona y su sincronización con los tiempos de desarrollo es clave para mantener tejidos bien proporcionados (32–34). Por último, si bien no está claro como el número de células interviene en el tamaño final de los tejidos, experimentos de sobreexpresión de ciclina G en el disco de ala generan la formación de adultos con variaciones en la cantidad de células que conforman el ala adulta y mayores niveles de asimetría bilateral (35).



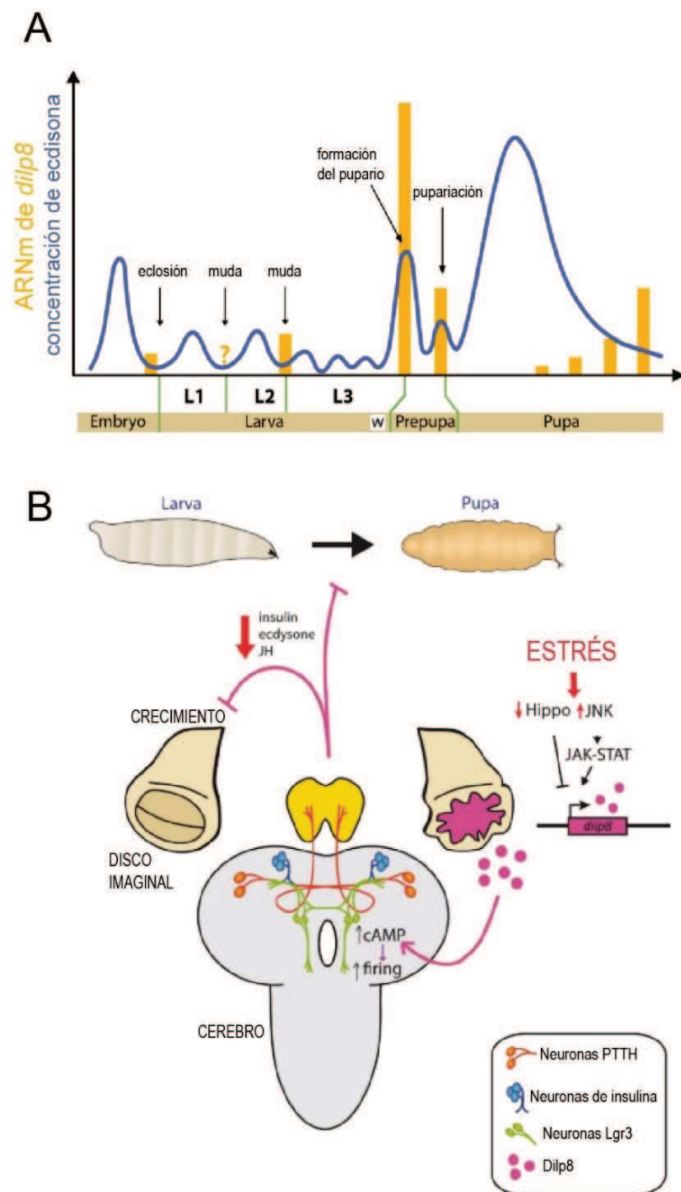
**Figura 7. Estudio de las proporciones de los individuos.** (A) Esquema de una mosca adulta donde se señala la simetría bilateral, la cual ha sido ampliamente estudiada para entender las proporciones de órganos y tejidos. En general cuanto mayores son las diferencias entre los tejidos contralaterales menor es la robustez del desarrollo. (B) Alas de individuos mutantes del gen *hid* muestran la asimetría entre ala izquierda y derecha. Adaptada de Neto-Silva *et al.*, 2009 (31).

### 1.3.1. Coordinación del crecimiento inter-tejido.

Las diferencias de tamaño entre las extremidades contralaterales pueden ser cuantificadas como grado de asimetría fluctuante (o su sigla en inglés FA) y en general es un indicador de la estabilidad del desarrollo y la coordinación inter-tejido. En *D. melanogaster* mayor FA es observada cuando se disrumpe con el circuito Dilp8 y Lgr3 que comunica los tejidos con el circuito neuroendócrino. Estudios recientes han revelado que Dilp8, un péptido de tipo insulina, se secreta desde la epidermis en etapas tempranas de la formación de la pupa para mediar efectos motrices, la secreción de pegamento y cambios morfogenéticos claves que suceden en este estadio (32). Si bien el rol de Dilp8 en condiciones normales de desarrollo recién comienza a vislumbrarse, se sabe que el mismo se induce en tiempos específicos entre las distintas etapas del desarrollo y media la comunicación entre los tejidos periféricos y las neuronas del sistema nervioso central (36) (**Figura 8.A**). Específicamente, hacia el final del desarrollo larvario las funciones de Dilp8 se encuentran finamente descritas; el mismo es lanzado a la circulación (hemolinfa) desde la epidermis de la cutícula donde viaja hasta unir a un receptor del tipo receptor de relaxina (Lgr3) en un grupo discreto de neuronas (32,34). Estas neuronas del cerebro Lgr3<sup>+</sup> pueden ser separadas en al menos dos grupos, uno de los cuales interviene en el retraso de la transición de larva a pupa (Lgr3<sup>+</sup><sup>R19B09</sup>) mientras que otro grupo de neuronas interviene en funciones neuromotoras y morfogenéticas de la pupa (Lgr3<sup>+</sup><sup>R18A01</sup>  $\cap$  <sup>R48H10</sup>). Las primeras intervienen en la inhibición de la secreción de Ecdisona de forma indirecta mediante el contacto con las neuronas PTH que inervan hasta la *ring gland*. Además, disminuyen los niveles de péptidos del tipo insulina mediante la regulación de las células productoras de insulina (o IPC en inglés, *insulin producing cells*) también ubicadas en el cerebro. De forma que en conjunto estos efectos regulan sistémicamente la etapa final de crecimiento de los tejidos.

En condiciones de estrés, cuando un tejido sufre un daño que afecta su crecimiento las células del tejido utilizan el mismo mecanismo de comunicación neuroendócrino y secretan Dilp8 a la circulación generando un retraso en la transición de larva a pupa (34,37–39) (**Figura 8.B**). En estos contextos Dilp8 mantiene bajos los niveles de Ecdisona y por tanto se interfiere con el pico de inducción necesaria para pasar al siguiente estadio de desarrollo. Este retraso en la transición larva-

pupa permitiría al tejido dañado aumentar la ventana de tiempo necesaria para su regeneración y que el mismo alcance el tamaño adecuado antes de la metamorfosis. El mecanismo por el cual Ecdisona promueve o detiene el crecimiento es aún controvertido, aunque su regulación de manera precisa en condiciones normales y bajo estrés es esencial para mantener las proporciones de los tejidos entre sí.



**Figura 8. Coordinación del crecimiento inter-tejido.** (A) Durante el desarrollo normal de *Drosophila* la hormona Ecdisona (producida en la *ring gland*) y el péptido Dilp8 (producido en tejidos periféricos) se secretan en estadios específicos para controlar el crecimiento de forma sistémica y la correcta transición entre las distintas fases. (B) Cuando un tejido percibe un estrés, se comunica con el resto de los tejidos utilizando el circuito neuro-endócrino. Los tejidos secretan Dilp8 hacia la hemolinfa, y el mismo une a su receptor Lgr3 en un grupo específicos de neuronas que regulan de forma indirecta la transición entre el estadio de larva a pupa. Imagen adaptada de Gontijo *et al.*, 2018 (36).

De forma análoga, estudios recientes en vertebrados demuestran la existencia de mecanismos que sostienen la simetría izquierda-derecha cuando se interrumpe con el crecimiento de las extremidades de forma unilateral (40). En experimentos de ratones que sobrepresan la proteína supresora del ciclo celular p21 en condrocitos (células óseas) específicamente en sus extremidades

izquierdas muestran que existe un menor crecimiento de las extremidades sin la pérdida de la simetría bilateral (40). Este efecto de arresto del crecimiento en una extremidad activa por un lado un mecanismo de hiperproliferación en la extremidad dañada, a la vez que genera una disminución en los niveles sistémicos de IGF (Insuline-like growth factor) evidenciando un mecanismo de coordinación sistémico entre la extremidad dañada y el resto del organismo. Curiosamente, la restauración de los niveles de IGF secretados por la placenta permite que los individuos mantengan su peso corporal normal sin verse afectada la simetría bilateral. Por lo que la disminución no autónoma del crecimiento en el miembro contralateral podría deberse a la existencia de redes de comunicación específicas entre ambas extremidades, aunque esto es tan solo una hipótesis (40).

### 1.3.2. Coordinación del crecimiento intra-tejido.

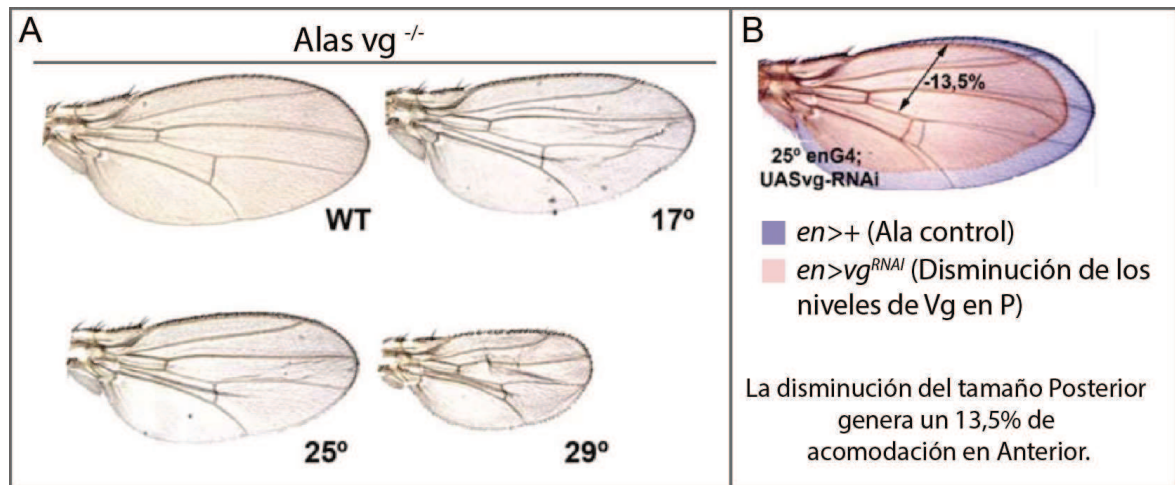
Los tejidos a su vez se encuentran conformados por poblaciones celulares distintivas, que crecen de forma independientes y por tanto deben coordinar su crecimiento para mantener un tejido proporcionado. Esta coordinación se hace evidente cuando se consigue alterar el crecimiento de una de las poblaciones celulares y se observa una respuesta en la población adyacente. El grupo de García-Bellido fue pionero en realizar observaciones de efectos de coordinación intra-tejido. Utilizando mosaicos genéticos en discos imaginales de ala encontró que clones mutantes (deficiente en *vg* o *vn*, genes de crecimiento y venación) generaban efectos de crecimiento en las células vecinas normales (41,42) (**Figura 9.A**). Este efecto fue denominado “acomodación”, ya que los clones mutantes además de tener afectada su capacidad de crecimiento generaban defectos de proliferación no autónoma en las células adyacentes. Como consecuencia, las alas disminuían su tamaño sin perder su simetría intra-tejido (relación entre los compartimentos anterior y posterior) (**Figura 9.B**).

Posteriormente mediante el estudio de apoptosis en las células del disco, se encontró que la expresión de la toxina Ricina en el compartimento posterior del ala es capaz de generar muerte en las células genéticamente afectadas del dominio posterior pero también en las células del compartimento vecino anterior (43). De la misma manera, cuando se afecta el compartimento dorsal puede observarse apoptosis en las células del dominio ventral. Por lo que los efectos de coordinación del crecimiento pueden ser evidenciados mediante la generación de daño o estrés en un grupo de células o en todo un compartimento del disco de ala. Esto involucra una señalización entre los compartimentos que expone la existencia de mecanismos de coordinación entre poblaciones celulares independientes.

De forma similar, en el desarrollo de los huesos de las extremidades de los vertebrados se producen interacciones entre las diferentes regiones organizadoras del crecimiento (12,28,29). El conjunto de células que formarán una extremidad se encuentra dividido en zonas bien definidas, entre ellas la zona de actividad de polarización (ZPA) que secreta Sonic hedgehog (Shh) y la zona de la cresta apical ectodérmica (AER) en la parte más distal que secreta factores del crecimiento fibroblásticos (Fgf) (28). Ambas zonas se retroalimentan entre sí, dado que la señalización de Shh es necesaria para mantener la secreción de los Fgfs de la región AER, mientras que Fgf es requerido para la expresión de Shh en la zona ZPA (28). Cuando el tejido carece de alguna de las



dos señales (por ejemplo, en ratones mutantes para *Shh* o *Fgf*) se genera un arresto del crecimiento general por lo que ambas son necesarias para el correcto desarrollo del tejido. Por otro lado, si se aumenta los niveles de una de las señales por ejemplo de *Shh* con esferas impregnadas, se produce la apoptosis de células de la zona ZPA para reducir la expresión de *SHH*. De forma inversa, la incisión y reducción de la zona ZPA conduce a que células que antes no eran productoras de *SHH* luego lo sean, extendiendo la zona ZPA. Por lo que es evidente que los tejidos cuentan con diferentes mecanismos de coordinación capaces de equilibrar las señales y generar estabilidad en el crecimiento de las poblaciones celulares internas.



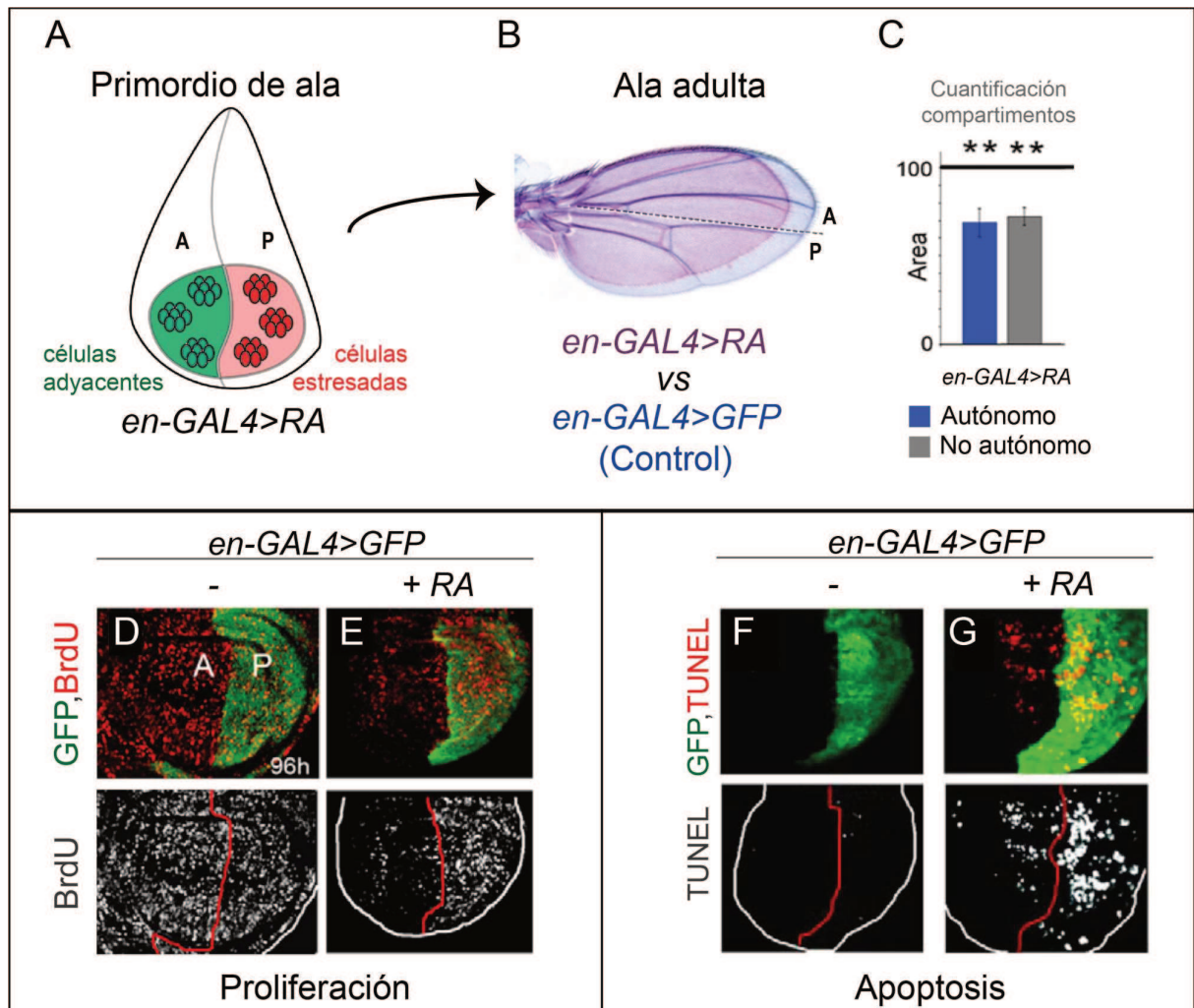
**Figura 9. Coordinación del crecimiento intra-tejido.** (A) Alas de individuos que presenta un sistema inducible por temperatura de células mutantes del gen *vg*, mayores temperaturas generan más células mutantes. Las alas donde el número de células mutantes es mayor (29°C) presenta mayores defectos de crecimiento sin embargo el tejido no pierde su proporcionalidad. (B) Las alas que presentan solo uno de los dominios afectados (inhibición de *vg* solo en el dominio posterior, *en>vg<sup>RNAi</sup>*), tampoco presentan una proporcionalidad afectada, dado que el dominio anterior reduce su tamaño para mantener la simetría. Imágenes adaptadas de Bellido, 2009 (18).

### 1.3.3. Efectos de coordinación del crecimiento: proliferación, apoptosis y tamaño.

Un estudio detallado del proceso de coordinación del crecimiento denominado como “acomodación” encontró que, al igual que lo observado por García-Bellido con *Vg* y *Ricina*, los efectos no autónomos ocurren cuando se interfiere en alguna región del ala con la vía de *Insulina*, la vía *Myc*, la vía *Hippo* o se activa de forma constitutiva *4EBP* (un inhibidor de la traducción de proteínas) (1) (Figura 10. A-C). De esta forma el crecimiento se interrumpe principalmente a nivel de la síntesis de proteínas, traducción y metabolismo celular en las células genéticamente afectadas. Estas últimas al enfrentar una dificultad para continuar su crecimiento son capaces de generar un efecto no autónomo que comunica a las células adyacentes sanas. Los efectos no autónomos se han caracterizado como disminución del crecimiento (tamaño), disminución en la tasa de proliferación y apoptosis (Figura 10. B-G).

En el contexto de acomodación la coordinación del crecimiento ocurre en todos los sentidos, es decir que es independiente del compartimento afectado. El ala no pierde su simetría cuando se afectan los dominios anterior, posterior, dorsal o regiones más pequeñas; lo que permitiría pensar

que los morfógenos no juegan un papel principal en este contexto dado que los mismos actúan unidireccionalmente. Más aún, mediante experimentos de inmunotinción de Dpp y Wg se observa que los mismos no parecen estar afectados (1). Por lo que se hace necesario pensar en vías más generales que permitan la coordinación del crecimiento en este contexto. Lo mismo sucede con los fenotipos no autónomos celulares de disminución de la tasa de proliferación y apoptosis. Un mecanismo molecular parece emerger con la evidencia de que p53, un factor de transcripción involucrado en la homeostasis de tejido, se muestra necesario para mediar los efectos de coordinación en acomodación (1) (**Figura 11. A**).



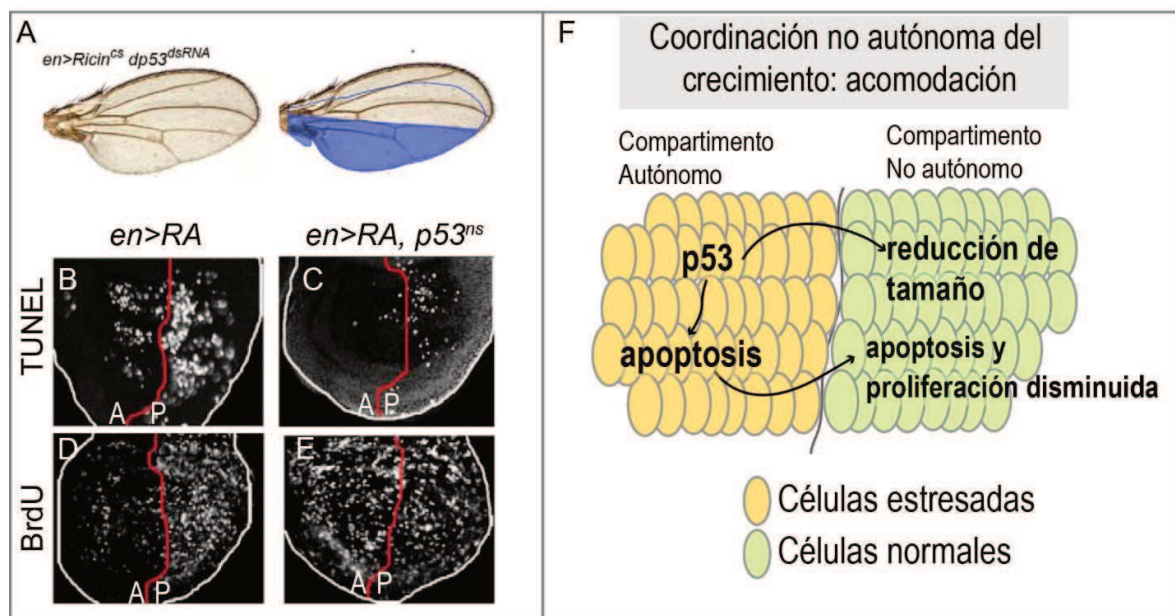
**Figura 10. Acomodación y los efectos de coordinación del crecimiento intra-tejido.** (A) Representación del primordio de ala (disco imaginal) con poblaciones celulares que crecen diferencialmente debido a la expresión de Ricina en el compartimento posterior (*en-GAL4>RA*). (B) Alas adultas de los genotipos indicados muestran que la disminución de tamaño no afecta la simetría. (C) Cuantificación de los compartimentos anterior y posterior del genotipo *en-GAL4>RA* respecto al genotipo control (*en-GAL4>GFP*). (D-E) Primordios de ala control (*en-GAL4>GFP*) y con Ricina (*en-GAL4>GFP,RA*) teñidos bajo la técnica de incorporación de BrdU muestran que los primordios afectados con Ricina presentan una disminución no autónoma en el número de células proliferativas. (F-G) Discos imaginales de ala teñidos con la técnica de TUNEL donde se puede observar gran cantidad de marca apoptótica en ambos compartimentos del primordio que expresa Ricina (*en-GAL4>GFP,RA*) en contraste con la escasa marca en el control (*en-GAL4>GFP*). Imágenes B-G tomadas y adaptadas de Mesquita *et al.*, 2010 (1).

### 1.3.4. Rol de p53 y la vía apoptótica en acomodación.

La estabilidad del desarrollo que se pone en juego en el contexto de acomodación conduce a la activación de p53 en el conjunto de células genéticamente afectadas (1). La depleción de p53 en estas células produce una disminución de la apoptosis lo cual constituye una función característica de p53 en diferentes contextos. Al mismo tiempo se observa que las células adyacentes (población no autónoma) pierden la capacidad de reducir su tamaño y el número de sus células (**Figura 11. A-E**). De forma que el tejido pierde sus condiciones de simetría y los efectos no autónomos de la coordinación que se producen en este contexto (disminución del tamaño, disminución de la tasa de proliferación y apoptosis); lo que representa funciones no autónomas de p53 poco caracterizadas hasta el momento.

Los efectos no autónomos que ocurren durante la acomodación permiten al ala mantener tanto sus proporciones como también su densidad celular. Aunque esto sucede porque el ala disminuye su tamaño y el número de células que la conforman, estos fenotipos pueden ser disociados si se bloquea la vía de caspasas (1). Experimentos previos demuestran que, ante la inhibición de la vía apoptótica durante el proceso de acomodación el tejido mantiene sus proporciones, pero no la capacidad de coordinar el número de células. Esto genera un tejido con compartimentos que poseen densidades celulares dispares. Posteriormente y mediante experimentos genéticos finos se ha demostrado que la vía apoptótica es necesaria de forma no autónoma para producir la disminución en el número de células mediante la disminución de la tasa de proliferación y la inducción la apoptosis (1). Además, mediante el uso de FACS y el marcaje de las distintas etapas del ciclo celular, ha sido posible evidenciar que las células del compartimento no autónomo no se encuentran arrestadas, sino que atraviesan el ciclo celular de forma más lenta.

Todo lo anterior indicaría que, por debajo de p53 existirían al menos dos mecanismos, uno de ellos interviene en la regulación del tamaño del tejido (independiente de caspasas) y otro controla el número de células del tejido (dependiente de caspasas) (**Figura 11. F**).



**Figura 11. La coordinación intra-tejido depende de p53.** (A) Las alas adultas se vuelven asimétricas cuando en condiciones de acomodación p53 se encuentra ausente. Notar que el dominio autónomo (marcado en azul) disminuye su tamaño mientras que el dominio anterior se muestra inalterado cuando se inhibe p53. El contorno azul, en el dominio anterior, representa un ala que responde de forma normal a los efectos de coordinación. (B) Marca de células apoptóticas (TUNEL) en condiciones de acomodación (*en>RA*). Notar que hay muerte en el dominio afectado (P), como también en el vecino (A). (C) En las mismas condiciones pero sin p53 (*en>RA,p53<sup>ns</sup>*) la muerte celular (marcada con TUNEL) se revierte considerablemente en ambos dominios. (D) Imagen de disco de ala con células en fase S, marcadas con la técnica de BrdU, en condiciones de acomodación. Notar la menor marca de proliferación que se produce en el dominio no autónomo anterior. (E) En condiciones de acomodación en ausencia de p53 (*en>RA,p53<sup>ns</sup>*), la tasa de proliferación de las células del dominio no autónomo es alta evidenciando la pérdida del fenotipo de coordinación. (F) Esquema que representa los eventos celulares y moleculares en el contexto de coordinación del crecimiento estudiado. El compartimento autónomo es afectado genéticamente de forma que se produce un detrimento de su crecimiento (células amarillas). En estas células se produce la activación de p53 y se desencadena la apoptosis. Estos eventos son necesarios para que el grupo de células vecinas (células verdes) disminuyan su crecimiento mediante tres eventos no autónomos (menor tamaño del compartimento, apoptosis y disminución en la tasa de proliferación). La combinación de todos estos eventos permite formar un ala bien proporcionada y simétrica. Imágenes A-E tomadas y adaptadas de Mesquita *et al.* 2010 (1).

#### 1.4. Rol de p53 y la vía JNK en respuesta a estrés en tejidos.

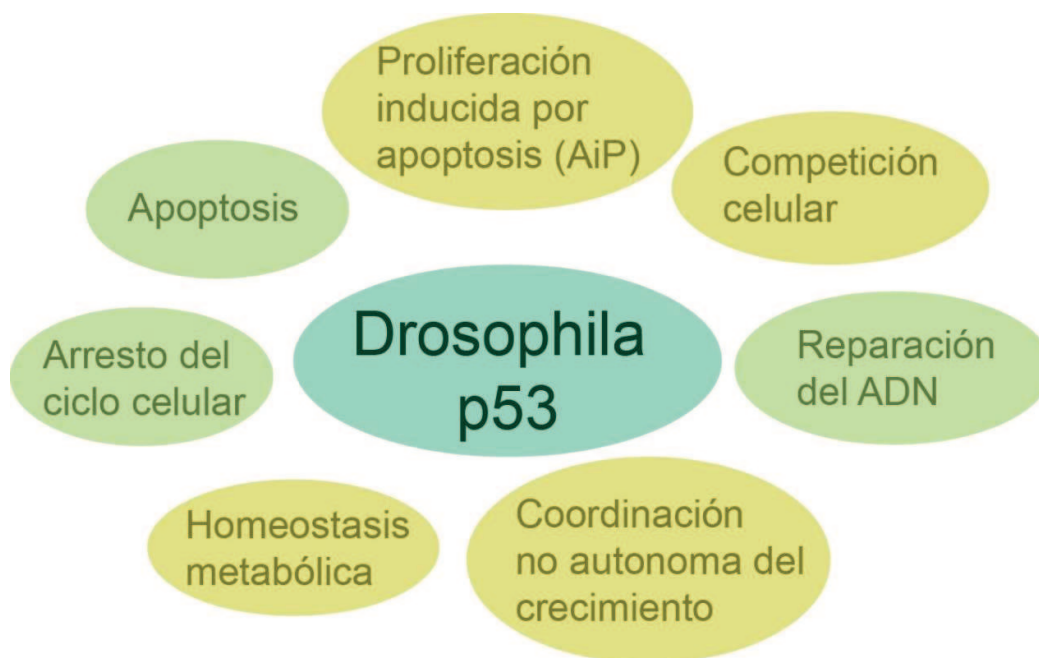
Las células de los tejidos utilizan vías de señalizaciones específicas que permiten interpretar distintos tipos de estrés y comunicarse entre sí para llevar la información desde el espacio extracelular al núcleo. Estas vías de señalización, en general conservadas en el reino animal, generan el nivel de impacto adecuado sobre el crecimiento celular de forma que el tejido mantenga o restablezca la condición de homeostasis general. Entre algunas de estas vías se encuentran las cascadas de quinasas del tipo MAPK (mitogen-activated protein kinase); las vías Toll, IMD, Hippo, JAK/Stat; y los factores de transcripción p53, FOXO, p38 y NF- $\kappa$ B, entre otros. A los fines de esta tesis ahondaremos en la descripción de p53, que ya se ha demostrado como clave para los eventos de coordinación del crecimiento en “acomodación”, y en la vía JNK una de las tres vías MAPKs en *D. melanogaster*. Tanto la vía JNK como p53 participan en regular la homeostasis celular como también la homeostasis de tejido, esto involucra la comunicación entre células estresadas con células sanas con el fin de generar una respuesta compleja y coordinada.

##### 1.4.1. p53: un factor de transcripción con múltiples respuestas.

En condiciones de estrés, p53 es un factor de transcripción que se activa para determinar el destino celular y retornar al tejido a un estado de homeostasis. A saber, p53 puede generar la muerte o sobrevivencia de una célula y ello dependerá de la cantidad de daños que dicha célula acumule y su peligrosidad para el tejido (44). Sus funciones dentro del reino animal han sido ampliamente estudiadas y los mecanismos mediante los que interviene se encuentran conservados (45,46). Su rol como supresor de tumores en humanos es el más estudiado, dado que existe una importante correlación entre tumores y la pérdida de función de p53 (aproximadamente un 50% de los tumores contienen mutaciones en el gen) (47,48). Tanto en *D. melanogaster* como en mamíferos, este factor de transcripción funciona como un tetrámero con dominios proteicos bien definidos que median la oligomerización, la unión al DNA y la actividad transcripcional (49,50). Se calcula que más del 80% de las mutaciones puntuales de p53 asociadas a cáncer se localizan en su dominio de unión al DNA por lo que sus funciones como regulador transcripcional son claves (47).

Las funciones clásicas o canónicas de p53 están relacionadas con reparación del ADN, regulación de la proliferación y apoptosis frente a estrés genotóxico. El mecanismo involucra la activación de genes blancos específicos como *gadd45* (reparación del ADN), *p21* (regulador del ciclo celular) y *bax* y *puma* (apoptosis) en vertebrados (51). De forma análoga, en *Drosophila* activa *gadd45* (reparación del ADN), *reaper* (proteína pro-apoptótica) y *archipelago* (regulador de Ciclina E) (52,53). En algunos contextos es capaz de detener permanentemente el ciclo celular produciendo senescencia celular y la secreción de factores de senescencia denominados SASP (“*senescence-associated secretory phenotype*”).

Por otro lado, trabajos más recientes involucran a p53 en la homeostasis de tejido mediante su rol en contextos como competición celular, proliferación inducida por apoptosis, adaptación metabólica y la coordinación del crecimiento, los cuales serán descriptos más adelante (50,54). De manera que las funciones de p53 no se limitan a la célula donde es activado y emerge como un modulador del entorno celular o incluso la comunicación con otros tejidos. Las funciones celulares y fisiológicas de p53 abren lugar a mecánicas de respuestas frente a estrés poco estudiadas que se presentan prometedoras en diferentes campos de las ciencias biológicas y médicas.



**Figura 12. Rol de p53 en diferentes contextos de estrés.** Las clásicas funciones de p53 descritas en mamíferos y en *Drosophila* indican que p53 es esencial en arresto del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis y envejecimiento; mientras que funciones emergentes demuestran que p53 regula la homeostasis tisular mediante la competición celular, la homeostasis metabólica, la proliferación inducida por apoptosis y la coordinación no autónoma del crecimiento.

#### 1.4.2. Activación de p53.

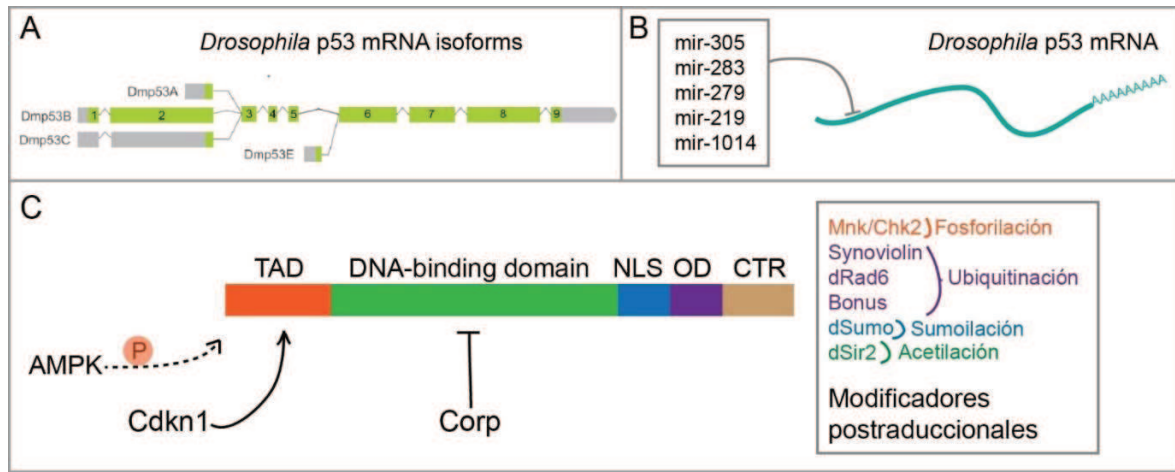
La gran diversidad de situaciones en las que p53 modula la respuesta a estrés podría ser atribuida a la versatilidad con la que puede ser activado. En células normales los niveles y la actividad de p53 son mínimos debido a una fuerte regulación a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona.

El transcripto de p53 es regulado de forma cotranscripcional mediante diferentes efectos de *splicing* alternativo que dan lugar a isoformas de p53 con mayores o menores dominios de transactivación (50) (**Figura 13. A**). En *Drosophila* se han encontrado cuatro isoformas de p53 (en humanos existen nueve isoformas), que coexisten e interactúan entre sí, mientras que algunos trabajos demuestran que su abundancia relativa varía en condiciones de estrés (55–57). Las isoformas más abundantes son p53A y p53B, ambas se encuentran presentes en células de la línea germinal, mientras que en células somáticas la isoforma A es predominante. Tanto la isoforma A como la B median efectos de apoptosis y reparación de daño al ADN; sin embargo, la isoforma p53A parecería mediar los efectos de radiación (IR) y la respuesta a daño al ADN en células germinales (58,59). Por otro lado, se ha demostrado que la isoforma B posee una mayor estabilidad y genera efectos apoptóticos más fuertes cuando se sobreexpresa.

De forma postranscripcional los ARN mensajeros de p53 se encuentran regulado por micro ARNs, convirtiéndose en reguladores finos de los niveles de p53 (**Figura 13. B**). En *Drosophila* se han descrito que tres micro ARNs (mir-305, mir-283 y mir-279) limitan la activación de p53 y que los mismos disminuyen en condiciones de estrés (60). De forma análoga, en vertebrados este mecanismo de silenciamiento se encuentra mediado por mir-125b y mir-504, mientras que de forma indirecta mir-34a, mir-122 y mir-29 contribuirían en el silenciamiento de activadores de p53 (61,62).

El pool proteico de p53 con el que cuentan las células se renueva constantemente dado que el mismo se encuentra sujeto a un delicado balance entre traducción y degradación vía proteasoma (63). Tanto en mamíferos como en *Drosophila*, existe una reserva disponible de p53 preparada para recibir una modificación postraduccional que estabiliza la proteína y permite un aumento de los niveles de p53 mediante un mecanismo de retroalimentación positiva (p53 es capaz de activar su propia transcripción). Entre las modificaciones postraducionales conservadas para p53 se encuentra la fosforilación, la acetilación, sumoilación y la ubiquitinación (49) (**Figura 13. C**); mientras que en mamíferos además se han encontrado modificaciones por metilación y nedilación (64); e incluso la estabilización de p53 por unión al ARN largo no codificante llamado DINO (65).

El mecanismo de activación más estudiado de p53 involucra la regulación negativa mediada por la ligasa de ubiquitinas MDM2 en mamíferos (63). La ubiquitinación de p53 promueve tanto su degradación vía proteasoma como la exportación del núcleo, por lo que en condiciones de estrés se produce la inhibición de MDM2 y la subsecuente estabilización de p53. En *Drosophila*, no existe un ortólogo directo de MDM2 por lo que se piensa que este mecanismo es específico de mamíferos. Sin embargo, otras enzimas podrían conducir a la inhibición de p53, entre ellas la E3 ligasa Synoviolin (dSyn) y Corp una proteína capaz de inhibir a p53 mediante interacción directa (**Figura 13. C**). De forma opuesta, la ciclina dependiente de quinasas Cdkn1 se ha encontrado como un activador de p53 en las células mitóticas, lo cual permitiría mediar una rápida activación de p53 en células proliferativas defectuosas (66).



**Figura 13. Activación de p53 en *Drosophila*.** (A) Isoformas de p53 demuestran la existencia de diferentes eventos de splicing que incluirían una mayor o menor cantidad de dominios N-terminales, donde se ubica el dominio de trans-activación principal de p53. Imagen adaptada de Ingaramo *et al.*, 2018 (50). (B) Regulación de micro ARNs sobre el transcrito de p53. (C) La proteína p53 es regulada mediante modificaciones postraduccionales, en el recuadro se muestran algunas proteínas que ejercen esta función. Por otro lado, otras proteínas intervienen en la estabilidad de p53 como Corp y Cdkn1, los cuales se conoce que interactúan de forma directa, aunque no se ha demostrado que ejerzan alguna modificación post-traduccionales. Mientras que la quinasa AMPK regula p53, resta establecer si esto sucede por interacción o de forma indirecta.

### 1.4.3. La vía JNK en el camino del estrés.

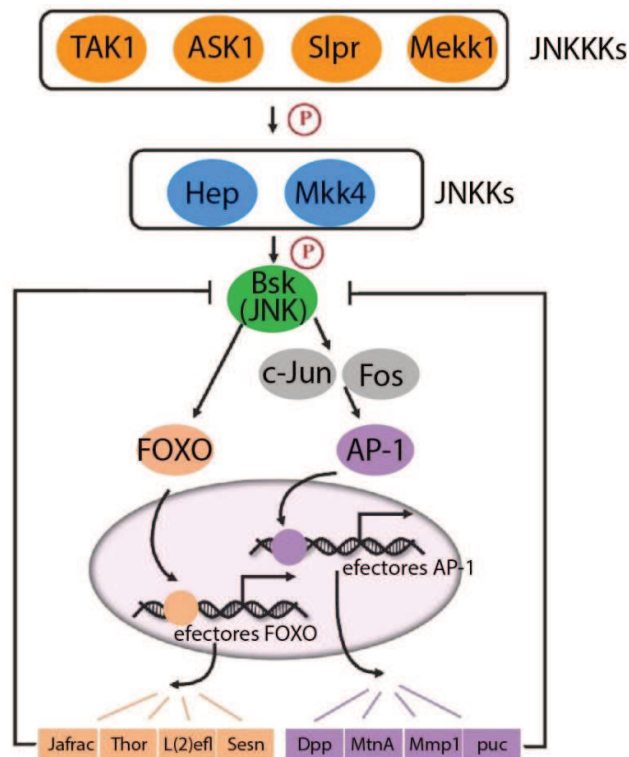
La vía de señalización JNK (c-Jun N-terminal kinases), miembro de la familia de proteínas quinasas del tipo MAPK, se ha descrito como mediadora de respuesta a estreses bióticos y abióticos y es fundamental para sostener la homeostasis celular y tisular (67). Consiste en una vía de quinasas que son activadas por cascadas de fosforilaciones sucesivas involucradas principalmente en apoptosis, migración celular, proliferación y regeneración, dependiendo el tipo de estrés y el contexto celular (68). Los elementos principales de la vía se encuentran conservados en el reino animal, y han sido ampliamente estudiados por sus funciones biológicas y sus implicancias en diferentes enfermedades humanas.

Tanto en vertebrados como en *Drosophila*, esta vía se encuentra compuesta por un núcleo de tres tipos de quinasas que se fosforilan sucesivamente y que son denominadas JNKKK, JNKK y JNK, representando la estructura canónica de la vía (68,69) (**Figura 14**). En *Drosophila* existen cuatro tipos de JNKKK de los cuales Tak1 ha sido la más estudiada, las restantes son Slipper, Ask1 y Mekk1. Hemipterous es la principal JNKK, aunque MKK4 también es capaz de actuar con dicha función. Y hasta el momento solo Basket se ha descrito como la única JNK en moscas. Esta última, es capaz de fosforilar a Kayak (JUN en mamíferos) un factor de transcripción que heterodimeriza con Jra (Fos en mamíferos) para formar el factor de transcripción AP-1. El factor de transcripción AP-1 se activa al final de la vía, y es capaz de activar blancos transcripcionales específicos como *puc* (puckered) y *mmp1* (una metaloproteasa de matriz). La fosfatasa codificada por *puc* es capaz de desfosforilar a Basket y constituye el principal regulador negativo de la vía. Paralelamente, Basket puede fosforilar a FOXO y promover su translocación al núcleo para activar genes blancos que intervienen en condiciones de hambre y estrés oxidativo.

La vía JNK posee funciones contexto dependientes, por lo que su activación puede generar respuestas pro-apoptóticas o pro-proliferativas. En condiciones de estrés severo como daño tisular

o radiación, se activa mediante factores de estrés que desencadenan la inducción de los genes pro-apoptóticos *hid* y *reaper* (69,70). Además la activación de la apoptosis se sostiene mediante un mecanismo de retroalimentación positiva que involucra la activación de la vía JNK por la caspasa Dronc (67). En el caso de la competición celular este mecanismo de retroalimentación es esencial para establecer la respuesta apoptótica, dado que en ausencia de la vía JNK los efectores caspasas no se encuentran en suficiente cantidad para determinar el destino celular de las células perdedoras.

Por otro lado, la vía JNK tiene funciones pro-proliferativas que se dan por una sostenida activación de la vía y la secreción de señales (como Wg, Dpp o activadores de JAK/STAT) que estimulan el crecimiento de las células cercanas (67). Este mecanismo se ha descrito como proliferación compensatoria e involucra funciones parácrinas de la vía en contextos en donde el tejido debe repoblar los espacios dejados por las células eliminadas.



**Figura 14. Estructura canónica de la vía JNK en *Drosophila*.** Tres tipos de quinases principales forman el núcleo de la vía, JNKKK, JNKK, JNK; que se activan por fosforilaciones sucesivas. Finalmente, los factores de transcripción AP-1 y FOXO se activan bajo diferentes contextos para inducir la expresión de genes involucrados en apoptosis, estrés oxidativo, regeneración, migración, etc. Imagen tomada y adaptada de Gan *et al.*, 2021 (69).

#### 1.4.4. Activación de la vía JNK.

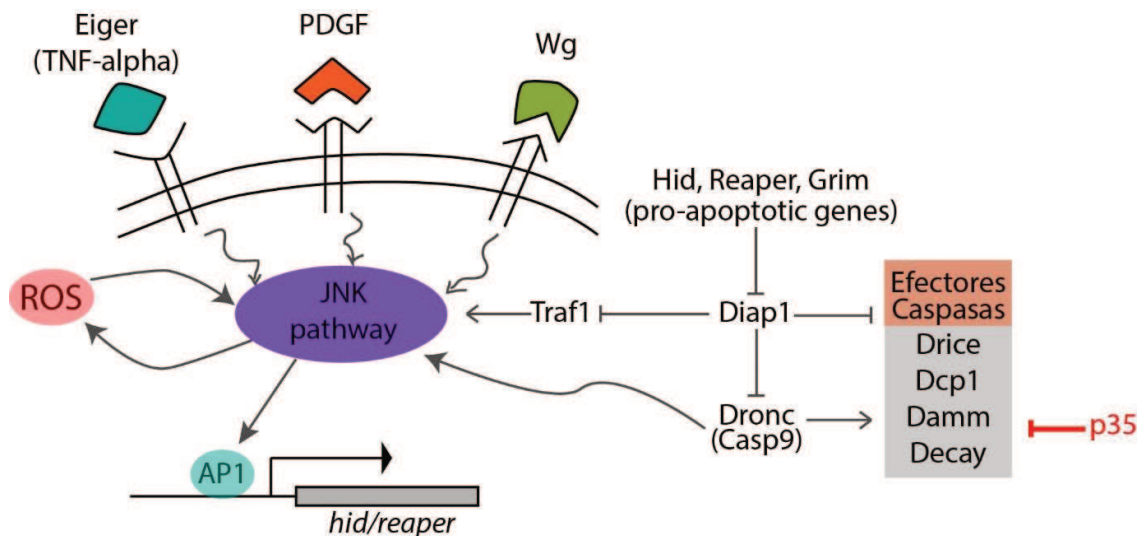
La gran cantidad de activadores de la vía permiten que la misma participe en estreses tan diversos como infección, inflamación, estrés oxidativo, daño al ADN, estrés osmótico, cambios en el citoesqueleto, estrés del RE (retículo endoplasmático), etc. En *D. melanogaster* estos activadores pueden ser ligandos extracelulares como los factores de crecimiento PDGF (Platelet-derived Growth Factor) y VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Eiger (homólogo al TNF- $\alpha$  de mamíferos)



y Wingless (ligando de la familia Wnt) (68,69) (**Figura 15**). Cuando alguno de estos ligandos une a sus receptores específicos en la membrana de la célula, la señal es transducida hacia el interior mediante proteínas adaptadoras (en general pequeñas GTPasas) que generan la activación de alguna de las JNKKK.

Alternativamente la vía puede ser activada indirectamente de forma intracelular mediante los genes proapoptóticos reaper y hid (71,72). Cuando estos se inducen bloquean al inhibidor de apoptosis DIAP el cual tiene entre otras funciones la degradación de Traf1 (73). La estabilización de Traf1 en condiciones de estrés genera la activación de Ask1 (JNKKK) y por tanto de la vía JNK. Dado que reaper y hid son blancos moleculares de AP-1, se establece un mecanismo de retroalimentación que mantiene a la vía apoptótica activa. Más aún, reaper y hid son blancos de p53 lo que explica en gran parte porque ambas vías actúan juntas en condiciones de estrés (72).

La activación de la vía JNK se encuentra asociada a la aparición de altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) tanto en moscas como en vertebrados (74,75). El mecanismo más estudiado es la regeneración de los tejidos, en donde la producción de ROS en la zona donde se produjo el daño es fundamental para la formación del blastema y al mismo tiempo desencadenar la activación de la vía JNK en las células cercanas (76,77). A su vez la activación de la vía JNK es necesaria para la generación de ROS, por lo que entre ambas se establece un ciclo de retroalimentación. Si bien no está claro de qué manera las ROS activan la vía JNK y viceversa; resultados recientes demuestran que *moladietz (mol)* es un blanco de la vía JNK que codifica para un factor necesario para la maduración de Duox y la producción de ROS (78). Esto podría explicar la formación de ROS corriente abajo de la vía JNK y la auto sustentación y propagación de la vía mediante las ROS.



**Figura 15. Activación de la vía JNK.** Los ligandos extracelulares Eiger/TNF- $\alpha$ , PDGF y Wg son capaz de activar la vía mediante la unión a sus receptores en la membrana plasmática. De forma intracelular la vía puede ser activada por la vía apoptótica mediante dos mecanismos, la acción de Dronc (Casp9) y la activación de Traf1; esto permite sostener el proceso apoptótico dado que la vía JNK amplifica la señal mediante la inducción de los genes pro-apoptóticos *hid* y *reaper*. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) también juegan un papel de retroalimentación positiva que permite transmitir la señal entre células cercanas, dado que las mismas son capaces de activar la vía JNK al mismo tiempo que la inducción de la vía es capaz de producir especies reactivas.

### 1.4.5. Mecanismos celulares de respuesta a estrés.

Tanto p53 como la vía JNK intervienen en múltiples respuestas celulares frente a estrés por lo que una gran cantidad de proyectos se han destinado a entender los mecanismos moleculares por los que operan. Sin embargo, en condiciones de estrés *in vivo* comienza a visualizarse un campo más amplio, en donde los mismos son capaces de intervenir en la comunicación célula-célula para coordinar una respuesta a nivel tisular más compleja. De forma que las funciones no autónomas de estos dos reguladores maestros recién comienzan a comprenderse y por tanto resulta importante desentramar cómo los mismos son capaces de mediar mecanismos celulares en respuesta a estrés.

La competición celular se ha descubierto como un importante mecanismo que contribuye en la homeostasis durante el crecimiento de tejidos (79,80). Este proceso resulta cuando células vecinas entre sí perciben diferencias metabólicas o de velocidad de crecimiento, dando lugar a la eliminación de aquellas que son más débiles, mientras que las células mejores preparadas proliferan y ocupan su lugar (81). Esto ocurre solamente cuando las células se encuentran adyacentes entre sí y se ha descrito como un mecanismo de control en el que las interacciones célula-célula permiten eliminar aquellas menos adaptadas o potencialmente peligrosas (**Figura 16.A**). El mecanismo de eliminación se pierde si las células deficientes no activan la vía JNK dado que la misma es la principal mediadora de la apoptosis en este contexto (82). p53 podría jugar roles opuestos durante la competición celular, por un lado se activa en las células “perdedoras” sin una clara evidencia de una contribución en el mecanismo apoptótico (82); mientras que en células supercompetidoras (células hipereproliferativas capaces de eliminar células normales) es necesario para una rápida adaptación metabólica (83).

Un proceso de eliminación similar llamado apoptosis morfogénica tiene lugar cuando una célula posee valores posicionales incorrectos, como por ejemplo valores dispares en el gradiente de Dpp o Wg (84). Se ha observado que la discontinuidad del gradiente morfogénico genera la activación de la vía JNK y la subsecuente apoptosis, lo que luego restaura el gradiente por proliferación de las células circundantes (31).

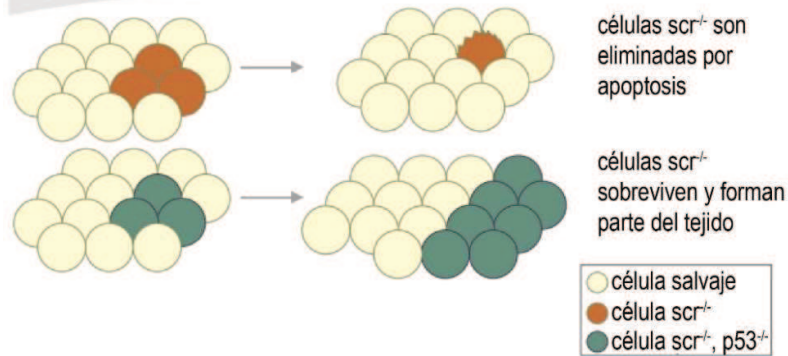
En los últimos años se ha descubierto que células eliminadas de los tejidos por apoptosis son capaces de señalar a las células vecinas contribuyendo en la homeostasis y la regeneración de los tejidos de forma activa. Dependiendo del contexto, las células apoptóticas son capaces de producir señales pro-apoptóticas, anti-apoptóticas, mitogénicas y morfogénicas que actúan directamente en las células adyacentes sin intervención del sistema inmune (85). Del estudio de los efectos no autónomos de la apoptosis podemos encontrar procesos como la apoptosis inducida por apoptosis (AiA) mediada por Eiger/TNF $\alpha$  y la vía JNK. La resistencia a la muerte inducida por apoptosis (AiDR) mediada por el micro-ARN *bantam*. Y la proliferación inducida por apoptosis (AiP) o también conocida como proliferación compensatoria en la que la vía JNK activa Dpp, Wg, Hh y otros ligandos extracelulares para inducir la proliferación de forma no autónoma (**Figura 16.B**).

Las células del disco de ala son capaces de regenerar y permitir la restauración del tejido y su tamaño luego de daños físicos como radiación o amputación. Se ha demostrado que las células que se encuentran alrededor de la zona dañada son capaces de activar la vía JNK para formar el blastema y repoblar el tejido con células que contienen la información posicional correcta del

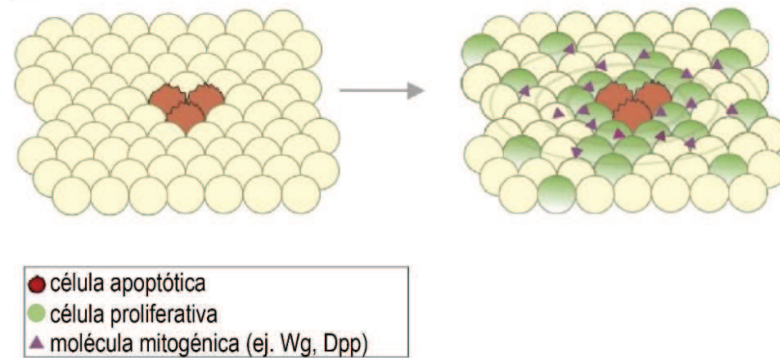
gradiente de morfógenos (86). Además, JNK contribuye en la activación de dILP8, un péptido de tipo insulina capaz de disminuir los niveles globales de Ecdisona y con ello una prolongación en el tiempo de desarrollo (ver 1.3.1) (38). De esta manera, el tejido posee una ventana de tiempo superior para lograr la reparación y por tanto contribuir en la formación de tejidos adultos sanos. Sin embargo, cuando los tejidos sufren de daños genotóxicos severos, p53 contribuye en los mecanismos de reparación del ADN y la homeostasis tisular permitiendo que los tejidos mantengan su morfología normal (87).

Por último, el mecanismo de coordinación del crecimiento que tiene lugar en condiciones de estrés se encuentra mediado por p53 (ver 1.3.3). Este se hace evidente cuando dos compartimentos del ala crecen de forma diferencial, es decir, uno de los compartimentos se encuentra impedido de crecer correctamente (**Figura 16.C**). En este contexto el compartimento estresado es capaz de comunicarse con el compartimento vecino para disminuir su crecimiento también (1,43). Este efecto de coordinación no autónoma involucra a p53 en el control del tamaño del compartimento y del número de células. Este proceso es eje de estudio de la presente tesis doctoral.

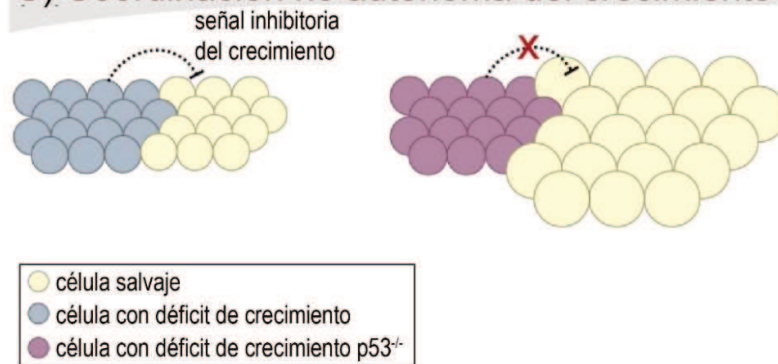
### A) Competición Celular



### B) Proliferación inducida por apoptosis



### C) Coordinación no autónoma del crecimiento



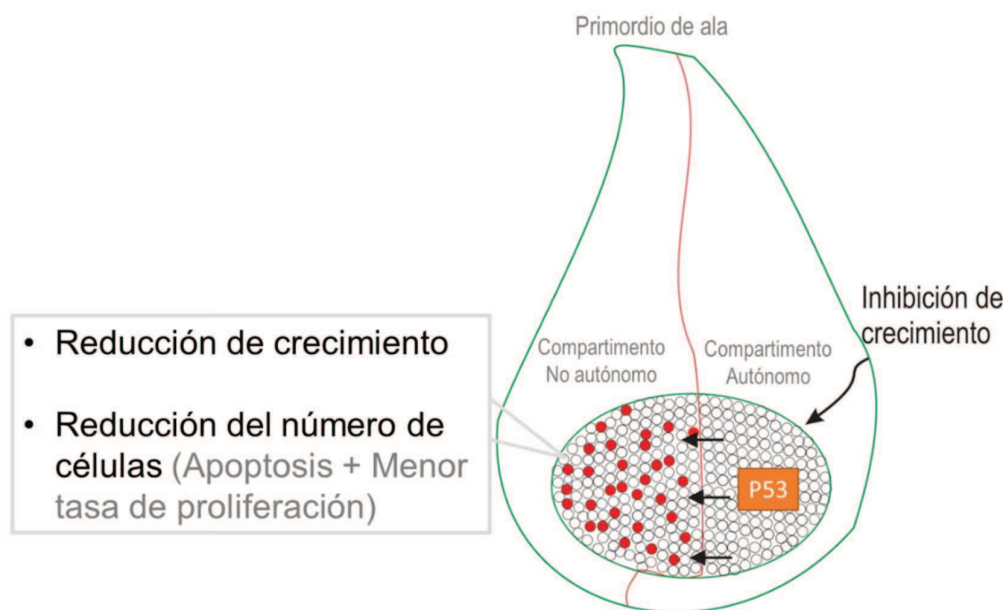
**Figura 16. Mecanismos celulares de respuesta a estrés.** (A) La competición celular es un proceso en donde el contacto entre células deficientes o potencialmente peligrosas con células sanas genera la supervivencia de las células "ganadoras" mejor adaptadas. (B) Luego de algún daño tisular severo algunas células sufren apoptosis para generar una inducción en la capacidad proliferativa del tejido mediante la secreción de señales mitogénicas a las células circundantes. (C) El crecimiento y la proliferación de los tejidos se encuentra coordinada entre los compartimentos del desarrollo. Cuando uno de los compartimentos posee un crecimiento deficiente, el mismo genera una señalización que permite la disminución del crecimiento del compartimento de vecino. De esta forma el tejido mantiene la proporcionalidad entre ambas poblaciones celulares y genera órganos adultos simétricos.

## 1.5. Hipótesis del proyecto

De acuerdo a lo expuesto a lo largo de la introducción, se propone estudiar el proceso de coordinación del crecimiento que permite la formación de tejidos bien proporcionados durante el desarrollo animal. Para ello se recurrirá a la experimentación con el primordio de ala de *Drosophila melanogaster*, el cual ya se ha demostrado como un tejido útil para estudiar este proceso (1).

Previamente se ha observado que, mediante la generación de un estrés preciso dentro del primordio, el tejido es capaz de acomodar su crecimiento para la generación de un ala adulta que mantiene sus proporciones de tamaño y su densidad celular (1). Este proceso denominado como acomodación, depende del factor de transcripción p53 (1) y por tanto es eje central del proyecto. Corriente abajo de p53 se producen al menos dos fenotipos no autónomos celulares distinguibles, uno de ellos capaz de reducir la tasa de proliferación del tejido de forma dependiente de caspasas, y el otro capaz de reducir el tamaño del tejido y mantener sus proporciones (**Figura 17**). En este contexto la activación de p53 es incierta y por lo tanto también representa un aspecto importante a ser estudiado. En este sentido, un micro ARN específico llamado mir-305 se ha mostrado como un regulador fino de la actividad de p53 en distintos tejidos (60), sin embargo no se ha estudiado su rol en este proceso.

Por lo que, en base a los estudios y resultados previos se plantea como hipótesis del proyecto la idea de que genes blancos de p53 puedan mediar los fenotipos no autónomos que ocurren durante el proceso de acomodación. Entre estos genes, *eiger* codifica para una proteína secretable y se muestra como un candidato interesante para ser estudiado en este contexto. Por otro lado, dado que p53 es finamente regulado por micro ARNs bajo distintas condiciones de estrés, nos preguntamos si esta vía de regulación es importante para el proceso de acomodación corriente arriba de p53.



**Figura 17. Mecanismos de coordinación del crecimiento frente a estrés en primordio de ala de *Drosophila melanogaster*.** Para el estudio de este proceso de coordinación, proponemos estudiar al factor de transcripción p53 y sus efectores (genes blancos) como a sus activadores (moléculas corriente arriba).

## 2. Objetivos

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo central estudiar la función del gen supresor de tumores p53 en metabolismo, crecimiento y homeostasis de tejidos utilizando la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como sistema modelo.

Previamente se ha demostrado la existencia de un mecanismo de coordinación del crecimiento en un tejido en desarrollo por el cual las diferentes poblaciones de células que componen dicho tejido acoplan su crecimiento al de las células vecinas. Este mecanismo definido como “acomodación” depende del gen supresor de tumores p53. El presente proyecto de investigación propone profundizar en el mecanismo molecular e identificar las señales corrientes arriba y abajo de p53.

Objetivos particulares:

1- Identificar las señales moleculares corriente abajo de Dp53 involucradas en coordinar crecimiento:

Estudio de la función del gen *eiger/TNF- $\alpha$* . : Entre las señales moleculares involucradas en el proceso de coordinación del crecimiento se ha encontrado a *Eiger/TNF- $\alpha$* , por lo que se ha propuesto estudiar su rol en coordinar el crecimiento y la proliferación celular.

2- Análisis de la regulación de dp53 por la maquinaria de miRNAs durante “acomodación”.

El mecanismo molecular por el cual Dp53 se activa en respuesta a un defecto de crecimiento durante el proceso de acomodación es desconocido. Previamente se ha demostrado que Dp53 se regula por miRNAs en diferentes tejidos de *Drosophila* y que esta regulación se modula en respuesta a un estrés metabólico. Los miRNAs involucrados en silenciar Dp53 se expresan durante el desarrollo y podrían ser relevante durante el proceso de coordinación del crecimiento bajo estudio. Proponemos estudiar en detalle la regulación de Dp53 mediada por miRNAs durante el proceso de acomodación e identificar el/los miRNAs involucrados.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Mantenimiento y líneas de moscas

Todas las líneas de moscas (**Tabla 1**) fueron mantenidas a 25°C en un medio alimenticio estándar que contiene: 40 g/L de sacarosa, 40 g/L de levadura, 1% agar, 30 g/L de polenta, 25 g/L de harina, 4,5 ml/L de ácido propiónico y 1,2 g/L de nipagin. Otras condiciones de temperatura o comida utilizadas son indicadas en el texto.

**Tabla 1.** Líneas de moscas utilizadas.

Líneas de moscas	N° de stock	Observación
<i>en-GAL4</i>	BL 30564	Dirige la expresión hacia dominio posterior
<i>ci-GAL4</i>	Cedido por M. Milán	Dirige la expresión hacia dominio anterior ( <i>enhancer trap</i> )
<i>ptc-GAL4</i>	BL 2007	Expresión en límite A-P
<i>ap-GAL4</i>	BL 3041	Expresión en dominio dorsal
<i>nub-GAL4</i>	BL 25754	Expresión en disco de ala
<i>hh-GAL4</i>	BL 67493	Expresión en dominio posterior
<i>Bx-GAL4</i>	Cedido por M. Milán	Expresión en disco de ala
<i>sal<sup>PE</sup>-GAL4</i>	Cedido por M. Milán	Expresión en disco de ala (wing pouch)
<i>m-GAL4</i>	BL 7405	Expresión en disco de ala
<i>ey-GAL4</i>	BL 5535	Expresión en disco de ojo
<i>Hs-Flp;</i> <i>act&gt;cd2&gt;GAL4;UAS-</i> <i>RFP</i>	BL 90923	Línea para clones (mosaico genético)
<i>UAS-myc<sup>RNAi</sup></i>	VDRC 2947	ARN de interferencia contra ARNm <i>myc</i>
<i>UAS-egr<sup>IR</sup></i>	BL 58993	ARN inverted repeat que silencia <i>eiger</i>
<i>UAS-p53</i>	BL 6584	Sobrexpresión de p53
<i>UAS-egr<sup>RNAi</sup></i>	VRC 108814	ARN de interferencia que silencia <i>eiger</i>
<i>UAS-Gmd<sup>RNAi</sup></i>	VRC 104538	Transgén que permite silenciar <i>grindelwald</i>
<i>UAS-RA</i>	Cedido por M. Milán	Sobrexpresión de subunidad A de la toxina Ricina
<i>UAS-Bsk<sup>DN</sup></i>	BL6409	Sobrexpresión de dominante negativo de Basket
<i>UAS-tak<sup>RNAi</sup></i>	VDRC 101357	ARN de interferencia que silencia <i>tak</i>
<i>UAS-FOS<sup>c-ala</sup></i>	Cedido por M. Milán	Versión Dominante negativa de Fos
<i>UAS-p53<sup>RNAi</sup></i>	VDRC 10692	ARN de interferencia que silencia p53
<i>UAS-Dilp8<sup>RNAi</sup></i>	VDRC 102604	ARN de interferencia que silencia <i>dilp8</i>
<i>UAS-Xrp1<sup>RNAi</sup></i>	BL 34521	ARN de interferencia que silencia <i>xrp1</i>
<i>UAS-dcr<sup>RNAi</sup></i>	BL 34826	ARN de interferencia que silencia <i>dcr</i>
<i>UAS-hep<sup>RNAi</sup></i>	BL 2968	ARN de interferencia que silencia <i>hep</i>
<i>UAS-Hr51<sup>RNAi</sup></i>	BL 39032	ARN de interferencia que silencia <i>hr51</i>
<i>UAS-Hr51</i>	BL 56836	Sobrexpresión de <i>Hr51</i>
<i>UAS-CAT</i>	BL 24621	Sobrexpresión de Catalasa
<i>UAS-SOD</i>	BL 24494	Sobrexpresión de Superóxido dismutasa
<i>UAS-puc</i>	Cedido por M. Milán	Sobrexpresión de <i>puckered</i> (inhibidor de vía JNK)
<i>UAS-p35</i>	BL 5072	Sobrexpresión de p35 (inhibidor de efectores caspasas)
<i>UAS-p53<sup>DN</sup></i>	BL 8420	Versión dominante negativa de p53 con la mutación H159N
<i>p53<sup>ns</sup></i>	BL 23283	Alelo nulo de p53
<i>egr<sup>3</sup></i>	Cedido por M. Milán	Alelo nulo de <i>eiger</i>
<i>hep<sup>r75</sup></i>	BL 6761	Mutante de <i>Hemipterous</i>
<i>EGR-GFP</i>	BL 318615	Reportero de <i>eiger</i> ( <b>ver anexo</b> )
<i>egr-lacZ</i>	Cedido por K. Basler	Reportero de <i>eiger</i> ( <b>ver anexo</b> )

<i>puc-Z</i>	109029, Kyoto	puc[E69], línea enhancer trap que contiene secuencia lac-Z inserta en el gen endógeno de <i>puckered</i>
<i>Dilp8-GFP</i>	BL 33079	Línea llp8MI00727 de la colección MIMIC que posee la secuencia de la GFP inserta en el gen endógeno de <i>dilp8</i>
<i>xrp1-lacZ</i>	BL 11569	Reportero de Xrp1
<i>GstD1-GFP</i>	Cedido por M. Milán	Reportero de GstD1
<i>p53-miR<sup>sensor</sup>-GFP</i>	Cedido por M. Milán	Reportero de actividad de micro ARNs sobre p53
<i>W<sup>1118</sup></i>	BL 3605	Línea control. Mutante del gen white

### 3.2. Sistema de expresión binario GAL4-UAS.

Se utilizó el sistema binario GAL4/UAS para dirigir la expresión de distintos transgenes a diferentes tejidos de *Drosophila* (Brand & Perrimon, 1993). Los cruces fueron llevados a cabo a 25°C a no ser que se indique lo contrario. El cruce de las líneas Gal4 con la línea *w<sup>1118</sup>* fue utilizado como control para cada experimento.

Adicionalmente se utilizó el transgén Gal80 termosensible para controlar la expresión del Gal4 en experimentos de sobreexpresión de p53 (*sal>p53*, Gal80ts). Los individuos con el genotipo indicado fueron crecidos a 18°C hasta el estadio de L3. Luego fueron movidos a una incubadora a 29°C por 12-16hs hasta el momento de tomar las muestras.

Experimentos de mosaico genético o clones, fueron realizados con la línea *Hs-Flp;act>cd2>GAL4;UAS-RFP* (*AFG>RFP*) cruzados con el transgén indicado. Los clones fueron analizados entre 48 a 72 hs posteriores a un shock térmico de 10 minutos a 37°C.

### 3.3. Inmunohistoquímica de discos imaginales.

Discos imaginales fueron extraídos de larvas disecionadas en el estadio L3 y fijados en 4% de paraformaldehído en PBS durante 20 minutos. Los tejidos fueron lavados 3 veces durante 15 minutos con PBT (PBS + 0,1% de Tritón X-100) y bloqueados durante 1 h en BBT (PBT + BSA 0,3% + 250 mM NaCl). Los discos fueron incubados a 4°C durante toda la noche en 50-100 µl de BBT con el anticuerpo primario. Después de la incubación los discos se lavaron 3 veces durante 15 minutos con PBT. Luego fueron incubados en 100 µl de BBT con los anticuerpos secundarios conjugados a los diferentes fluoróforos (Jackson Laboratories), durante 2 hs a temperatura ambiente. En los últimos 15 minutos de incubación se adicionó DAPI para marcar los núcleos. Las muestras fueron lavadas con PBT y guardadas en Glicerol 80% a 4°C. Los discos fueron finalmente montados en un portaobjetos y las imágenes capturadas usando un microscopio confocal. A continuación, una tabla listando los anticuerpos utilizados y sus condiciones de uso (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Anticuerpos utilizados en tinciones inmunohistoquímica.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Identificador</i>	<i>Concentración</i>
<i>Anti-β-Gal de conejo</i>	A11132, Invitrogen	1/100
<i>Anti-GFP de ratón</i>	12A6, DSHB	1/20
<i>Anti-Wg de ratón</i>	4D4, DSHB	1/20
<i>Anti-BrdU</i>	G3G4, DSHB	1/100
<i>Anti-Myc de ratón</i>	P4C4-B10, DSHB	1/20
<i>Anti-MMP1 de ratón</i>	3A6B4, DSHB	1/20



<i>Anti-PH3 de conejo</i>	p-H3 (Ser-10)-R, Santa Cruz	1/500
<i>Anti-p53 de ratón</i>	7A4, DSHB	1/20
<i>Anti-IgG de ratón Alexa Flúor 488</i>	Jackson ImmunoResearch	1/200
<i>Anti-IgG de conejo Alexa Flúor 594</i>	Jackson ImmunoResearch	1/200
<i>Anti-IgG de conejo Alexa Flúor 488</i>	Jackson ImmunoResearch	1/200
<i>Anti-IgG de ratón Alexa Flúor 594</i>	Jackson ImmunoResearch	1/200

### 3.1. Incorporación de BrdU y tinción de células apoptóticas con TUNEL.

La técnica de incorporación de 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) se utilizó para identificar células en fase S del ciclo celular y se llevó a cabo según Milán *et al.*, 1996 (88). Brevemente, los discos de ala obtenidos según cada genotipo y tratamiento se incubaron con BrdU (1ug/ml) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS se procedió con la fijación con formaldehído. Posteriormente se siguió según la técnica de inmunohistoquímica antes descripta y se utilizó un anticuerpo anti-BrdU como anticuerpo primario.

La tinción con el kit enzimático TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit) de Roche Diagnostics fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 3.2. Sincronización y medidas de tiempo de pupariación.

Para medir el tiempo de transición de larva a pupa, se estandarizaron las condiciones de crecimiento (50 individuos por tubo) y se sincronizaron los cultivos. Para las sincronizaciones se realizaron ovipuestas cortas (12 hs) en placas bajo condiciones controladas de temperatura. A las 24 hs se tomaron 50 individuos en estadio L1 y se colocaron en viales con alimento. Los individuos fueron mantenidos a 25°C hasta el estadio de pupa momento en el cual fueron cuantificados. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 3.3. Tratamiento con antioxidantes

Para reducir los niveles de ROS de forma química, se transfirieron larvas L1 a medios que contenían la comida estándar suplementada con una mezcla de antioxidantes: vitamina E (20 µg/ml); vitamina C (250 µg/ml); y N-acetylcysteina (NAC; 200 µg/ml). Las larvas control fueron transferidas al mismo tiempo a medios suplementados con el medio vehículo. Cada uno de los antioxidantes fueron preparados en soluciones stock previamente a cada experimento (10 mg/ml de NAC diluido en H<sub>2</sub>O; 2 mg/ml de vitamina E diluida en etanol absoluto; 25 mg/ml de vitamina C diluida en H<sub>2</sub>O). Los stocks no se conservaron por más de una semana; mientras que las mezclas de antioxidantes fueron preparadas frescas y agregadas cada 48hs a los viales.

### 3.4. Medición de alas adultas y densidad celular.

Individuos machos adultos fueron colocados en medio SH (Glicerol:EtOH en proporciones 1:3). Las alas adultas fueron diseccionadas en agua y montadas en medio Fauré. Las fotos fueron tomadas en microscopio Nikon Eclipse E200. El número de individuos, la temperatura y el objetivo del microscopio fueron controlados de manera estricta para prevenir errores. El análisis de las áreas de las alas (área total, área anterior y área posterior) se realizó en FIJI, utilizando igual número de

individuos por genotipo especificados en la **Tabla 8** del Anexo. La relación A:P fue calculada como (área anterior) / (área posterior).

Para las mediciones de asimetría bilateral, ambas alas de cada individuo fueron diseccionadas y cuantificadas siguiendo la metodología anterior. Posteriormente se calculó el índice de asimetría fluctuante (FAi) de acuerdo a lo reportado por (37).

$$FAi = Var \left[ \frac{L. Wing - R. Wing}{\frac{L. Wing + R. Wing}{2}} \right]$$

Para las mediciones de densidad celular, se tomaron imágenes en el microscopio de forma que en el plano de la imagen solo sean visibles los pelos de las células de uno de los lados del ala. Para el dominio anterior se escogió una región del ala entre las venas L2 y L3, mientras que para el dominio posterior se tomó la región comprendida entre las venas L4, L5 y p-cv (*posterior cross vein*); con un área arbitraria que comprenda al menos 100 células en el genotipo control. Las cuantificaciones de número de células por unidad de área arbitraria fueron normalizados respecto al genotipo control.

### 3.5. Extracción de ARN y PCR en tiempo real.

Extracción de ARN: Las extracciones de ARN de larvas completas del estadio L3 tardío se realizaron con Trizol comercial (Invitrogen), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El RNA obtenido fue resuspendido en agua miliQ y cuantificado a 260 nm.

Transcripción reversa: Para los experimentos de RT-qPCR se realizó un primer paso de síntesis de DNA copia (retrotranscripción). 1 a 5 µg de RNA total fueron utilizados como molde para la síntesis de cDNA, utilizando oligo-dT como primer (0,1 µM) y la enzima Transcriptasa reversa M-MLV (Revert-Aid, Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El cDNA resultante fue utilizado como molde para reacciones de PCR, en las que se emplearon oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes a analizar.

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR): A fin de obtener una medida cuantitativa de los niveles de los ARN, se utilizó la técnica de qPCR utilizando Syber green, Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific) y el equipo StepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies™). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl, conteniendo buffer de reacción de la enzima (5X; 4 µl), SYBR green (10X; 1 µl), dNTPs 62,5 µM, 20 pmoles de cada oligonucleótido específico (**Tabla 3**), 10 µl de una dilución del producto de la transcripción reversa previamente descrita y 0,15 U de la enzima Taq ADN polimerasa. Se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar Actina como control de normalización. La fluorescencia se midió a 70°C durante 40 ciclos y los niveles relativos de expresión se determinaron utilizando el método de Ct comparativo.

**Tabla 3.** Cebadores utilizados en determinaciones por PCR cuantitativa.

<i>Gen</i>	<i>Primer Fw</i>	<i>Primer Rv</i>
<b>Act5c</b> (housekeeping)	CAAGTGCAGTGGTGGAAAGTT	GCAGGTGGTTCGCTCTTT
<b>Arc1</b>	ACTTCTCCGCTTGCACACAC	TCCTTGATGTCTCGATGTTGC
<b>CG6908</b>	GCCAACAGGTGAACGATATGG	TGGCTCGAATTTTTGCTGATCC
<b>Hr51</b>	GAAAGCACTACGGAATCCTAGC	CCTGGCAGCGATAAATGAGTTT
<b>Damm</b>	AGTGAAGGAGTGGTCTGCAAA	CAAGTGGTATTCCCTGTGGTC
<b>Spn47C</b>	AACAACATGCGGAATCCTGGA	TGACGTACAATCGTGTGACCA
<b>CG15784</b>	GGAGCGTGTTCCTCAAGAG	CCTTTTGGTGCCTGTTCCT
<b>mb1</b>	TTGAATCAAATTATAGCCCAAGCT	CGATTTTGCTCGTTAGCGTTT
<b>CG11893</b>	CCAGAAAACGCAGATACCGAG	ACGTCAGTAATAAACTGGGCATT
<b>TotA</b>	TCAACTGCTCTTATGTGCTTTGC	CTCACGATCTTCGTCGGAATAG
<b>Cys</b>	TGTATTTTGGGTCTGGTTCTCG	CTCCTTCTGCTGTTTCCCTC
<b>CG11854</b>	AAAGCGGTATCAAGGAGCTGG	GATTGCGTCCGATTTTGAAC TTC
<b>mmp1</b>	TCAGTGTTCCATAGTCGTAGGCA	GGTAGATAGCCGAACTGGGAC
<b>rpr</b>	TGGCATTCTACATACCCGATCA	CCAGGAATCTCCACTGTGACT
<b>egr</b>	CAGCTGATCCCCCTGGTTTT	GCCAGATCGTTAGTGCGAGA
<b>Ku80</b>	ATGGCTTCTAACAAGGAATGCC	AGAATCTCCGCCACACATTTTG
<b>Xrp1</b>	GTATCGACATCAACCAGGAGC	GCGAGATAGGGGTCCTCTGA
<b>Corp</b>	CAGCTTGAAGGTTCTCTCCAG	GGGAGATGACCTCTTCGTAAGT
<b>dilp8</b>	ACGCACAACAAGCATCACTAC	AGTTCGCTGAGGCGATTGAAG
<b>Nlaz</b>	ACGCCAACTACAGTCTCATAGA	CGAGGGTTGTCCGGTGAATC
<b>puc</b>	AGC GAT ACG CCA CAT CAG AAC	ACT TGT ACC GCA TGA CGT AGG
<b>upd3</b>	ATCCCCTGAAGCACCTACAGA	CAGTCCAGATGCGTACTGCTG
<b>daw</b>	CGGTTCCAGGTGTTTCAGC	ATCCTTCGTCCGCATCCTAAG
<b>upd2</b>	TCTTCTGCTGATCCTTGCGGAACT	AGCTAAAGACTTGGTACCGCCACA
<b>nplp1</b>	TTTGGGCGACCCCGATTA	CTCTTCGGATTAAGGAGG
<b>pri-mir-305</b>	ATCAGGTGCTCTGGTGTGTCT	CTTGATCGGTCGCTTTTCGT
<b>dcr1</b>	CATTGCGTTCACCTCCAAG	TACTGCCGCTCGTTAGCATT
<b>drosha</b>	TTTCACCCACTTGACCCTTG	ATTCCCAAATCATCGCAAC
<b>egr.prom (ChIP)</b>	TTTCCCTCAGTTCACGCTCC	CTTCGCTATCATGCACGCAC
<b>rpr.prom (ChIP)</b>	TGTCAGGTTGGTTCTTCCACT	GTCGATGCACGCTGAGTGA
<b>egr.3UTR (ChIP)</b>	TCGCCAGCGTGAATCCATTA	CACGCTTACACAAGCGGGTA
<b>egr.l1 (ChIP)</b>	CTCCAAAAACCATCACAAACGACA	CTAGAAGGCGGTTTCATGGCT

### 3.6. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cuantificación se realizó con nanodrop con 1 microlitro de muestra (The Thermo Scientific NanoDrop 2000/c)

### 3.7. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

El ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina fue realizado de acuerdo al protocolo establecido por modEncode (89). Se diseccionaron 50 larvas L3 para realizar el ensayo de inmunoprecipitación de p53 con anticuerpo específico (DSHB; 7A4). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el ADN se encuentran listados en la tabla (**Tabla 3**).

### 3.8. Análisis estadístico.

Los conjuntos de datos de alas fueron realizados por triplicado y analizados con la prueba t de Student, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism. Los resultados de RT-qPCR (triplicado biológico) fueron analizados con la prueba t de Student y el software GraphPad Prism. Las diferencias significativas con respecto a sus controles se marcaron con asteriscos sobre las barras de los gráficos: (\*) representa  $p < 0,05$  y (\*\*) representa  $p < 0,01$ . Los datos detallados (n, valores promedio, errores y estadísticas) de cada experimento se encuentran en la **Tabla 8** del Anexo.

### 3.9. Análisis del microarreglo.

Para identificar genes y vías de señalización involucradas en el proceso de coordinación del crecimiento se llevó a cabo un análisis de expresión génica por microarreglo. El análisis se realizó en una plataforma Affimetrix (Genomic Core Facility, IRB Barcelona) a partir de ARN obtenido de discos de ala de los genotipos enGal4,UAS-GFP vs enGal4,UAS-GFP,UAS-RA<sup>cs</sup> (triplicados biológicos). Los datos crudos fueron tratados con la metodología GCRMA (90) para la normalización y corrección de “ruido” con la colaboración del Dr. Agustín Arce (IAL CONICET). Los genes que presentaban un log FC (Fold Change) mayor a 0,5 y un p-Value menor a 0,1 fueron seleccionados para ser analizados con diferentes programas informáticos.

Agrupamiento de genes de acuerdo a características (GO): se realizó un agrupamiento de genes de acuerdo a características compartidas como funciones moleculares, procesos biológicos y dominios proteicos para analizar enriquecimiento en vías que pudieran ser específicas de coordinación del crecimiento. Diferentes software fueron utilizados: DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) (91,92), Metascape (<http://metascape.org>) (93), Flymine (<http://www.flymine.org/>) (94) y Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) (95) con resultados similares.

Análisis comparativo de microarreglos: para identificar genes blancos de Dp53 en coordinación del crecimiento, se contrastaron los resultados del microarreglo con otros análisis de expresión génica que involucran a p53 (**Tabla 4**). Dos microarreglos disponibles en la base de datos de ArrayExpress del EBI (European Bioinformatic Institute, EMBL) fueron utilizados, y los datos fueron extraídos con el software GEO2R. Como criterio de selección, escogimos aquellos genes que: i) presentaban un Log FC > 0,5 y un p-Value < 0,1 (línea de corte) y ii) se comportasen de forma similar entre los distintos experimentos, por ejemplo: genes que se inducen en coordinación del crecimiento y se inducen también en otros microarreglos de forma dependiente de p53.

Tabla 4. Microarreglos utilizados para identificar blancos de p53			
Nº de GEO	Fuente	Abreviatura	Información
GSE2780	Akdemir <i>et al.</i> (96)	Akdemir 2007	Comparación entre embriones controles, y mutantes para p53 en condiciones de IR.
GSE37404	van Bergeijk <i>et al.</i> (97)	van Bergeijk 2012	Comparación entre discos de ala controles y mutantes para p53 en condiciones de IR.

Análisis de ChIP-seq: datos experimentales de ChIP-seq específicos para p53 fueron utilizados para identificar regiones regulatorias cercanas a los genes blancos putativos del análisis previo. Se

consideraron aquellos genes que se encontraran a menos de 2kb de distancia de un sitio de unión de p53 experimental. Los experimentos utilizados se encuentran brevemente descriptos en la **Tabla 5**.

<b>Tabla 5. Experimentos de Inmunoprecipitación de p53 utilizados para identificar regiones regulatorias</b>			
<b>Identificación</b>	<b>Información</b>	<b>Cantidad de genes identificados en el estudio</b>	<b>Fuente</b>
Merlo 2014	ChIP-chip de cabezas de moscas adultas control y sobrepresantes de tau	~1500	Merlo <i>et al.</i> , 2014 (98)
White 2016	ChIP-seq de embriones p53-MIMIC-GFP con anticuerpo específico anti-GFP.	~1900	Base de datos de ModENCODE. (99)

## 4. Resultados

Como se describió previamente, la presente investigación tiene como finalidad comprender el crecimiento coordinado entre las diferentes poblaciones celulares que componen un tejido en desarrollo evidenciado a través de una situación de estrés. Esta coordinación es necesaria para mantener las proporciones finales del tejido. Sus efectos pueden observarse mediante la generación de poblaciones celulares que crecen diferencialmente dentro de un mismo tejido. En respuesta a esto, las células más afectadas envían señales a sus vecinas produciendo una reducción en el crecimiento de las últimas. Estas señales dependen del factor de transcripción p53, por lo que es eje fundamental de nuestro trabajo entender como p53 modula dicha señalización.

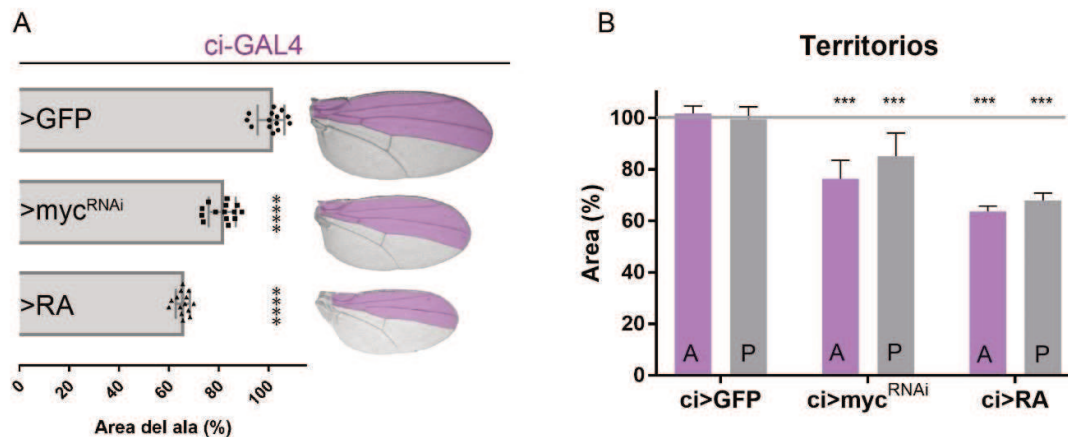
Resumidamente, los resultados que forman parte de esta tesis derivan del estudio del proceso de coordinación en el ala de *Drosophila*, un tejido simple y bien caracterizado, como tejido modelo. Inicialmente validamos el uso de las herramientas genéticas propuestas para el estudio de este proceso e identificamos la presencia de señales corriente abajo del factor de transcripción p53, el cual se ha demostrado esencial para este proceso. Posteriormente se detalló un mecanismo molecular que ocurre en las células afectadas y que produce la señalización hacia el resto de las células. Finalmente, se realizó una caracterización de moléculas que podrían intervenir en la activación de p53; y estudiamos el ruido biológico y la contribución de las moléculas encontradas en la robustez del crecimiento.

### 4.1. Estudio de coordinación del crecimiento utilizando el primordio de ala de *Drosophila melanogaster*.

Previamente se ha demostrado que el ala de *D. melanogaster* es un tejido óptimo para estudiar los efectos de coordinación que ocurren durante el desarrollo y que sostienen la proporcionalidad (1). Las células que componen los distintos compartimentos del ala permiten que los mismos crezcan coordinadamente. De forma que, al finalizar el desarrollo, estos sean proporcionados entre sí. Empleando el sistema de expresión binario GAL4-UAS es posible dirigir la expresión de diferentes construcciones genéticas en un grupo específico y bien estudiado de células. El uso de los constructos  $UAS-RA^{CS}$  ( $RA$ ) o  $UAS-myc^{RNAi}$  ( $myc^{RNAi}$ ) permite generar una disminución en la síntesis de proteínas que impacta en el crecimiento; mientras que las líneas  $en-GAL4$  ( $en>$ ) y  $ci-GAL4$  ( $ci>$ ) permiten dirigir la expresión hacia una parte del disco de ala (territorio), posterior y anterior respectivamente. Durante este trabajo hemos utilizado diferentes combinaciones de estas herramientas para demostrar que los resultados son independientes de la herramienta utilizada (Ricina o  $myc^{RNAi}$ ) y que los efectos ocurren independientemente del territorio afectado.

Mediante el uso de las herramientas genéticas mencionadas afectamos el crecimiento del compartimento anterior ( $ci>myc^{RNAi}$  y  $ci>RA$ ) y observamos que esto produce un impacto en el tamaño total del ala (**Figura 18.A**). Esta disminución es producida por el estrés generado en las células afectas del dominio anterior (compartimento autónomo) (**Figura 18.B**). A su vez, el dominio posterior, que no es manipulado genéticamente (compartimento no autónomo), también reduce su tamaño (**Figura 18.B**). Dado que los compartimentos reducen su crecimiento de forma

proporcionada podemos evidenciar que existen condiciones de simetría que son robustas durante el desarrollo de los tejidos, fenotipo que se ha nombrado como “acomodación”.

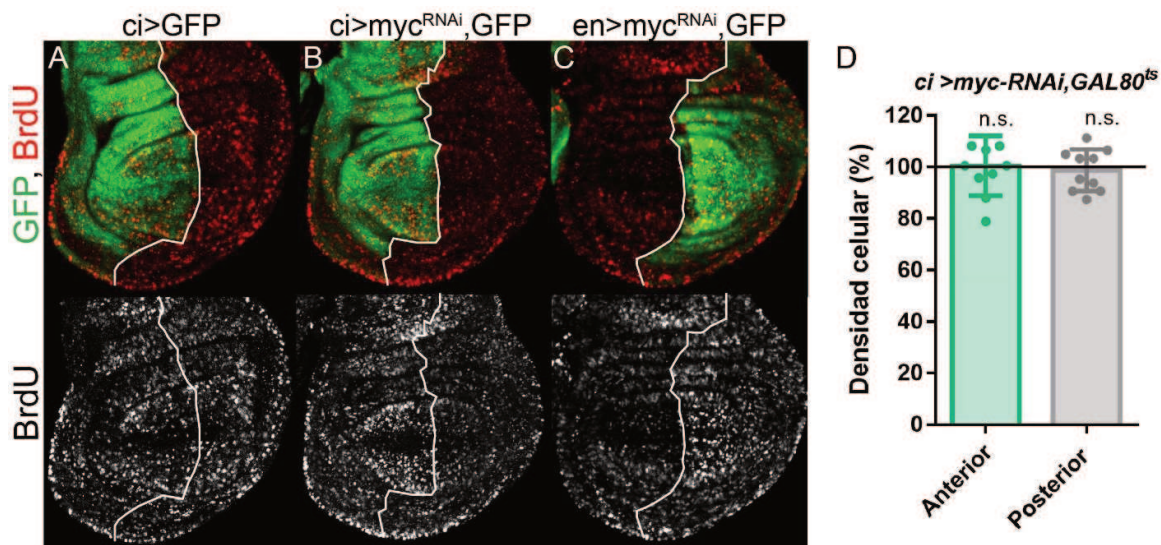


**Figura 18. Coordinación del crecimiento intra-tejido.** (A) Cuantificación del tamaño total de alas adultas de los genotipos *ci>myc<sup>RNAi</sup>* y *ci>RA* relativizadas al genotipo control (*ci>GFP*). A su lado se encuentran imágenes de alas adultas representativas de cada genotipo en donde se marca el compartimento anterior en púrpura. (B) Cuantificación del tamaño de los compartimentos anterior (A) y posterior (P) de los genotipos antes mencionados.

#### 4.1.1. Regulación del número de células mediante proliferación.

En estudios previos se demostró que un tejido afectado puede ajustar la cantidad de células que lo componen mediante la regulación en la proliferación celular (1). De esta manera los tejidos son capaces de mantener una densidad celular constante aún en condiciones de estrés. Para visualizar la proliferación celular se utilizó la técnica de incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU). El BrdU es un análogo a la Uridina, por lo que a través de su inmunotinción es posible marcar las células que se encuentran en fase S y por tanto en proliferación activa en los compartimentos del disco de ala.

En los primordios de ala control podemos observar que la marca de BrdU se presenta igualmente abundante en ambos compartimentos en condiciones normales de crecimiento (**Figura 19.A**). Sin embargo, cuando afectamos el crecimiento en uno de los compartimentos utilizando *myc<sup>RNAi</sup>*, es posible ver que la marca de BrdU es menos abundante en el compartimento no autónomo, es decir el compartimento no afectado genéticamente (**Figura 19.B-C**). Esto sucede tanto cuando afectamos el crecimiento en el compartimento anterior (**Figura 19.B**) como el posterior (**Figura 19.C**), marcados con GFP en cada caso. Además se cuantificó la cantidad de células por unidad de área en las alas adultas de moscas control y moscas que expresan *myc<sup>RNAi</sup>* en el dominio anterior (*ci>myc<sup>RNAi</sup>, GAL80<sup>ts</sup>*) de manera de medir la densidad celular (**Figura 19.D**). Como resultado encontramos que la densidad celular se mantiene constante cuando relativizamos cada compartimento con su control, demostrando que existe un ajuste en la velocidad de proliferación en los tejidos afectados.

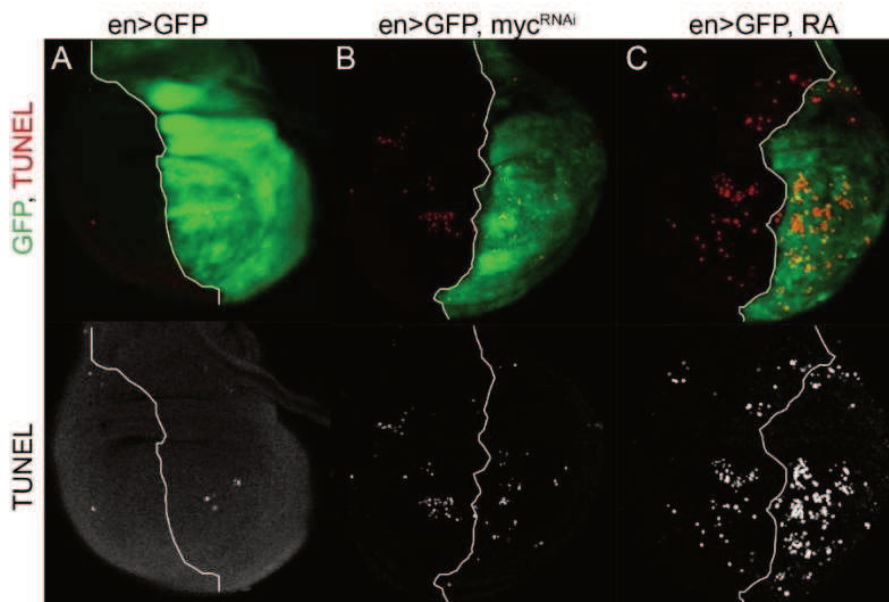


**Figura 19. Ajuste de la tasa de proliferación.** (A-C) Inmunotinción de discos imaginales de ala luego de realizar la incorporación de BrdU. Con GFP se marca el compartimento afectado (autónomo) en los genotipos señalados. (D) Cuantificación de la densidad celular de los compartimentos anterior y posterior del genotipo *ci>mycRNAi, GAL80<sup>ts</sup>* relativizado con alas control.

#### 4.1.2. Regulación del número de células mediante muerte celular.

El número de células y la forma de un tejido también pueden ser moldeados mediante muerte celular programada, un proceso llamado apoptosis. Este proceso se encuentra regulado por enzimas caspasas, las cuales luego de ser activadas son capaces de fragmentar el ADN provocando la muerte. En el contexto de acomodación la activación de las caspasas juega un papel fundamental en el ajuste del número células. Previamente se demostró que las mismas se activan en el compartimento autónomo y que median el proceso de coordinación de una manera desconocida (1). Existen diferentes marcadores de apoptosis, en el presente trabajo utilizamos el kit enzimático TUNEL el cual marca el ADN fragmentado indicativo de la fase final del proceso. En las imágenes de los primordios de ala es posible observar que en condiciones normales los mismos presentan poca o nula marca de TUNEL (**Figura 20.A**), mientras que en condiciones de coordinación del crecimiento la marca de TUNEL se evidencia en el compartimento autónomo (marcado con GFP) y también en el compartimento no autónomo (**Figura 20.B-C**). Estos resultados indican que la apoptosis ocurre tanto en las células con Ricina como en las células vecinas demostrando la presencia de señales que permite comunicarlas entre sí.





**Figura 20. Muerte celular programada en el proceso de coordinación del crecimiento.** (A) Disco imaginal de ala control teñido con TUNEL, con GFP se marca el compartimento posterior. (B-C) Marcas apoptóticas en tejidos *en>myc<sup>RNAi</sup>* y *en>RA* pueden ser evidenciadas en ambos compartimentos, autónomo (marcado con GFP) y no autónomo.

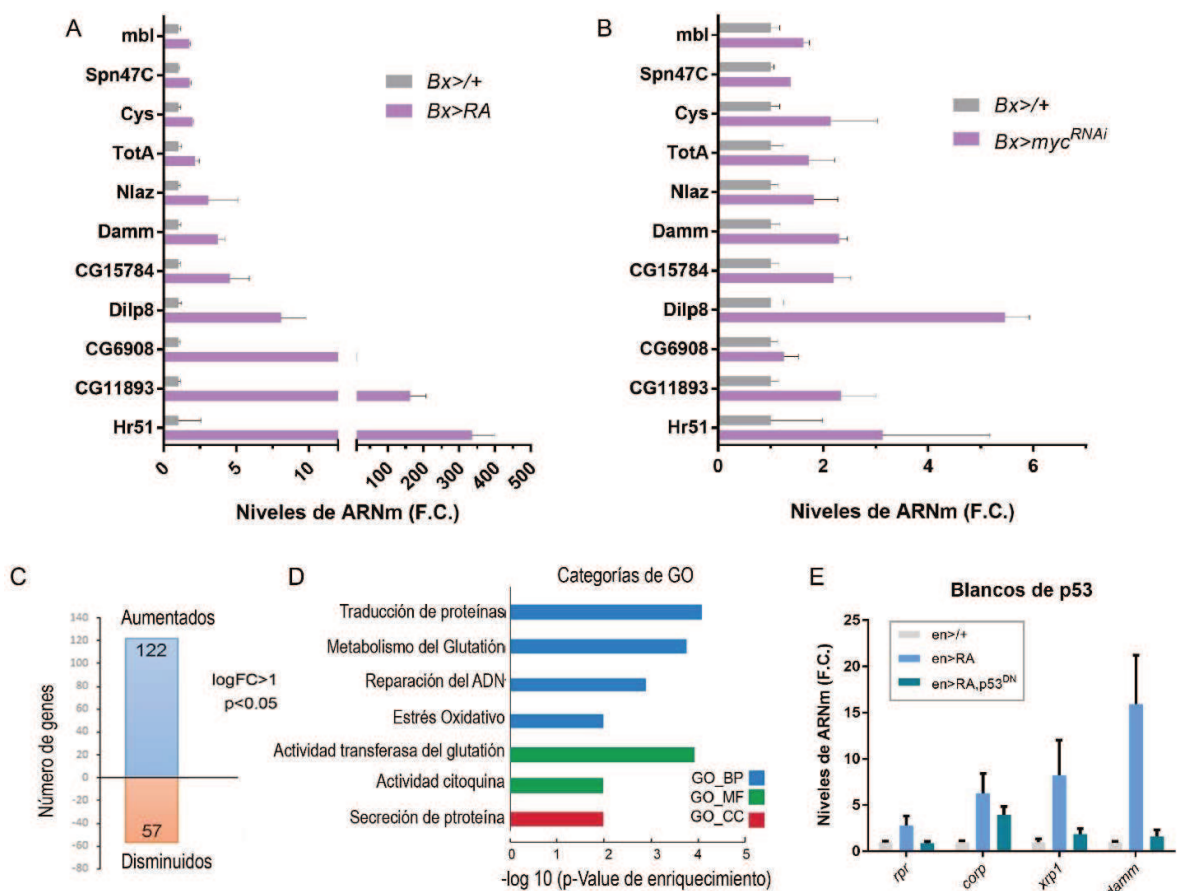
#### 4.1.3. Cambios transcripcionales en coordinación del crecimiento y rol de p53.

En el contexto de acomodación, p53 participa en los mecanismos que sostienen la simetría del desarrollo intra-tejido (1). Individuos que no poseen p53 son incapaces de coordinar el tamaño del tejido y por lo tanto el ala pierde su proporcionalidad. Sin embargo, se desconoce con claridad el mecanismo molecular que tiene lugar corriente abajo de p53 y que permiten la señalización no autónoma. Dado que p53 es un factor de transcripción y sus principales funciones derivan de su capacidad para generar cambios transcripcionales específicos, se estudió la respuesta transcripcional en las células de los primordios de ala en este contexto.

Con el fin de profundizar en dicha dirección establecimos una colaboración con el grupo del Dr. Marco Milán (IRB de Barcelona), el cual realizó un análisis de microarreglo (**Tabla 6 Anexo**). Para ello, se diseccionaron los compartimentos posteriores de los discos imaginales de los genotipos control (*en>GFP*) y discos afectados con Ricina (*en>RA*). Genes diferencialmente expresados en este análisis ( $\log_{2}FC > 0,5$  y  $p\text{-Value} < 0,1$ ) fueron además validados por RT-qPCR en discos con Ricina (*Bx>RA*) y discos con *myc<sup>RNAi</sup>* (*Bx>myc<sup>RNAi</sup>*) (**Figura 21.A-B**). Resultados similares fueron obtenidos utilizando ambas herramientas genéticas, indicativo de una respuesta transcripcional propia del proceso de acomodación.

Mediante el análisis de microarreglo se encontraron 122 genes inducidos y 57 reprimidos de forma transcripcional en este contexto (**Figura 21.C**), los cuales se encuentran enriquecidos en procesos de: traducción de proteínas, metabolismo del glutatión, reparación del ADN y repuesta oxidativa entre otros (**Figura 21.D**). Una respuesta transcripcional mediada por p53 se evidencia al medir sus genes blancos conocidos (**Figura 21.E**). Estos genes se inducen en los primordios en coordinación del crecimiento o acomodación, mientras que en las mismas condiciones los discos

que expresan una versión dominante negativa de p53, *UAS-p53<sup>DN</sup>* (*p53<sup>DN</sup>*), poseen comprometida la inducción de estos genes (**Figura 21.E**). Esta versión de p53 posee la secuencia que codifica para la proteína p53 con una mutación puntual que genera el cambio de una Histidina por una Asparagina en el sitio de unión al ADN y que por tanto inhabilita su función (100), de manera que representan blancos transcripcionales putativos de p53 en el contexto de coordinación del crecimiento.



**Figura 21. Genes diferencialmente expresados en discos imaginales durante la coordinaci6n del crecimiento.** (A) Niveles de expresi6n de ARNm medidos por qPCR de los genotipos *Bx>+/+* y *Bx>RA*. (B) Niveles de expresi6n de ARNm medidos por qPCR de los genotipos *Bx>+/+* y *Bx>myc<sup>RNAi</sup>*. (C) Cuantificaci6n de genes diferencialmente expresados en el microarreglo de discos de ala en coordinaci6n del crecimiento. (D) An6lisis ontol6gico de los genes encontrados. (E) Niveles de transcritos medidos por RT-qPCR de los genes *rpr*, *corp*, *xrp1* y *damm* en los genotipos indicados.

#### 4.1.4. An6lisis de blancos putativos de p53 durante la coordinaci6n del crecimiento.

Con el universo de genes identificados previamente, nos preguntamos cu6les de ellos podr6an ser regulados por p53 y mediar los efectos de coordinaci6n del crecimiento. Para encontrar una lista de genes candidatos acotada realizamos un abordaje *in-silico* seguido de uno *in-vivo*.

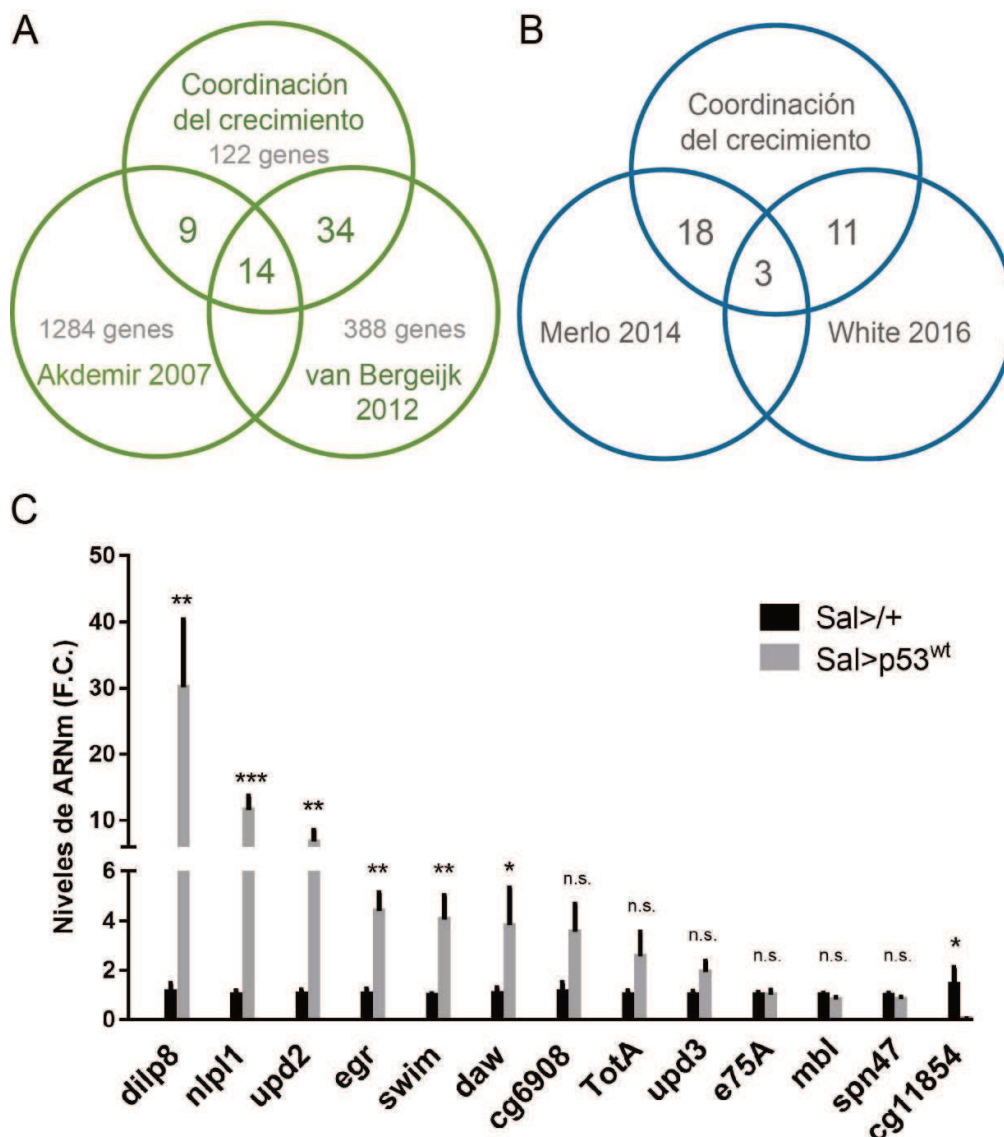
En primera instancia identificamos entre los genes diferencialmente expresados en el contexto de coordinaci6n del crecimiento aquellos que son regulados por p53 tambi6n en otros contextos. Para ello acudimos a la base de datos p6blica de ArrayExpress, la cual dispone de resultados de dos estudios previos en *D. melanogaster* que abordan el rol de p53 en respuestas a radiaci6n. Al

contrastar los tres microarreglos, encontramos que 57 genes inducidos en acomodación también son inducidos de forma dependiente de p53 en contexto de estrés radioactivo (96,97) (**Figura 22.A**).

Paralelamente, consideramos dos análisis previos de ChIP específicos para p53 e identificamos los genes que se encuentran cercanos (menos de 2kb) a sitios de unión de p53 (**Figura 22.B**). En este análisis encontramos que 32 genes de los 122 inducidos se encuentran cercanos a un pico de p53.

De los genes candidatos preseleccionados por los análisis *in-silico* tomamos una lista de 13 ligandos extracelulares como posibles señalizadores de la coordinación, y observamos si estos eran capaces de inducirse ante la sobreexpresión de p53. Para ello realizamos una inducción de p53 específicamente en el disco de ala (*sal>p53<sup>wt</sup>*) de forma controlada por 12-16hs utilizando el constructo GAL80<sup>ts</sup> y posteriormente medimos los niveles de ARNm de los genes candidatos (**Figura 22.C**). Entre estos candidatos encontramos 6 genes que se inducen ante la sobreexpresión de p53 mientras que 5 de ellos no mostraron cambios significativos y tan solo uno redujo su expresión (de forma opuesta a lo esperado).

Además, en el laboratorio del Dr. Marco Milán se realizó un análisis funcional no sesgado (“*screening*”) utilizando una biblioteca de 100 líneas de ARN de interferencias (ARNi) capaces de disminuir la expresión de genes que codifican para distintas proteínas extracelulares (**Tabla 7 Anexo**). Dentro de este análisis se incluyeron, de acuerdo a la disponibilidad, la mayoría de los genes candidatos. El análisis consistió en evaluar el tamaño del compartimento posterior y anterior de alas de moscas de genotipo *en>RA+ARNi*. El resultado de este análisis solo mostró a *eiger* como gen candidato necesario para mantener la simetría entre los compartimentos. Curiosamente, *eiger* es uno de los pocos genes que aparece como blanco putativo de p53 en nuestro análisis *in-silico*, se encuentra cercano a un pico de p53 y además se induce ante la sobreexpresión de p53 en discos de ala por lo que hipotetizamos que el mismo es un blanco de p53 importante para la comunicación celular durante el proceso de coordinación.



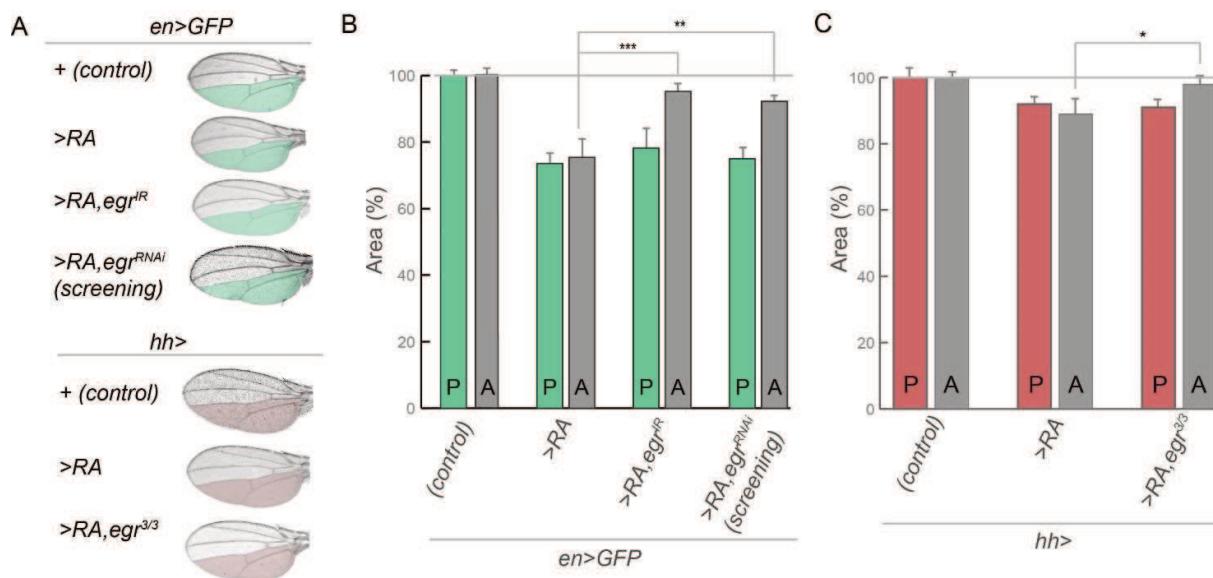
**Figura 22. Genes blancos putativos de p53.** (A) Diagrama de Venn muestra la cantidad de genes que son diferencialmente inducidos en el contexto de coordinación del crecimiento y además se expresan de forma dependiente de p53 en otros contextos. (B) Diagrama de Venn muestra la cantidad de genes inducidos en acomodación y que además se encuentran cercanos a un pico de p53 reportado. (C) Cuantificación de los niveles de ARNm de genes que codifican para proteínas extracelulares seleccionados como candidatos en los genotipos control (Sal>/+) y sobrexpresante de p53 (Sal>p53<sup>wt</sup>).

#### 4.2. Estudio de *eiger* en la coordinación del tamaño del tejido.

Los resultados de los análisis *in silico* e *in vivo* previos llevaron a profundizar en el estudio de Eiger como molécula señalizadora en el contexto de coordinación del crecimiento. El gen de *eiger* codifica para una proteína de membrana homóloga al factor de necrosis tumoral *alpha* de mamíferos (*TNF-alpha*). Su dominio extracelular puede escindir-se dejando libre un ligando capaz de activar la vía JNK en la misma célula o en células vecinas.

Para validar los resultados del screening se utilizó un "inverted repeat" de *eiger*, UAS-*eiger*<sup>IR</sup> (*eiger*<sup>IR</sup>), capaz de disminuir los niveles de ARNm de *eiger* (101). Mediante la cuantificación de las alas adultas encontramos que los animales con pérdida de función de *eiger* son incapaces de disminuir el tamaño del compartimento no-autónomo (Figura 23.A-B). Resultado que evidencia que

Eiger es necesario en las células estresadas para generar el efecto de coordinación sobre las células vecinas. Por otro lado, utilizamos una línea mutante nula para *eiger* (*egr<sup>3</sup>*) la cual posee una inserción que interrumpe al gen y por tanto se trata de una mutante nula (101). Esta línea se utilizó en combinación con la línea *hh-GAL4* (*hh>*) que dirige la expresión específicamente hacia el territorio posterior al igual que la línea *en>*. Cuantificamos las alas adultas y observamos que los individuos mutantes para *eiger* son incapaces de coordinar el tamaño de los compartimentos (Figura 23.A-C) lo que consolida la idea de que Eiger posee un rol funcional en este contexto.



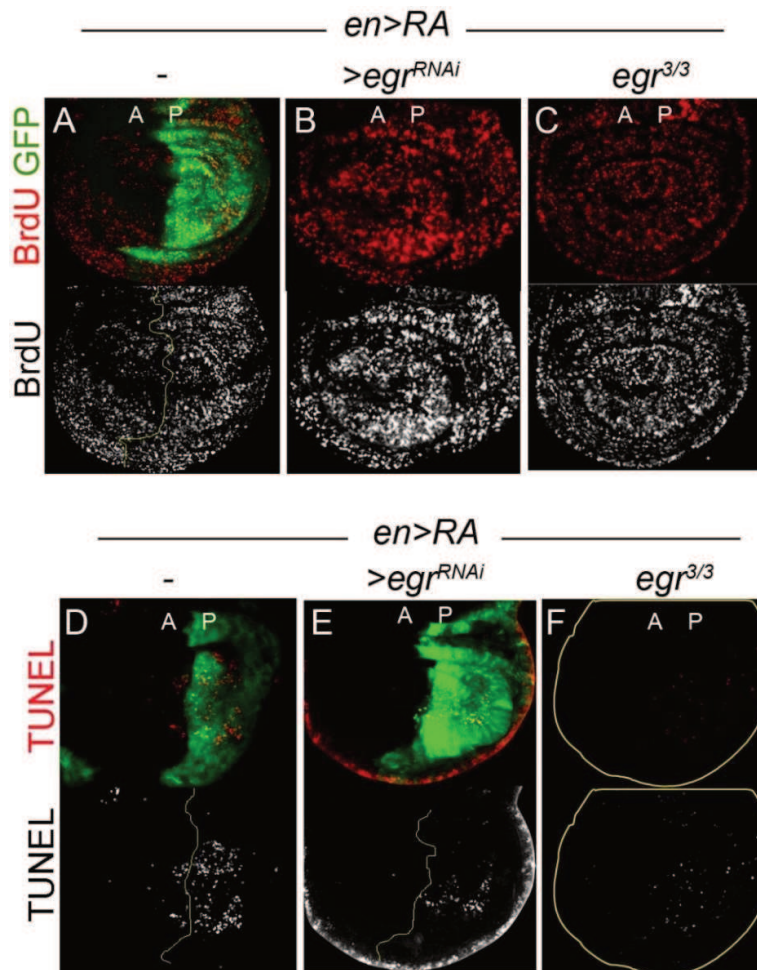
**Figura 23. Rol de *eiger* en el crecimiento coordinado intra-tejido.** (A) Imágenes de alas adultas representativas de cada genotipo analizado en donde se marca el compartimento autónomo (posterior). (B-C) Cuantificación del tamaño de los compartimentos anterior (A) y posterior (P) relativizado a los genotipos correspondientes. Análisis estadístico completo puede encontrarse en Tabla 8 Anexo.

#### 4.2.1. Estudio de *eiger* en la coordinación del número de células del tejido.

La regulación del tamaño y del número de células de un tejido son procesos que pueden ser diferenciados y estudiados individualmente. Como se comentó previamente, un tejido es capaz de regular el número de células mediante una disminución en la tasa de proliferación en el territorio no autónomo y mediante apoptosis (ver 1.3.4). Estos procesos dependen de la activación de la vía apoptótica mediada por caspasas en las células que expresan Ricina (dominio autónomo). Evaluamos entonces si Eiger es capaz de mediar la regulación en el número de células mediante estos procesos.

Para observar proliferación, realizamos inmunotinción en discos imaginales de ala luego de la incorporación de BrdU en individuos que expresan Ricina (*en>RA*) y también en individuos que bajo las mismas condiciones expresan *UAS-eiger<sup>RNAi</sup>* (*en>RA, egr<sup>RNAi</sup>*) (Figura 24.A-B). Observamos que los individuos *en>RA, egr<sup>RNAi</sup>* revierten las diferencias de incorporación de BrdU que existen entre los compartimentos del disco de ala. Resultados en el mismo sentido se obtienen cuando se observa la incorporación de BrdU en mutantes nulas para *eiger* (*egr<sup>3/3</sup>*) que expresan Ricina (Figura 24.C).

En las mismas condiciones, analizamos apoptosis utilizando el kit enzimático TUNEL (**Figura 24.D-F**). Los resultados de estos experimentos muestran que individuos control presentan marcas apoptóticas en el compartimento autónomo y también en el no autónomo (**Figura 24.D**), mientras que individuos *en>RA, egr<sup>RNAi</sup>* no poseen marcas de apoptosis en el compartimento no autónomo y una marcada reducción de la apoptosis en el compartimento autónomo (**Figura 24.E-F**). De manera que es posible observar que las funciones de Eiger son importantes para coordinar el número de células del tejido mediante la regulación de la tasa de proliferación y la apoptosis no autónoma.



**Figura 24. Estudio de *eiger* en la coordinación del número de células del tejido.** (A) Disco imaginal control teñidos con la técnica de incorporación de BrdU. (B-C) Las diferencias de incorporación de BrdU entre los compartimentos durante la coordinación se pierden en primordios *egr<sup>RNAi</sup>* y mutantes *eiger*. (D) Primordio de ala control marcado para observar apoptosis (TUNEL) en coordinación del crecimiento. (E-F) Discos *en>RA, egr<sup>RNAi</sup>* y mutante *eiger* (*en>RA, egr<sup>3</sup>*) teñidos con TUNEL.

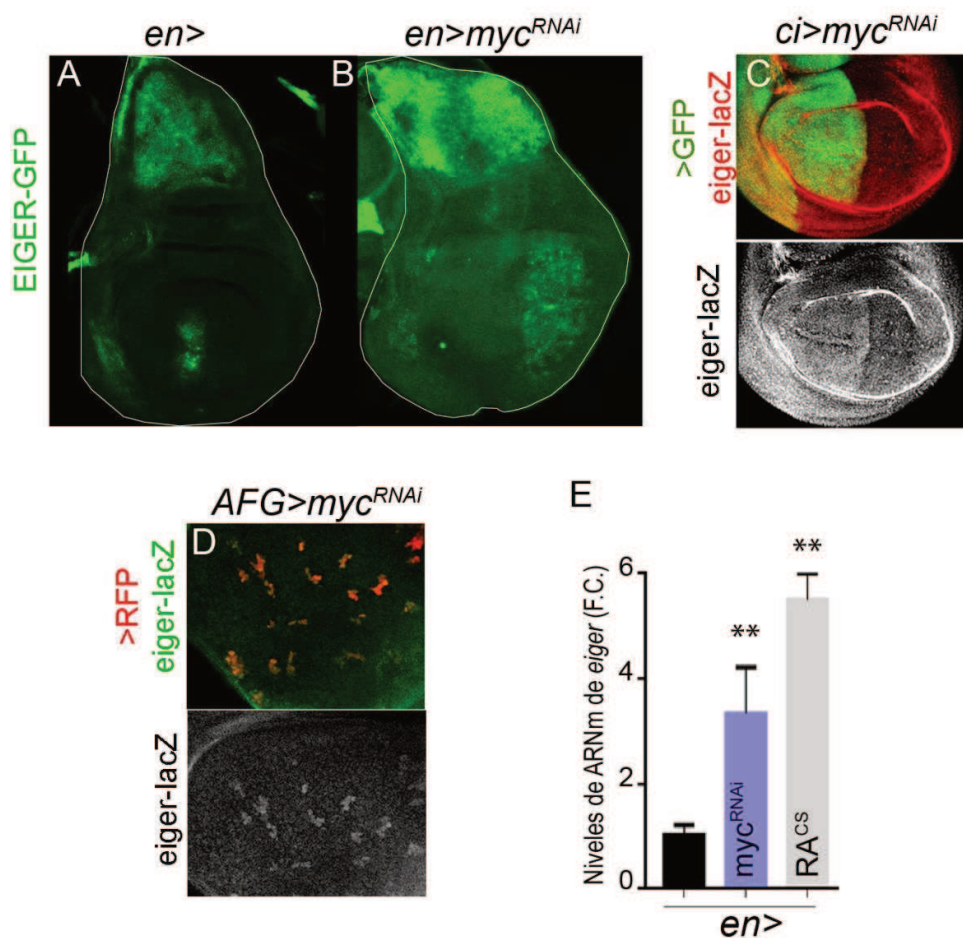
#### 4.2.2. Estudio de la expresión de *eiger* en coordinación del crecimiento.

Para estudiar la expresión de *eiger* en profundidad y validar los datos del análisis de microarreglo utilizamos dos líneas reporteras *egr-lacZ* y *Eiger-GFP*. La primera de ellas es una construcción realizada en el laboratorio del Dr. Basler, que contiene 3 kb de la secuencia promotora de *eiger* (**Figura 44.A Anexo**). La construcción *Eiger-GFP* contiene clonado una porción del locus de *eiger* con 15kb corriente arriba, 15kb corriente abajo y la secuencia que codifica para la proteína GFP dentro del gen de *eiger*, de manera que se genera una proteína de fusión EIGER-GFP (102) (**Figura 44.A Anexo**). Ambas líneas se muestran como herramientas útiles para estudiar la

expresión de *eiger* dado que respetan el patrón de expresión endógeno del gen (103)(**Figura 44.B Anexo**).

El análisis de estas líneas reporteras muestra que, en condiciones de desarrollo normal, *eiger* se expresa principalmente en un grupo muy específico de células del disco de ala llamadas mioblastos (103) (**Figura 25.A**). En condiciones de coordinación del crecimiento (*en>myc<sup>RNAi</sup>* y *ci>myc<sup>RNAi</sup>*) los reporteros se inducen en el compartimento autónomo en la región del “wing pouch” (**Figura 25.B-C**). Además, se realizó un mosaico genético en el que se observó el crecimiento de células que expresan *myc<sup>RNAi</sup>* (clones) en un disco de ala que contiene el reportero *eiger-lacZ* (**Figura 25.D**), donde es posible observar que los clones celulares poseen un aumento de la señal del reportero *eiger-lacZ*.

Posteriormente cuantificamos la expresión del gen endógeno mediante RT-qPCR. Para lo cual, se tomaron discos de alas control y discos inducidos a la coordinación del crecimiento (*en>myc<sup>RNAi</sup>* y *en>RA*). Los mismos se diseccionaron de manera de eliminar la región del “*notum*” que contiene células con altos niveles de expresión de *eiger*. Como resultado se encontró que *eiger* se induce entre tres a seis veces en los primordios de ala de los genotipos mencionados respecto al control (**Figura 25.E**). Finalmente, mediante un experimento de hibridización *in-situ* realizado en el laboratorio del Dr. Milán (IRB, Barcelona) se demostró que *eiger* se encuentra inducido en discos *en>myc<sup>RNAi</sup>* y *en>RA*, en el compartimento autónomo (**Figura 45 Anexo**) lo que sustenta los resultados encontrados con las herramientas reporteras.



**Figura 25. Expresión de *eiger* en primordios de ala durante la coordinación del crecimiento. (A-B)** Discos imaginales de ala con el reportero EIGER-GFP en condiciones control y cuando expresan *myc<sup>RNAi</sup>* en el dominio posterior respectivamente. **(C)** Imagen de primordio de ala de individuos *ci>myc<sup>RNAi</sup>* muestra que el reportero *eiger-lacZ* se induce en el dominio autónomo (anterior) marcado con GFP. **(D)** Mosaico genético en el que se pueden observar inducción del reportero *eiger-lacZ* en clones *myc<sup>RNAi</sup>* marcados con RFP. **(E)** Cuantificación de niveles de expresión de *eiger* por RT-qPCR en discos de ala diseccionados de los genotipos indicados.

### 4.2.3. Expresión de *eiger* corriente abajo de p53.

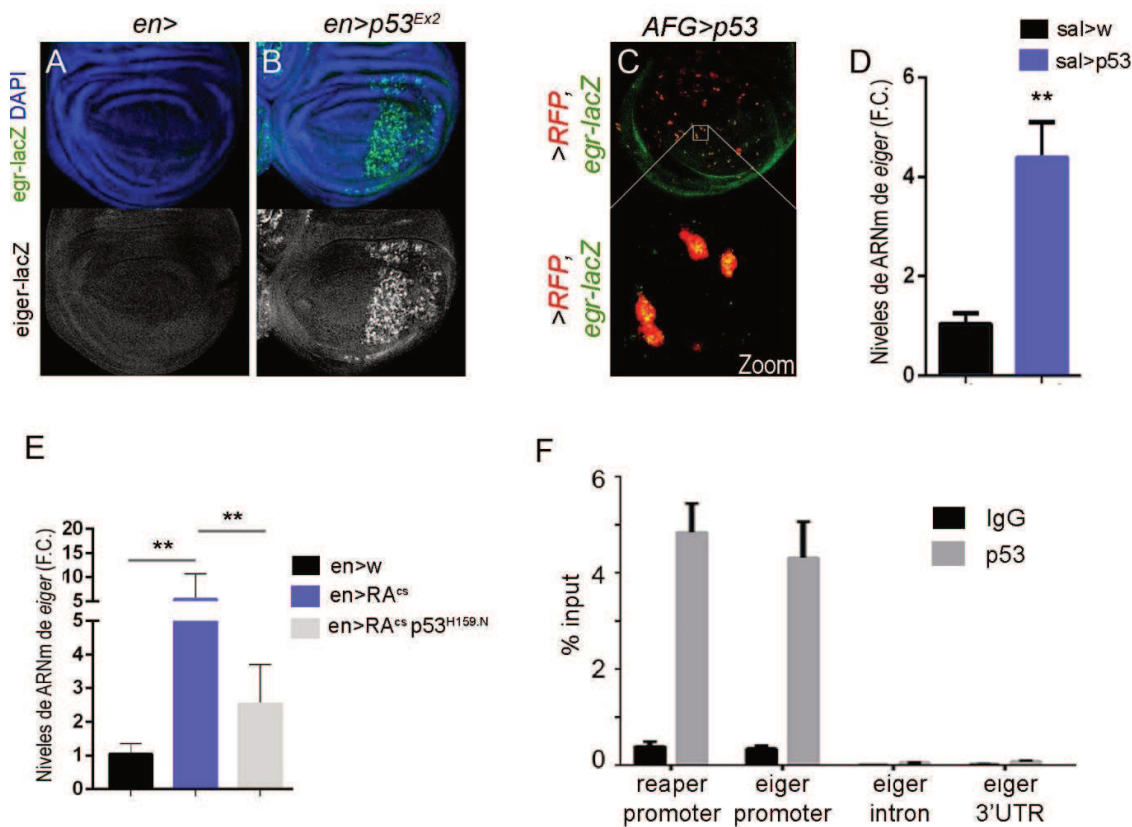
Para validar que p53 y *eiger* actúan en una misma vía en este contexto, consideramos la hipótesis de que la inducción de *eiger* ocurre corriente abajo de p53 teniendo en cuenta los datos *in-silico*.

Para validar esta hipótesis se realizaron experimentos de sobreexpresión de p53 en el disco de ala que poseen el reportero *egr-lacZ* (**Figura 26.A-C**). p53 genera un aumento del reportero cuando se dirige la expresión en uno de los compartimentos del ala (**Figura 26.B**), y también cuando se realiza un mosaico genético con clones que expresan p53 en el primordio (**Figura 26.C**). También se cuantificaron los niveles de expresión del gen endógeno en discos control y discos que expresan p53 en todas las células del “*wing pouch*” (*sal>p53*). La sobreexpresión controlada de p53 (con GAL80<sup>ts</sup>) es capaz de generar una inducción en los niveles de *eiger* de entre tres a cinco veces (**Figura 26.D**).

Para demostrar que la expresión de *eiger* depende de p53 en el contexto de coordinación del crecimiento realizamos la cuantificación de los niveles de ARNm de *eiger* mediante RT-qPCR en discos imaginales de ala control (*en>W*), discos *en>RA* y discos que coexpresan *p53<sup>DN</sup>* (*en>RA,p53<sup>H159.N</sup>*) (**Figura 26.E**). Observamos menores niveles de inducción de transcripto de *eiger* en los individuos *p53<sup>DN</sup>* respecto de individuos que solo expresan Ricina.

Posteriormente se evaluó si la regulación de p53 sobre *eiger* ocurre de forma directa, es decir mediante la regulación de la transcripción, para lo cual realizamos un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina (*Chromatin Immunoprecipitation Assay*, CHIP) seguido de qPCR con un anticuerpo específico para p53. Para ello contactamos al Dr. Federico Ariel, quien nos guió en la realización de este experimento. Se tomó como referencia un CHIP-seq público realizado para p53 en embriones de *Drosophila* en el que se observa un pico significativo de p53 en el promotor de *eiger* (99). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para tres regiones del locus de *eiger*: promotor, primer intrón y 3'UTR. Además, se utilizó un par de oligonucleótidos para amplificar el promotor de *reaper*, un blanco conocido de p53, como control positivo. Los resultados de este experimento muestran que p53 se une a la región promotora de *eiger* con niveles comparables a los de *reaper*, mientras que no se observó amplificación significativa en otras regiones del locus de *eiger* (**Figura 26.F**). Por lo que este resultado junto con los previos, permiten asumir que *eiger* es un blanco transcripcional de p53 en el contexto de coordinación del crecimiento.





**Figura 26. Rol de p53 en la expresión de *eiger* durante la coordinación del crecimiento.** (A-B) Discos imaginales de ala con el reportero *eiger-lacZ* en condiciones control y cuando expresan p53 en el dominio posterior respectivamente. (C) Mosaico genético en el que se pueden observar inducción del reportero *eiger-lacZ* en clones celulares de p53 marcados con RFP. (D) Niveles de ARNm de *eiger* en individuos control (*sal>/+*) e individuos que sobrexpresan p53 en el disco de ala (*sal>p53*). (E) Niveles de ARNm de *eiger* cuantificados por RT-qPCR en primordios de ala de los genotipos indicados. (F) Niveles de enriquecimiento de las secuencias de ADN indicadas en experimento de ChIP con anticuerpo específicos para p53.

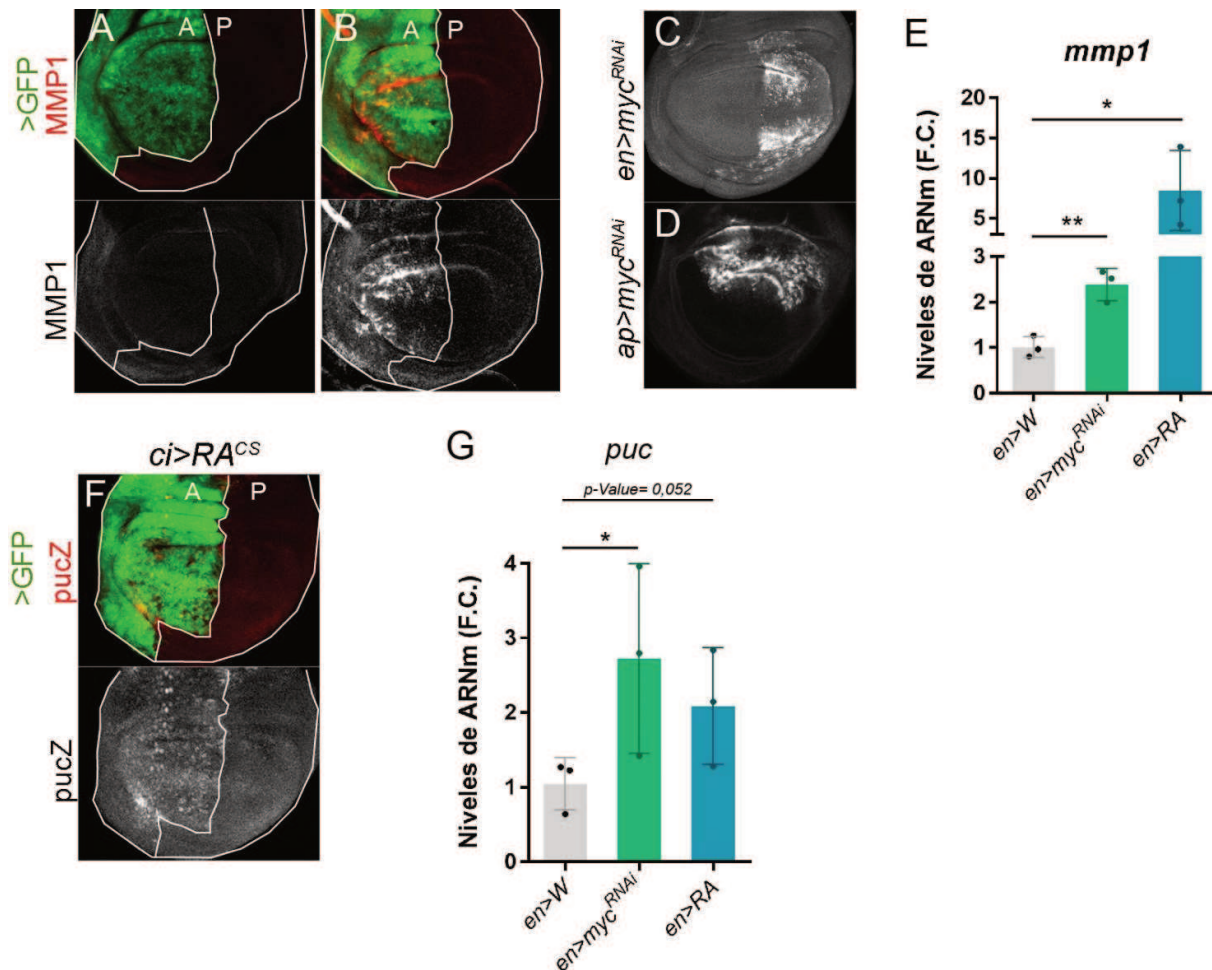
#### 4.2.4. Activación de la vía JNK en coordinación del crecimiento.

La función canónica de Eiger es la de activar la vía de señalización JNK mediante la unión a un receptor de membrana plasmática (101). La vía JNK involucra la participación de quinasas que se activan en cascada y que en última instancia promueve la regulación de genes blancos mediante el factor de transcripción AP-1. Entre los genes blancos más estudiados se encuentran *puckered* (*puc*) y la metaloproteasa de matriz 1 (*mmp1*), por lo que analizamos su expresión en primordios de ala en coordinación del crecimiento.

La expresión de *mmp1* puede ser observada mediante la inmunotinción de discos imaginales utilizando un anticuerpo específico para la proteína MMP1. De esta forma, se encontró mayor marca de la proteína en el compartimento autónomo de discos imaginales de ala que expresan *myc*<sup>RNAi</sup> respecto a las condiciones control (Figura 27.A-D). Esto sucede independientemente del compartimento afectado evidenciando que la activación de la vía puede darse en todas las células del "wing pouch". Además, las medidas de ARNm de *mmp1* por RT-qPCR en discos imaginales de ala demuestran que existe una inducción transcripcional de este gen en este contexto de coordinación (Figura 27.E).

Por otro lado, se observó la activación de *puckered* utilizando la línea enhancer-trap *puckered-lacZ* (*pucZ*), una construcción que posee la secuencia que codifica para la beta-galactosidasa

inserta en el gen endógeno de *puckered* (104). La activación del reportero ocurre en el compartimento autónomo en las condiciones de coordinación del crecimiento estudiadas (**Figura 27.F**). También observamos que existe un aumento en los niveles de transcritos de este gen en discos imaginales que expresan Ricina o *myc*<sup>RNAi</sup> (**Figura 27.G**), por lo que se demuestra que blancos característicos de la vía JNK son activados en el compartimento autónomo en esta condición.



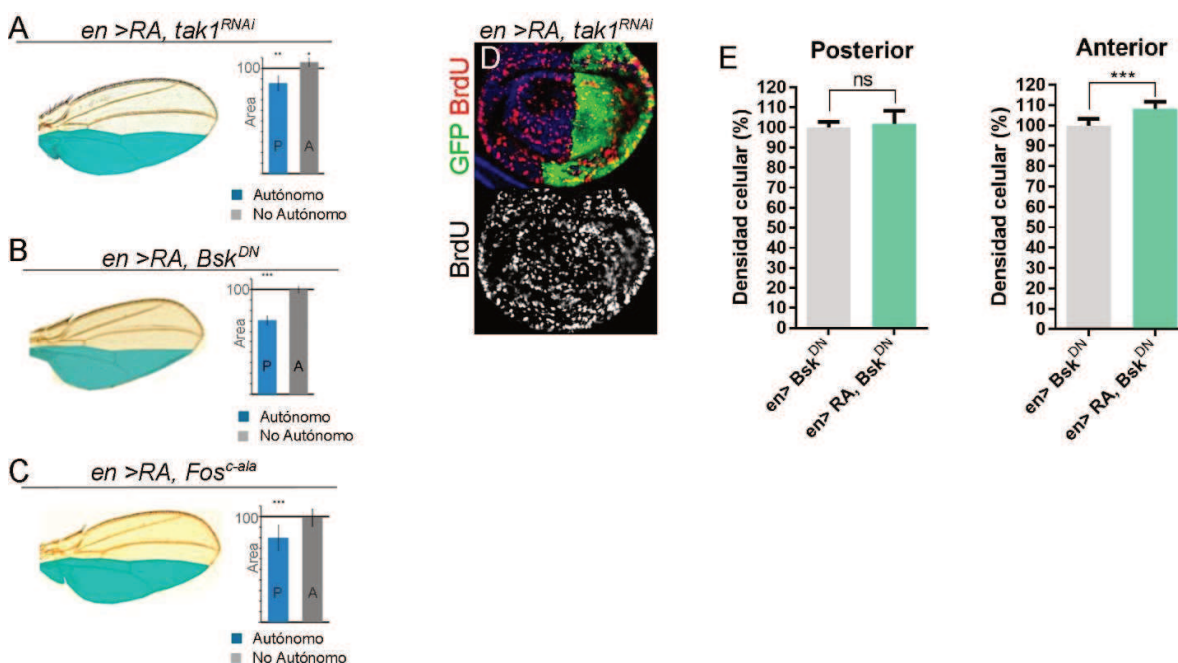
**Figura 27. Activación de la vía JNK durante la coordinación del crecimiento.** (A-D) Inmunotinción de discos imaginales de ala muestran la expresión de MMP1 en los genotipos mencionados. (E) Niveles de ARNm de *mmp1* en primordios de ala en condiciones control (en>W) y en coordinación del crecimiento (en>myc<sup>RNAi</sup> y en>RA). (F) Imagen de disco de ala con reportero *pucZ* en condiciones de coordinación del crecimiento. (G) Cuantificación de los niveles de transcritos de *puckered* en primordios de ala de los genotipos indicados.

#### 4.2.5. Rol de la vía JNK en coordinación del crecimiento.

La activación de *eiger* en el compartimento autónomo y la presencia de los genes blancos característicos de la vía JNK, *mmp1* y *puc*, son datos que señalan la activación de la vía en el contexto de coordinación del crecimiento estudiado. Esta vía de señalización se encuentra conformada por un conjunto de quinasas que se activan por fosforilaciones sucesivas, que intervienen en respuesta a estrés con el fin de retornar a un estado de homeostasis (ver 1.4.3). Por lo que se evaluó si la vía canónica JNK tiene un rol en el contexto de coordinación mediante la intervención genética de las quinasas de la vía.

Para realizar este estudio se utilizaron diferentes herramientas genéticas: ARN de interferencia (RNAi) que disminuye los niveles de la quinasa Tak, *UAS-tak<sup>RNAi</sup>* (*tak<sup>RNAi</sup>*), una versión dominante negativa de Basket, *UAS-Bsk<sup>DN</sup>* (*Bsk<sup>DN</sup>*) y una versión dominante negativa de Fos, *UAS-Fos<sup>c-ala</sup>* (*Fos<sup>c-ala</sup>*). Alas de individuos que coexpresan *en>RA* y las herramientas mencionadas pierden la capacidad de mantenerse simétricas (**Figura 28.A-C**). Las cuantificaciones de los tamaños de los compartimentos de las alas en cada genotipo muestran que los compartimentos no autónomos son incapaces de disminuir su tamaño.

También observamos que los primordios de ala del genotipo *en>RA, tak<sup>RNAi</sup>* no posee una disminución en la marca de proliferación (BrdU) en el compartimento no autónomo (**Figura 28.D**). Además, el número de células que posee el compartimento no autónomo en individuos *Bsk<sup>DN</sup>* en coordinación del crecimiento (*en>RA, Bsk<sup>DN</sup>*) es levemente superior al control (**Figura 28.E**). Lo que demuestra que la vía JNK sería relevante para los efectos no autónomos de crecimiento y proliferación que tienen lugar en el proceso de coordinación.



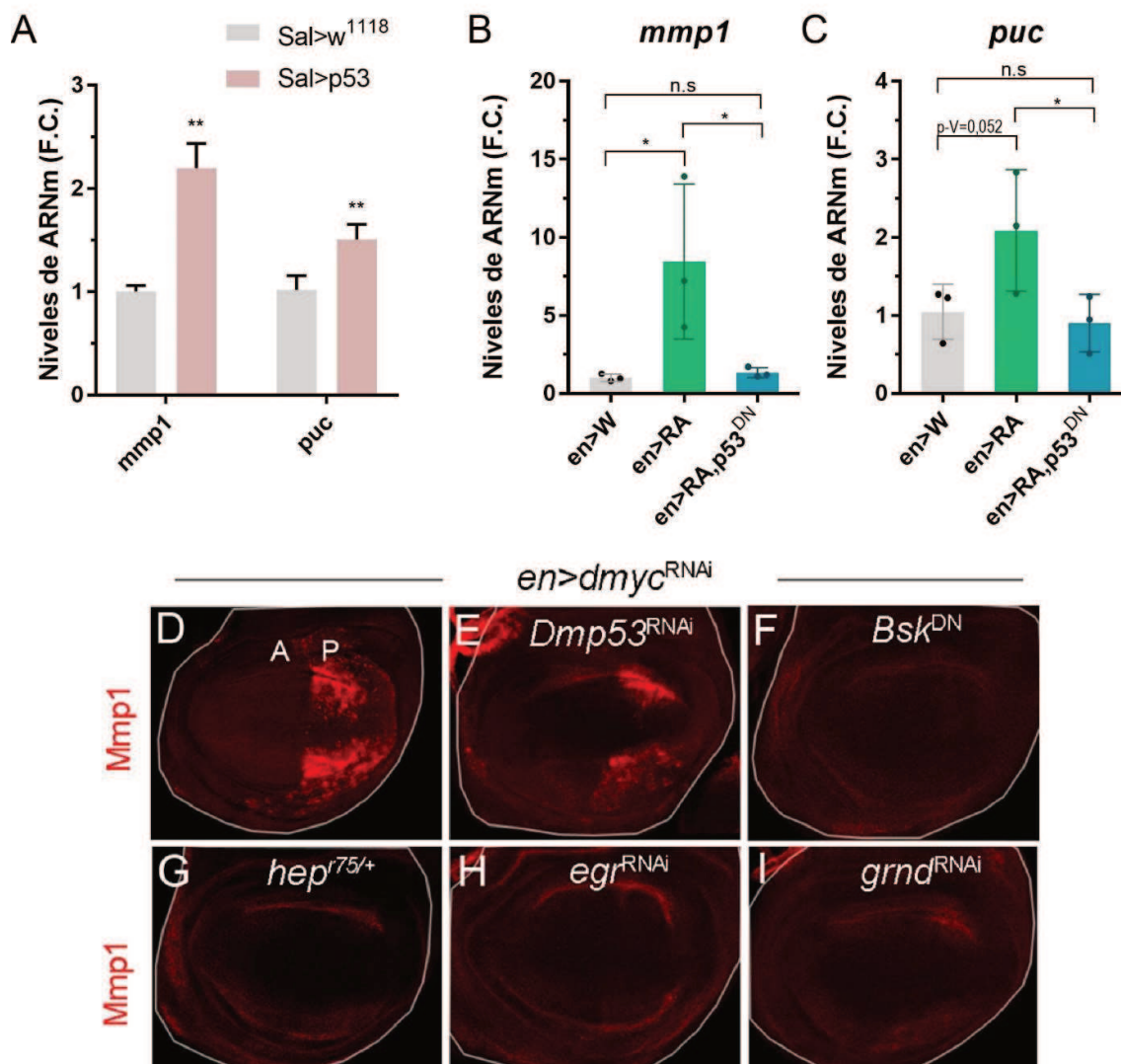
**Figura 28. Función de la vía JNK durante la coordinación del crecimiento.** (A-C) Imágenes de alas de los genotipos indicados y cuantificación del tamaño de compartimentos posterior y anterior, autónomo y no autónomo respectivamente. Los datos del genotipo *en>RA* se encuentran en la tabla 8 del Anexo. (D) Primordio de ala teñido post incorporación de BrdU, en azul DAPI marca los núcleos, en verde (GFP) se marca el dominio autónomo (anterior) y en rojo el BrdU. (E) Densidad celular cuantificada como cantidad de pelos por unidad de área de los compartimentos anterior y posterior de alas adultas de individuos con los genotipos *en>Bsk* y *en>RA, Bsk<sup>DN</sup>*. Los valores de densidad celular de los genotipos *en>GFP* y *en>RA* se encuentran en la tabla 8 del Anexo.

#### 4.2.6. P53 activa la vía JNK mediante Eiger.

En trabajos previos se ha demostrado que la vía JNK se activa junto con p53 en condiciones de estrés determinando el destino celular. Tanto p53 como la vía JNK pueden ser activados de forma epistática (en una misma vía) o bien en vías paralelas mediante diferentes activadores. Además, la vía JNK puede ser activada de forma extracelular, mediante diferentes ligandos y receptores de membrana, o de manera intracelular con la fosforilación de las quinzas que intervienen en la vía

(ver 1.4.3). Por lo que evaluamos si la activación de la vía JNK ocurre de forma dependiente o independiente del mecanismo p53-Eiger.

Inicialmente, se observó que la sobreexpresión de p53 en discos de ala por cortos períodos de tiempo (inducción por 12-16hs) es capaz de inducir los niveles de transcripto de *mmp1* y *puc*, genes blancos de la vía JNK (**Figura 29.A**). También se observó que las inducciones de transcritos de estos genes en condiciones de coordinación del crecimiento dependen de p53 (**Figura 29.B-C**), dado que los primordios de ala en presencia de la versión dominante negativa de p53 (*p53<sup>DN</sup>*) son incapaces de mostrar activación de los blancos de la vía JNK.



**Figura 29. Activación de la vía JNK durante la coordinación del crecimiento.** (A) Niveles de expresión de ARNm de los genes *mmp1* y *puc* en condiciones control y sobreespresantes de p53 en primordios de ala. (B-C) Cuantificación de los niveles de expresión de los mismos genes en condición de coordinación del crecimiento con p53 normal y mutante. (D-I) Inmunotinción de discos imaginales de ala de los genotipos indicados utilizando un anticuerpo específico para MMP1.

Luego se analizaron los primordios de ala teñidos con el anticuerpo específico de MMP1 en discos *en>myc<sup>RNAi</sup>* y en condiciones reducidas de p53 (*en>myc<sup>RNAi</sup>,p53<sup>RNAi</sup>*) (**Figura 29.D-E**). En los cuales es posible observar que los niveles de MMP1 disminuyen considerablemente cuando se interviene con los niveles de p53. De la misma manera intervenimos la vía JNK, utilizando la versión

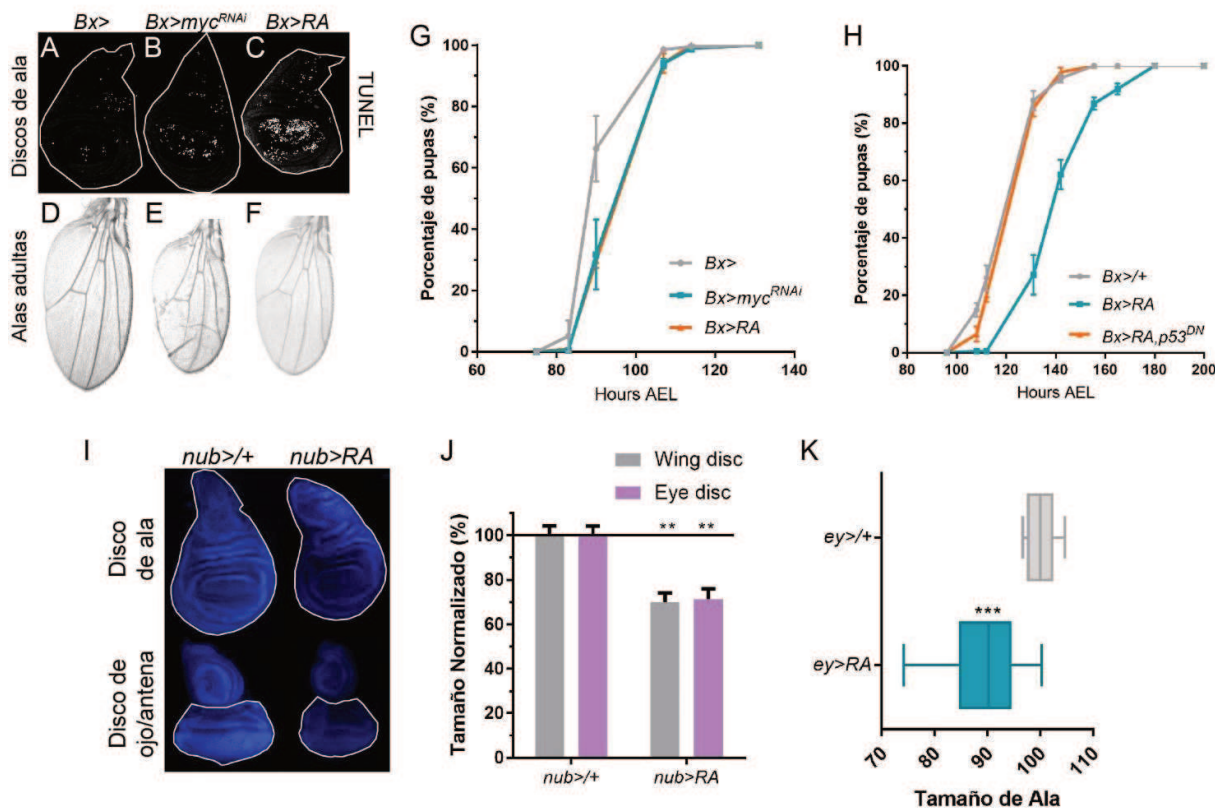
dominante negativa de Basket (*Bsk<sup>DN</sup>*) y una mutante de *hemipterous* (*hep<sup>r75</sup>*), sin observar inducción de MMP1 (**Figura 29.F-G**). Por último, interferimos con los niveles de *eiger* y su receptor *grindelwald* (*grnd*) utilizando ARNs de interferencia, *UAS-eiger<sup>RNAi</sup>* y *UAS-grnd<sup>RNAi</sup>* (*eiger<sup>RNAi</sup>* y *grnd<sup>RNAi</sup>*) respectivamente (**Figura 29.H-I**). Encontrando que la activación de MMP1 depende totalmente de Eiger y su receptor en el contexto de coordinación del crecimiento. Estos resultados colocan a la vía JNK por debajo de p53-Eiger e indican que los mismos actúan en forma epistática en este contexto.

### 4.3. Efectos sistémicos de coordinación inter-tejido.

En trabajos previos se ha demostrado que un tejido dañado es capaz de producir una disminución en el tiempo de desarrollo de un organismo, de esta forma la ventana de tiempo para la regeneración es mayor y por tanto existen más posibilidades de que el tejido sea recuperado y alcance su correcta funcionalidad (105–107).

Para evaluar efectos sistémicos, utilizamos la línea *Bx-GAL4* (*bx>*) en combinación con *Ricina* o *myc<sup>RNAi</sup>*, lo cual genera una gran cantidad de muerte celular en los primordios de ala (**Figura 30.A-C**) y una notable disminución del tamaño del tejido (**Figura 30.D-F**). Esto impacta en el tiempo de desarrollo normal de los individuos, lo cual se evidencia mediante la cuantificación del tiempo que tardan en alcanzar el estadio de pupa (**Figura 30.G**). Los individuos que presentan daño demoran más en alcanzar los últimos estadios de desarrollo. Sin embargo, cuando utilizamos la versión *p53<sup>DN</sup>* y producimos daño en el tejido del ala, el tiempo de desarrollo se muestra similar al control (**Figura 30.H**). Esto permite pensar que el mecanismo de señalización entre el tejido dañado y el resto del organismo depende de p53.

Además, se evaluó de qué manera impacta el daño producido en un tejido sobre el crecimiento de otros tejidos, para lo cual utilizamos como estrategia la generación de daño en el primordio de ala y observamos el tamaño de los discos imaginales de ojo (**Figura 30.I**). Encontramos que la expresión de *Ricina* en el primordio de ala (*nub>RA*) genera una disminución del crecimiento de los primordios de ojo (**Figura 30.J**) lo que permite pensar en que existen mecanismos de coordinación del crecimiento inter-tejidos. Posteriormente se realizó el experimento inverso, se dirigió la expresión de *Ricina* al disco de ojo (*ey>RA*) y se cuantificó el tamaño de las alas adultas (**Figura 30.K**). Como resultado encontramos una disminución en el tamaño de las alas adultas respecto al control, lo que permite evidenciar que los efectos de coordinación ocurren entre tejidos de forma recíproca.

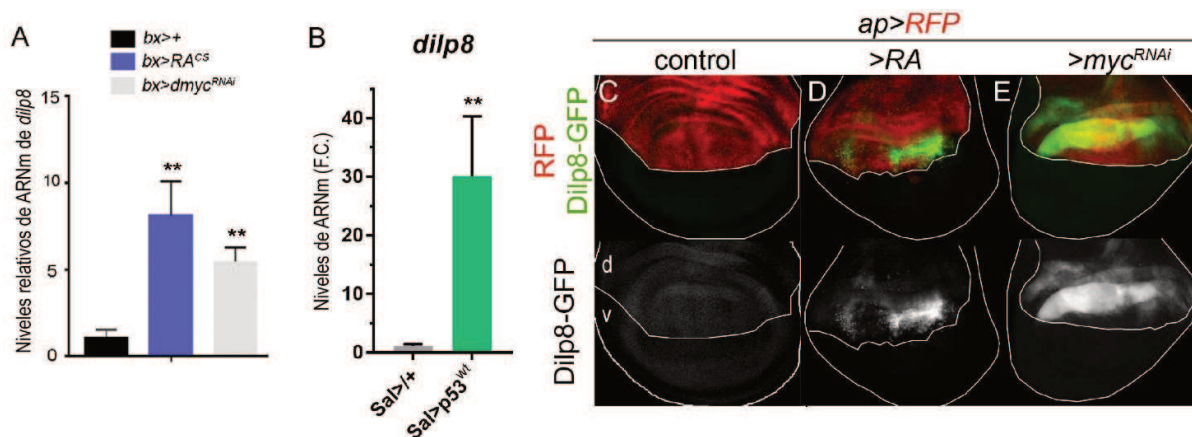


#### 4.3.1. Estudio de la expresión de dILP 8 en coordinación del crecimiento.

Recientemente se ha descubierto que el ligando extracelular del tipo insulina llamado “*Insulin like peptide 8*” (dILP8) se induce en discos imaginales dañados (37,108). El mismo es capaz de llegar al cerebro a través de la hemolinfa en donde se une a un grupo específicos de células que poseen el receptor *Lgr3* (109,110). La unión de dILP8 a su receptor genera una disminución en los niveles de la hormona Ecdisona mediante una señalización bien estudiada en donde el cerebro se comunica con la glándula protorácica (productora de Ecdisona). De esta manera se produce una reducción sistémica de la velocidad de crecimiento y una prolongación en el tiempo de desarrollo (ver 1.3.1).

Los niveles de expresión de dILP8 en discos imaginales en las condiciones de coordinación estudiadas se encuentran elevados en el análisis de microarreglo realizado. Más aún, se observó que los primordios de ala que expresan Ricina o *myc<sup>RNAi</sup>* muestran un incremento significativo en los niveles de ARNm de *dilp8* (Figura 31.A). También se cuantificaron los niveles de transcritto del mismo ante la sobreexpresión controlada de p53, notando un aumento considerable respecto a condiciones control (Figura 31.B). Por último, utilizamos la línea *Ilp8MI00727* que pertenece a la colección MIMIC y por tanto posee la secuencia codificante para GFP inserta en marco con el gen endógeno de dILP8, de manera que se genera el reportero *dilp8-GFP* (37). El análisis del reportero

en estas condiciones demostró que existe una elevada inducción en el compartimento autónomo en discos afectados con *Ricina* o *myc<sup>RNAi</sup>* (Figura 31.C-E). Estos resultados señalan que, al igual que en otros contextos de estrés, dILP8 se induce en las células dañadas de los primordios de ala en condiciones de coordinación del crecimiento.



**Figura 31. Estudio de la expresión de dILP8 durante la coordinación del crecimiento.** (A) Niveles de transcritos de *dilp8* en discos imaginales de ala de los genotipos señalados. (B) Cuantificación de los niveles de ARNm de *dilp8* de discos control y sobrexpresantes de p53. (C) Imágenes de primordios de ala con el reportero DILP8-GFP en discos que sobrexpresan RFP en el compartimento dorsal (D-E) Discos imaginales con el reportero Dilp8-GFP que expresan Ricina o *myc<sup>RNAi</sup>* en el compartimento dorsal marcado con RFP. El compartimento dorsal (d) y ventral (v) se encuentra contorneados en cada imagen.

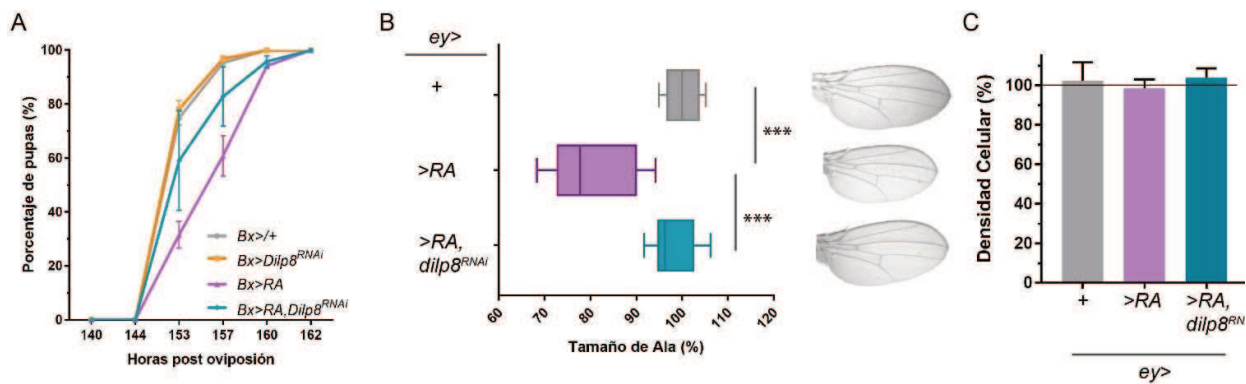
#### 4.3.2. Efectos de coordinación del crecimiento inter-tejido dependen de dILP8.

Dado que encontramos efectos de coordinación sistémicos y la presencia de dILP8 en las condiciones de acomodación estudiadas, se evaluó si el mismo se encuentra involucrado en la coordinación inter-tejidos observada.

El tiempo de pupariación no se ve afectado respecto a individuos control cuando se expresa solo *dilp8<sup>RNAi</sup>* en el disco de ala (*Bx>dilp8<sup>RNAi</sup>*), lo cual es consistente con el hecho que dILP8 se activa en condiciones de estrés en este tejido (Figura 32.A). Por otro lado, discos que expresan Ricina (*Bx>RA*) extienden el tiempo de pupariación y esto se revierte cuando se coexpresa *dilp8<sup>RNAi</sup>* (*Bx>RA, dilp8<sup>RNAi</sup>*) (Figura 32.A).

Para evidenciar el rol de dILP8 y los efectos de coordinación inter-tejidos se utilizó nuevamente la línea *ey-GAL4* (*ey>*), que se expresa solo en el ojo de los individuos, y se cuantificó el tamaño de las alas adultas. La afección del ojo con Ricina (*ey>RA*) produce una disminución en el tamaño del ala respecto a individuos control (Figura 30.K y 32.B). Esta disminución del crecimiento no autónomo se pierde cuando silenciamos *dilp8* (*ey>RA, dilp8<sup>RNAi</sup>*), lo que demuestra la importancia de esta molécula de señalización en tejidos dañados durante el desarrollo. Por otro lado, las cuantificaciones de las densidades celulares de las alas evidencian que el número de células se mantiene constante en presencia o ausencia de dILP8 en coordinación del crecimiento (Figura 32.C).

Estos resultados sugieren que dILP8 es un gen que se induce en tejidos estresados con Ricina y el mismo es necesario para producir la prolongación en el tiempo de desarrollo y la disminución del crecimiento de otros tejidos.



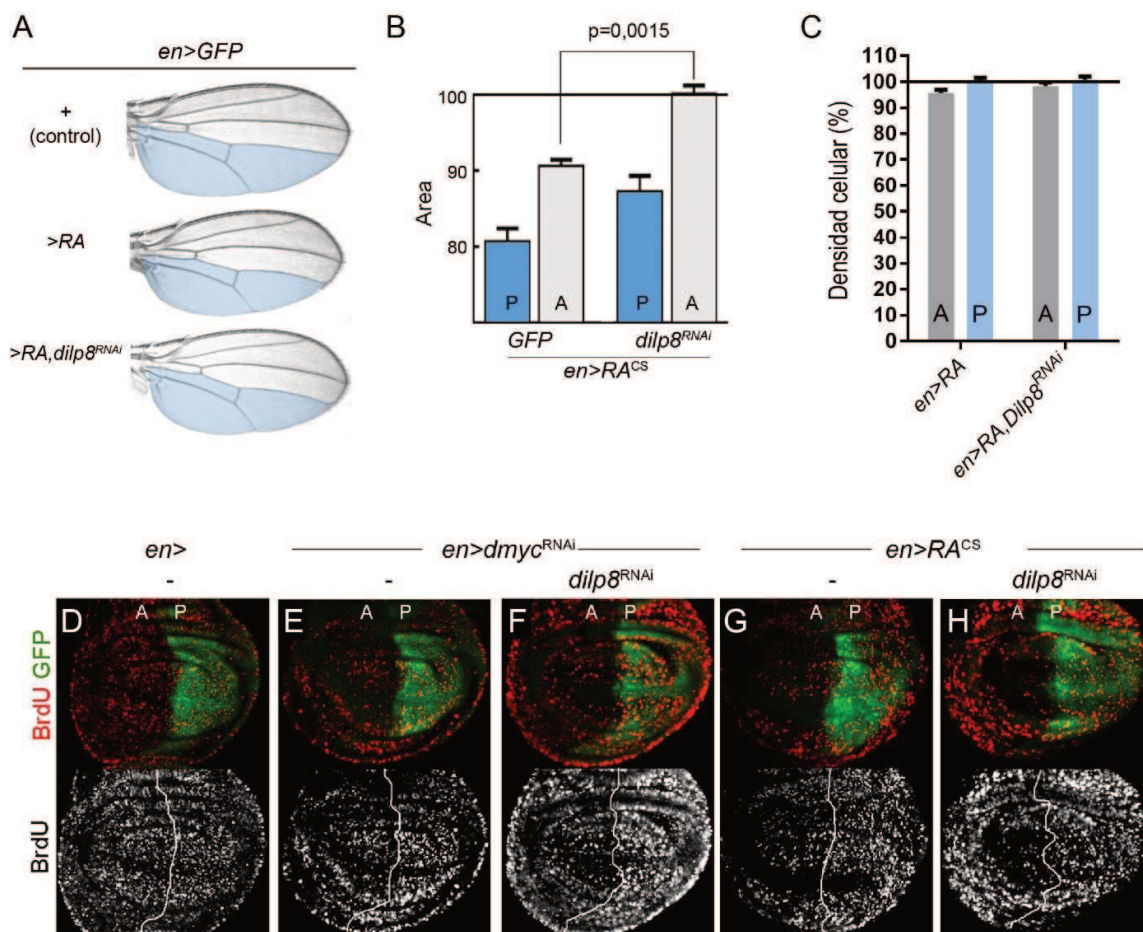
**Figura 32. Efectos de coordinación inter-tejido dependen de dILP8.** (A) Cuantificación del tiempo de pupariación de individuos de los genotipos indicados desde que el huevo es depositado en la comida. (B) Tamaño de alas adultas de individuos que expresan los transgenes Ricina (RA) y Ricina con *dilp8<sup>RNAi</sup>* (RA, *dilp8<sup>RNAi</sup>*) en el ojo (*ey>*). (C) Cuantificación de la densidad celular relativizada al control de alas de individuos indicados.

#### 4.3.3. Rol de dILP8 en coordinación del crecimiento intra-tejido.

Dado que dILP8 es un ligando capaz de reducir el crecimiento de forma no autónoma, inter-tejido, se evaluó el impacto que el mismo posee en la coordinación del crecimiento de forma intra-tejido mediante el uso del ARN de interferencia de dILP8 (*Dilp8<sup>RNAi</sup>*). Encontramos que los tejidos que coexpresan Ricina y *Dilp8<sup>RNAi</sup>* (*en>RA, Dilp8<sup>RNAi</sup>*) son incapaces de coordinar su tamaño y por tanto se vuelven asimétricos (Figura 33.A-B). Además, las densidades celulares de los compartimentos anterior y posterior no se verían afectadas en presencia o ausencia de Dilp8 (Figura 33.C), lo que indicaría que los tejidos mantienen su capacidad de ajustar el número de células. En el mismo sentido, se observó que la disminución de la tasa de proliferación celular en el contexto de coordinación estudiado se muestra inalterada en presencia o ausencia de *dilp8<sup>RNAi</sup>* (Figura 33.D-H), e indicarían que dILP8 no intervendría en los procesos de regulación del número de células.

Estos resultados demuestran que dILP8 es un ligando importante para la simetría y coordinación del tamaño intra-tejido, mientras que otros efectores actuarían en la regulación del número de células del tejido.





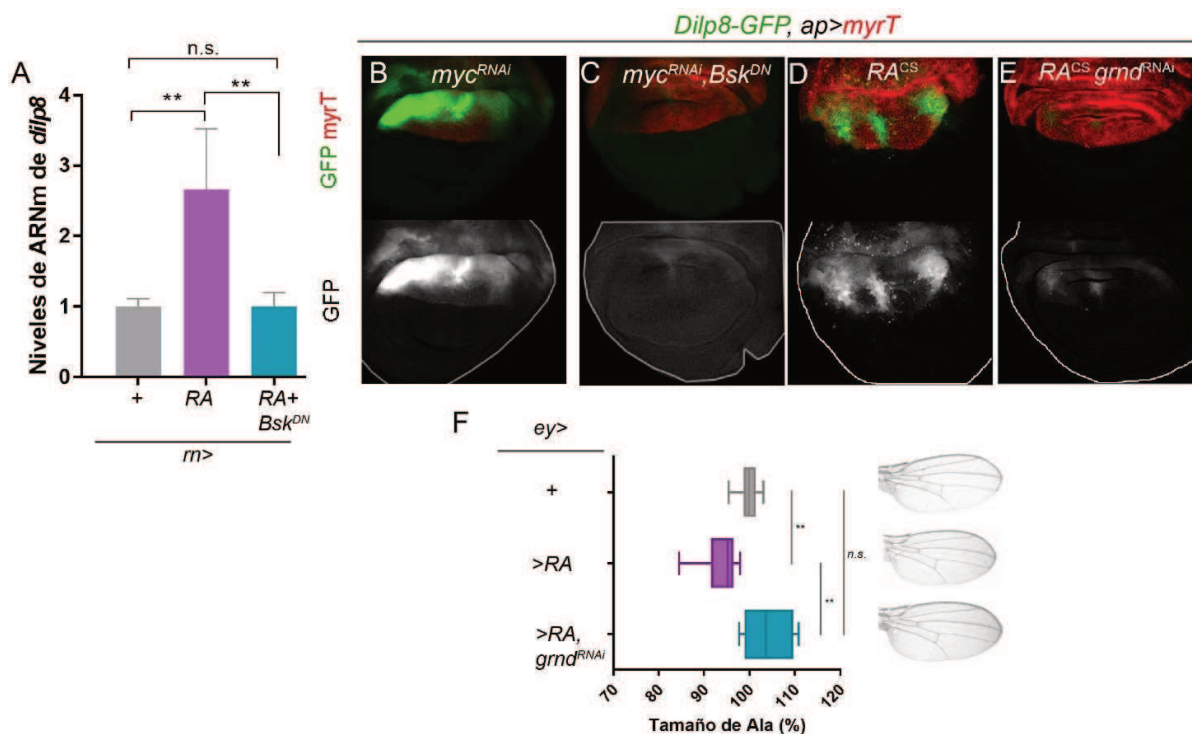
**Figura 33. Rol de dILP8 en coordinación del crecimiento intra-tejido.** (A) Imágenes de alas adultas de los genotipos indicados. En azul se encuentra remarcado el compartimento posterior. (B) Cuantificaciones de los tamaños de los compartimentos posterior (P) y anterior (A) en alas de los genotipos indicados, normalizadas respecto al control (*en>GFP*). (C) Densidad celular de los compartimentos de alas adultas de los genotipos indicados, expresada en porcentaje y normalizada con respecto al control

#### 4.3.4. dILP8 actúa corriente abajo de la vía JNK.

dILP8 es una molécula de señalización que puede ser inducida por la vía JNK en primordios de ala en estrés (38). Dado que en el contexto de coordinación del crecimiento estudiado las células afectadas activan la vía JNK mediante p53 y Eiger, se evaluó si Dilp8 actúa corriente abajo del mecanismo descrito.

Previamente se identificaron niveles de transcritos de *dilp8* aumentados significativamente en tejidos en las condiciones de coordinación (Figura 31.A). Por lo que se procedió a cuantificar nuevamente los niveles de ARNm de *dilp8* en genotipos inactivos para la vía JNK mediante la utilización de la versión dominante negativa de Basket (*Bsk<sup>DN</sup>*). Discos imaginales de ala que coexpresan Ricina y *Bsk<sup>DN</sup>* (*m>RA,Bsk<sup>DN</sup>*) son incapaces de activar *dilp8* (Figura 34.A). De igual manera, analizamos la expresión del reportero Dilp8-GFP y observamos que cuando se inhibe la vía JNK, ya sea mediante la expresión de *Bsk<sup>DN</sup>* o *grnd<sup>RNAi</sup>*, se revierte la inducción del reportero (Figura 34.B-E). Consistente con esto, se observó que la coordinación inter-tejidos se pierde cuando se coexpresa Ricina y *grnd<sup>RNAi</sup>*, (*ey>RA, grnd<sup>RNAi</sup>*) (Figura 34.F). De manera que estos individuos son incapaces de reducir el crecimiento de los tejidos de forma no autónoma.

Estos resultados señalan que la activación de dILP8 ocurre bajo la vía Eiger-JNK y por tanto se posiciona como efector del mecanismo molecular descrito, necesario para coordinar el tamaño de forma inter- e intra-tejido.



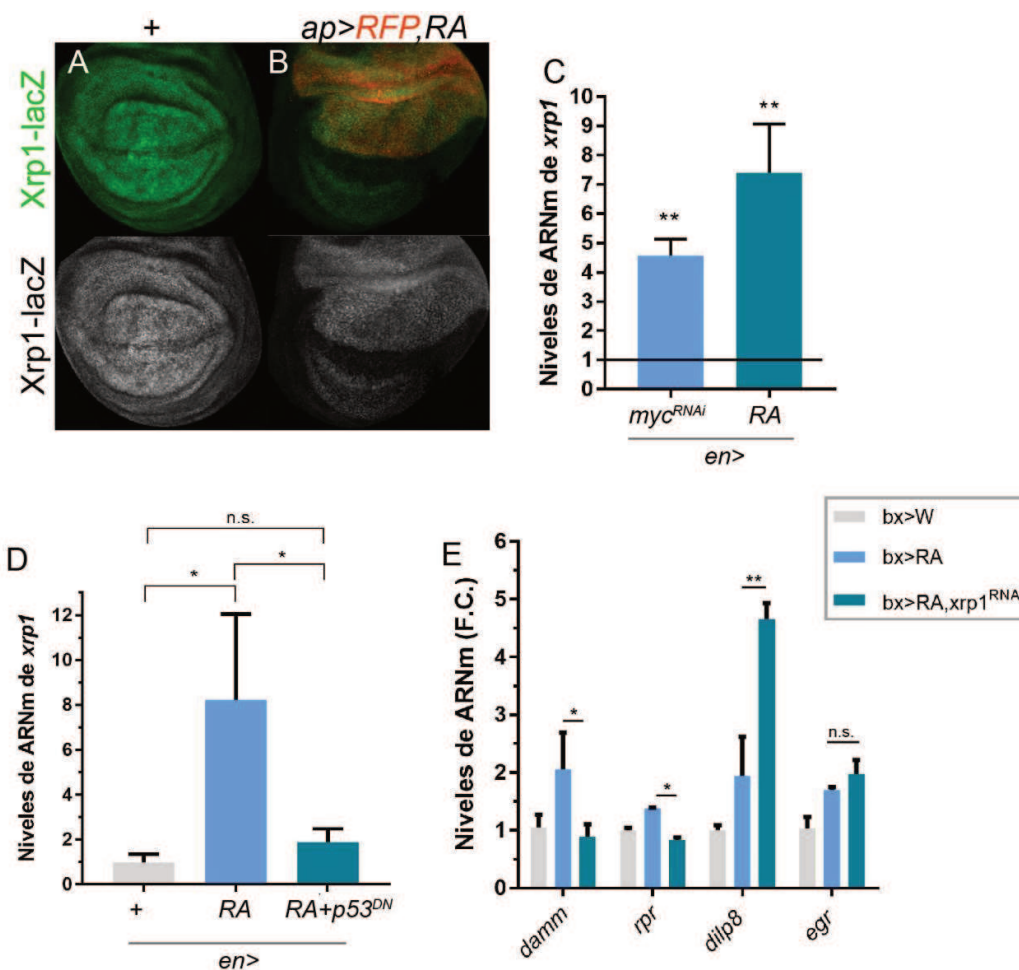
**Figura 34. dILP8 actúa corriente abajo de la vía JNK en coordinación del crecimiento.** (A) Niveles de expresión del transcripto de *dilp8* en primordio de ala de los genotipos indicados cuantificados por RT-qPCR. (B-E) Imágenes de discos de ala que contienen la construcción reportera Dilp8-GFP (marcada en verde), mientras que, en el compartimento autónomo marcado en rojo (*ap>myrT*), se dirige la expresión de las construcciones génicas indicadas. (F) Cuantificación del tamaño de las alas de los genotipos indicados, en donde se utilizó la línea *ey>* para afectar el ojo.

#### 4.3.5. Xrp-1 no interviene en la regulación de dILP8.

El factor de transcripción del tipo bZip llamado Xrp1 posee entre otras funciones el mantenimiento de la estabilidad genómica ante estrés genotóxico y la eliminación de células potencialmente peligrosas mediante competición celular (111). Previamente se ha involucrado a Xrp1 como un mediador de la respuesta orquestada por p53 frente a radiación (96), mientras que trabajos recientes demuestran que Xrp1 es capaz de actuar de forma independiente de p53 ante estrés ribosomal (111–113). En diferentes contextos se ha encontrado que Xrp1 es capaz de activar Dilp8 y producir una extensión en el tiempo de desarrollo de individuos que poseen tejidos dañados (111, 114). Por ello mismo analizamos la expresión de Xrp1 en el contexto de coordinación celular y su contribución en la regulación de dILP8.

Mediante un reportero transcripcional de *xrp1* llamado *Xrp1-lacZ* seguido de una inmunotinción de discos imaginales observamos el patrón de expresión de dicho gen. En condiciones control el reportero se muestra activo principalmente en la zona del “wing pouch” (Figura 35.A). Sin embargo, en discos que expresan Ricina (*ap>RA*) el reportero se encuentra más activo en el compartimento autónomo (Figura 35.B). También fueron evaluados los niveles de transcripto de *xrp1* en condiciones de coordinación del crecimiento en discos imaginales de ala y se encontró que los mismos aumentan considerablemente respecto de discos control (Figura 35.C). En condiciones

similares y con una versión dominante negativa de p53 ( $p53^{DN}$ ) se observó que  $xrp1$  es incapaz de inducirse en la misma magnitud (**Figura 35.D**). Esto indicaría que en el contexto de coordinación del crecimiento  $xrp1$  se induce de forma dependiente de p53. Por último, se encontró que la inducción de los niveles transcritos de  $dilp8$  continúa elevada en presencia de  $xrp1^{RNAi}$  (un ARN de interferencia capaz de disminuir los niveles de transcritos de  $xrp1$ ) (**Figura 35.E**). Lo que indicaría que  $dilp8$  se induce de forma independiente de  $xrp1$ . De la misma manera,  $eiger$  se induciría de forma independiente de Xrp1 (**Figura 35.E**) lo que demuestra que la vía de señalización descrita no se encuentra afectada por Xrp1 directa o indirectamente. Otros genes blancos de p53 como  $rpr$  y  $damm$  pierden su inducción cuando los niveles de Xrp1 se encuentran disminuidos (**Figura 35.E**). Estos genes se han encontrados como blancos transcripcionales tanto de Xrp1 como p53 y se encuentran involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Estos datos indican que Xrp1 podría actuar junto a p53 co-regulando la expresión de genes relacionados con apoptosis frente a estrés, aunque otros experimentos serán necesarios. Sin embargo, la respuesta no autónoma celular mediada por p53-Eiger-JNK-Dilp8 se muestra independiente de Xrp1.

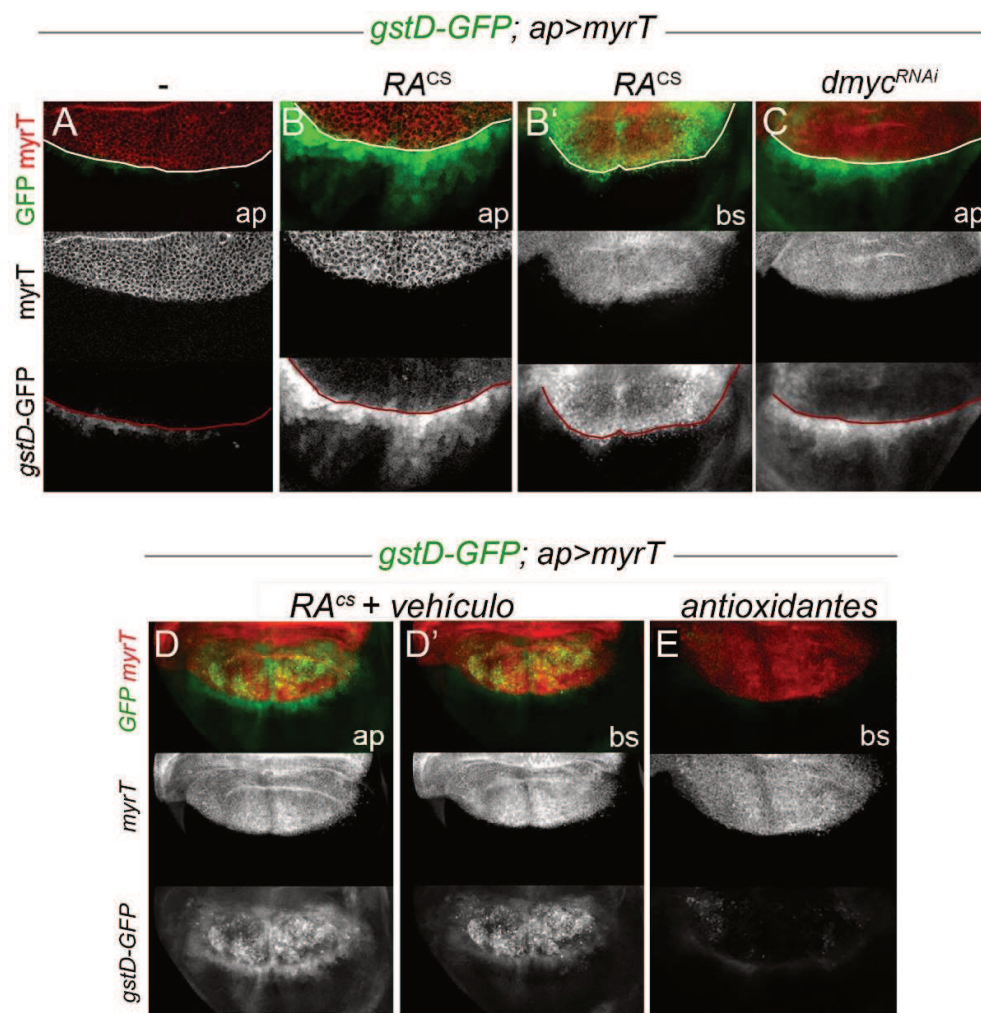


**Figura 35. Estudio de Xrp1 en coordinación del crecimiento.** (A-B) Imágenes de primordios de ala que contienen la construcción reportera Xrp1-lacZ (verde). Los individuos afectados con Ricina ( $ap>RA$ ) poseen el dominio dorsal con marca roja (RFP). (C-D) Cuantificación de los niveles de transcritos de  $xrp1$  en discos imaginiales de ala de los genotipos indicados relativos al control ( $en>W$ ). (E) Niveles de ARNm de los genes indicados en primordios de ala de los genotipos indicados.

#### 4.4. Especies reactivas son producidas durante la coordinación del crecimiento.

El análisis ontológico de los genes diferencialmente expresados en el microarreglo muestra enriquecimiento en procesos como estrés oxidativo y metabolismo del glutatión. Por lo que evaluamos la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante el uso del reportero *gstD-GFP*, ampliamente utilizado para monitorear ROS en los tejidos de *Drosophila* (115).

Discos que expresan RA (*ap>RA*) o *myc*<sup>RNAi</sup> (*ap>myc*<sup>RNAi</sup>) muestran inducción del reportero en la región dorsal y ventral (autónomo y no autónomo respectivamente) en contraste con discos control (*ap>RFP*) (**Figura 36.A-C**). Curiosamente esta marca se muestra activa en el lado apical (ap) del dominio no autónomo donde se encuentran las células epiteliales intactas (**Figura 36.B-C**). Sin embargo, la marca en el dominio autónomo se encuentra del lado basal (bs) del tejido, en una región caracterizada por la prevalencia de células apoptóticas o delaminadas del epitelio (**Figura 36.B'**). Estos resultados sugieren una respuesta diferencial entre ambos compartimentos dada la diferencia de la localización de la señal.



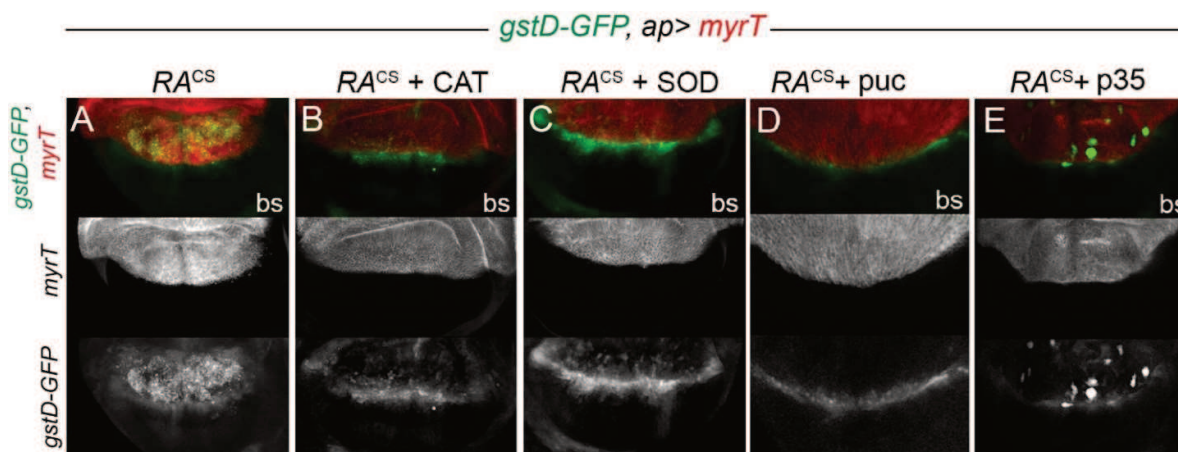
**Figura 36. Presencia de especies reactivas durante la coordinación del crecimiento.** (A-E) Imágenes de discos imaginales con el reportero *gstD-GFP* de los genotipos indicados. En el compartimento dorsal se coexpresa RFP y las construcciones indicadas. El lado apical (ap) o basal (bs) del tejido se encuentra indicado en cada caso.

Para corroborar que la construcción *gstD-GFP* reporta especies reactivas en este contexto, adicionamos a la comida los antioxidantes N-acetilcisteína (NAC), vitamina C y vitamina E; mientras que como control se utilizaron los disolventes vehículos (agua y etanol). Se observó que en presencia de antioxidantes los niveles de inducción del reportero se encuentran significativamente disminuidos en ambos compartimentos (**Figura 36.D-E**), lo que demuestra que *gstD-GFP* se induce por especies reactivas en discos en estas condiciones de coordinación.

#### 4.4.1. Especies reactivas son generadas en las células dañadas.

Dada la producción de especies reactivas durante la coordinación del crecimiento, realizamos experimentos genéticos que nos permitan determinar el origen de las mismas. Inicialmente, se sobrepresaron enzimas que actúan como “*scavengers*”, disipadores de especies reactivas generales, como la enzima catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Se encontró que, en las condiciones de coordinación estudiadas, la sobrepresión de CAT y SOD reducen significativamente la inducción del reportero *gstD-GFP* en ambos compartimentos (**Figura 37.A-C**). Lo cual es consistente con los resultados obtenidos con los antioxidantes, e indicaría que la producción de especies reactivas y la señalización proviene del compartimento autónomo.

Por otro lado, dada la estrecha relación que existe entre la vía JNK y ROS (ver 1.4.4), se observó la expresión del reportero *gstD-GFP* en condiciones sin actividad de la vía JNK. Para ello se sobrepresó *puckered*, *UAS-puc* (*puc*), una fosfatasa que actúa desactivando a Basket y por tanto deja sin efecto a la vía JNK. En condiciones de coordinación con sobrepresión de *puc* se pierde totalmente la inducción del reportero *gstD-GFP* lo que señalaría que la producción de ROS es dependiente de la vía JNK (**Figura 37.D**). De la misma manera, cuando se bloquea apoptosis mediante la sobrepresión de *p35*, una proteína viral inhibitoria de caspasas, se pierde el patrón de expresión del reportero en ambos compartimentos (**Figura 37.E**).



**Figura 37. Especies reactivas son producidas por células apoptóticas.** (A-E) Imágenes de discos imaginales de ala de los genotipos indicados. El compartimento dorsal (marcado en rojo) expresa las construcciones indicadas, mientras que en verde se puede observar la construcción reportera *gstD-GFP*. Imágenes tomadas del lado basal (bs).

Estos experimentos señalan que las células dañadas del territorio autónomo necesitan de la vía JNK y de la vía apoptótica para la producción de las especies reactivas. Asimismo, los resultados

presentados sugieren que las ROS generadas en el compartimento autónomo actúan a distancia disparando una respuesta en el compartimento vecino.

#### 4.4.2. Especies reactivas regulan la proliferación no autónoma.

Especies reactivas pueden funcionar como señales de corto alcance en contextos de estrés y regeneración y propagar la activación de la vía JNK para estimular la reparación de tejidos (76, 116). Por lo que analizamos la contribución de las mismas en la regulación de la proliferación no autónoma.

La inmunotinción de los primordios de ala con anticuerpo anti BrdU muestra que cuando se co-expresa *myc<sup>RNAi</sup>* y catalasa (*ci>myc<sup>RNAi</sup>, CAT*) o superóxido dismutasa (*ci>myc<sup>RNAi</sup>, SOD*) se revierte la disminución en la tasa de proliferación no autónoma que ocurre en durante la coordinación (Figura 38.A-C). Lo mismo sucede cuando se suplementa al medio una solución que contiene antioxidantes (NAC, vitamina E y vitamina C) (Figura 38.D-E). Estos resultados señalan que las especies reactivas generadas en el territorio autónomo son necesarias para la disminución en la proliferación en el dominio no autónomo.

De la misma manera, cuando se observa muerte celular con TUNEL, es posible visualizar una marcada disminución de la apoptosis en el compartimento no autónomo en primordios de ala que expresan Ricina (*ci>RA*) y que fueron crecidos en medios suplementados con antioxidantes (Figura 38.F). Finalmente, se analizó si las especies reactivas intervienen en la inducción de Dilp8 (Figura 38.G-H). Encontramos que, tanto en presencia como en ausencia de antioxidantes, el reportero Dilp8-GFP se induce en tejidos *ap>RA* por lo que podríamos pensar que ambas señales juegan papeles separados corriente abajo de la vía JNK (Figura 38.I).

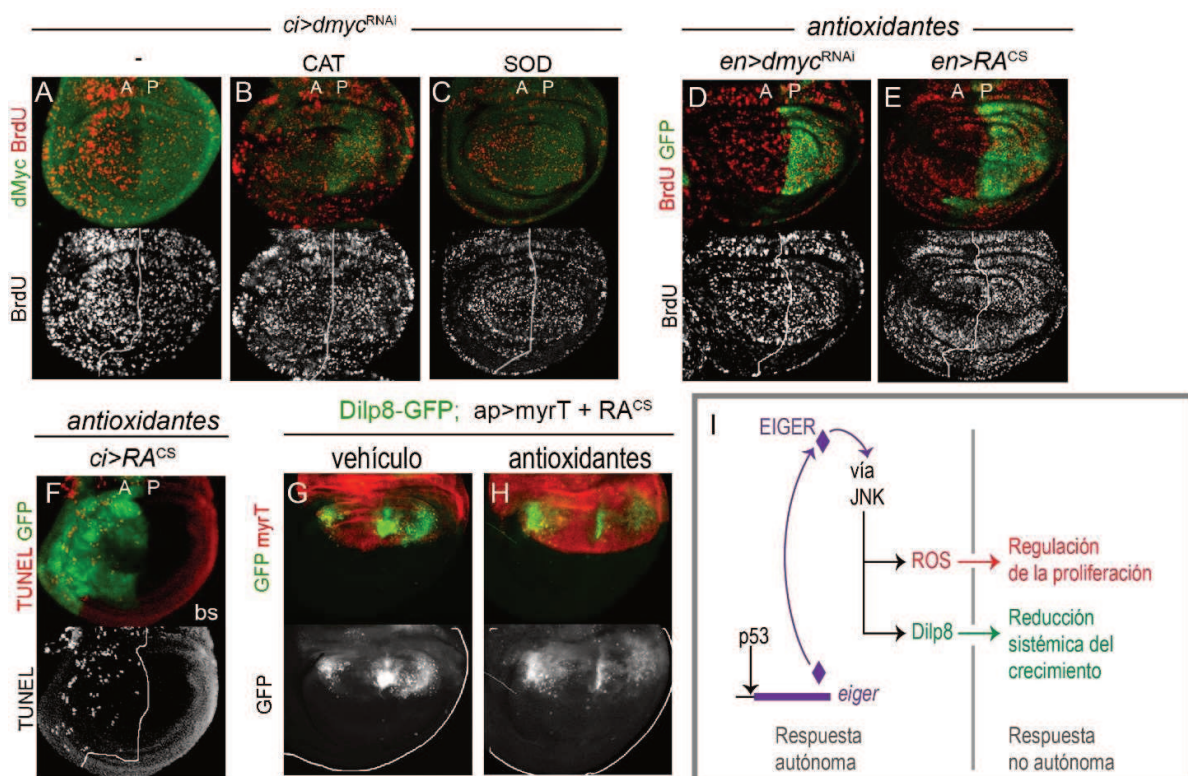


Figura 38. Rol de especies reactivas en la tasa de proliferación durante la coordinación del crecimiento. (A-C) Inmunotinción de BrdU (rojo) en discos imaginales de ala con los genotipos señalados y en verde se encuentra marcada la proteína Myc con un

anticuerpo específico. (D-E) BrdU en primordios de ala de individuos de los genotipos indicados crecidos en medios suplementados con antioxidantes. En verde la proteína GFP marca el dominio autónomo, posterior. (F) Tinción con el kit TUNEL (marcador de apoptosis) de primordios de ala de discos que expresan *Ricina* (*ci>RA*) de individuos crecidos en medios con antioxidantes. (G-H) Discos imaginales que contienen la construcción reportera *Dilp8-GFP* marcada en verde y en el dominio dorsal (rojo) se dirige la expresión de *Ricina* y RFP, en individuos crecidos en medios suplementados con antioxidantes o el vehículo. (I) Esquema del mecanismo molecular y las señales activadas en el compartimento autónomo y sus efectos no autónomos.

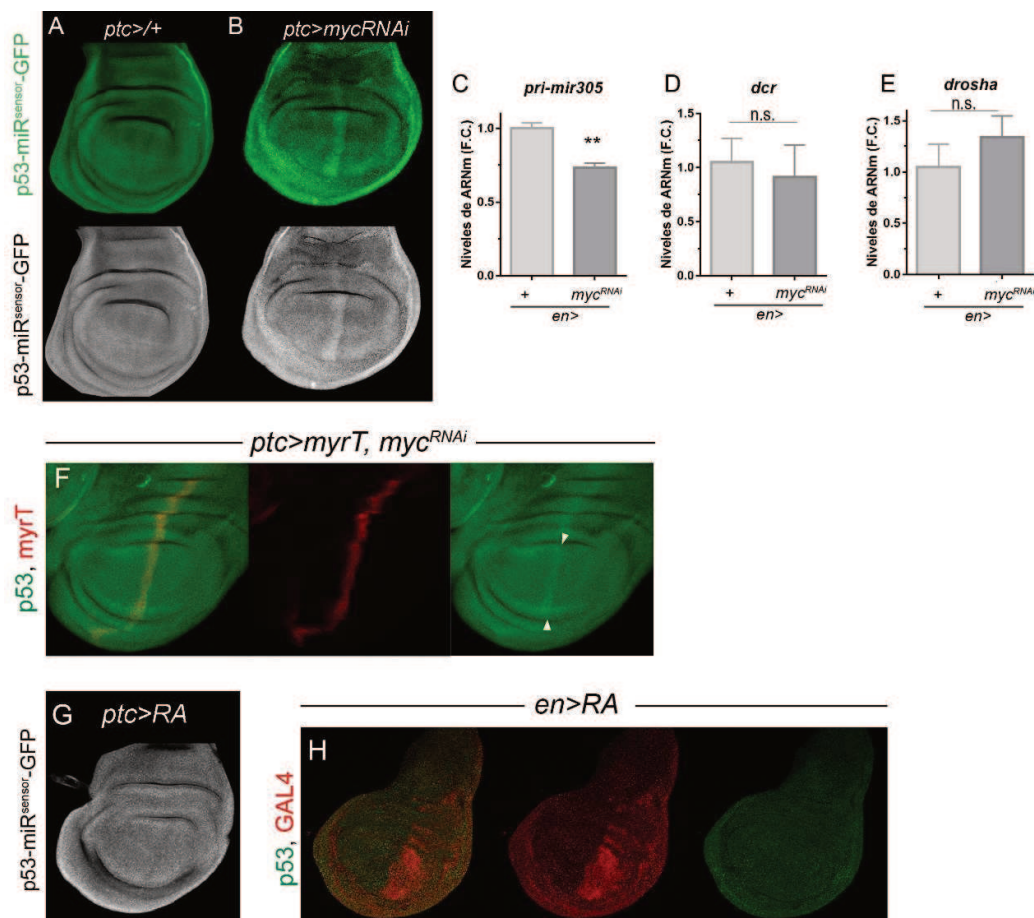
---

#### 4.5. Estudio de la activación de p53 en el contexto de coordinación del crecimiento.

En trabajos previos se ha demostrado que el transcripto de *Dp53* es regulado por miARNs, tanto en discos imaginales como en el tejido graso (117). Esta regulación involucra principalmente a miR-305, el cual es capaz de reconocer secuencias específicas ubicadas en el 3'UTR del ARNm de p53. Por lo que se analizó la posibilidad de que en condiciones de coordinación del crecimiento la activación de p53 este mediada por la vía de micro ARNs.

Utilizamos una línea reportera que contiene la secuencia 3'UTR de p53 fusionada a una secuencia que codifica para la proteína GFP bajo un promotor de tubulina (*p53miR<sup>sensor</sup>-GFP*) caracterizado previamente como un constructo que permite reportar actividad de micros sobre el transcripto de p53 (117). Las imágenes del reportero en el primordio de ala muestran que existe un aumento del reportero en células que expresan *myc<sup>RNAi</sup>* (*ptc>myc<sup>RNAi</sup>*) respecto a la condición control (**Figura 39**), lo que indica una baja actividad de micro ARNs. Más aún, encontramos que los niveles de transcripto del pri-mir305 disminuyen en condiciones de coordinación del crecimiento medidos por RT-qPCR (**Figura 39**). Además, los niveles de *dicer-1* y *droscha*, dos enzimas involucradas en la biogénesis de microARNs, se mantienen sin diferencias significativas en las mismas condiciones (**Figura 39.D-E**). Por otro lado, mediante la utilización de un anticuerpo específico para p53, encontramos que células *myc<sup>RNAi</sup>* (*ptc>myc<sup>RNAi</sup>*) poseen un incremento de proteína de p53 (**Figura 39.F**). Por lo que en conjunto estos resultados señalan que bajos niveles del factor de transcripción Myc producen una disminución de los niveles de miR-305 y un incremento en la cantidad de p53.

Un análisis similar se realizó en primordios que expresan Ricina (*ptc>RA*), donde se observó que los mismos no muestran cambios en el patrón del reportero de micro ARNs *p53miR<sup>sensor</sup>-GFP* (**Figura 39.G**). Y en la misma dirección no se observan acumulación de p53 en células que expresan Ricina (*en>RA*) de discos marcados con el anticuerpo anti-p53 (**Figura 39.H**). Por lo que estos resultados preliminares indicarían mecanismos diferentes en cuanto a la activación de p53 células que expresan Ricina respecto de células disminuidas de Myc. Dado que la activación de p53 es dependiente de contexto y puede darse en diferentes niveles, nuestros resultados indicarían que existe más de una forma de activación de p53 en el contexto de coordinación del crecimiento.



**Figura 39. Rol de micro ARNs en la regulación de p53 en coordinación del crecimiento.** (A-B) Imágenes de discos de ala *ptc>+* y *ptc>mycRNAi* que contienen la construcción reportera de la actividad de micro ARNs sobre p53 (*p53-miR<sup>sensor</sup>-GFP*). (C-D) Cuantificaciones de los niveles de ARNm de los genes mencionados en los genotipos control (*en>+*) y *en>mycRNAi*. (F) Imagen de primordio de ala teñido con un anticuerpo específico para p53 en individuos que expresan *mycRNAi* (*ptc>mycRNAi*). (G) Primordio de ala *ptc>RA* que contienen la construcción reportera de la actividad de micro ARNs sobre p53 (*p53-miR<sup>sensor</sup>-GFP*). (H) Disco de ala teñido con un anticuerpo específico para p53 en individuos que expresan Ricina en el compartimento posterior (*en>RA*).

#### 4.5.1. El factor de transcripción Hr51, ¿activador o efector de p53?

En el análisis de microarreglo realizado encontramos que el factor de transcripción Hr51 se encuentra altamente inducido en primordios de ala en coordinación del crecimiento. Esta proteína ha sido poco caracterizado en respuesta a estrés y sus funciones han sido asociadas al control del ritmo circadiano en cerebro y el remodelado neuronal (118, 119). Sus ortólogos, fax-1 en *C. elegans* y PNR/NR2E3 en mamíferos, también han sido estudiados por sus funciones en el desarrollo del sistema nervioso (120, 121). Estudios recientes han revelado que NR2E3 es capaz de estabilizar a p53 en humanos y mantenerlo activo para lo cual se han propuesto dos mecanismos: I) NR2E3 media la acetilación de p53, mediante la acetilasa p300 en líneas celulares cancerígenas y II) mediante la inducción de DINO, un ARN largo no codificante capaz de interactuar y estabilizar la proteína de p53 en respuesta a estrés oxidativo en tejido hepático (122). Estas funciones emergentes de NR2E3 permiten pensar que existirían funciones poco conocidas de Hr51 en condiciones de estrés además de sus funciones conservadas en el desarrollo de retina y en la remodelación neuronal. Por lo que estudiamos la relación de Hr51 con p53 y el proceso de coordinación del crecimiento.

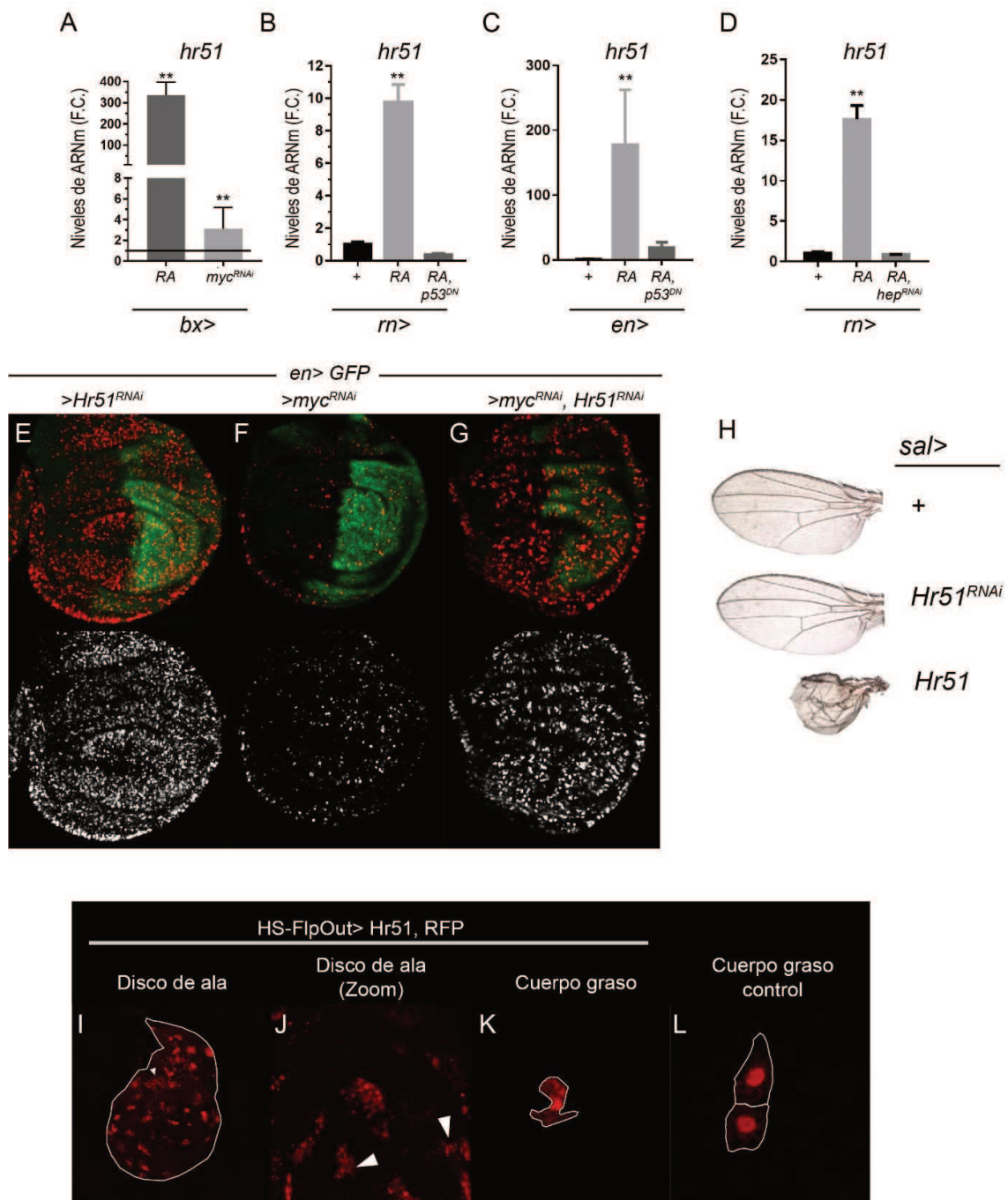


Para validar los resultados del microarreglo cuantificamos los niveles de transcripto de *hr51* en discos imaginales que expresan *Ricina* y *myc<sup>RNAi</sup>*, y encontramos una inducción consistente del gen en ambos genotipos respecto al control (**Figura 40.A**). Para determinar si la inducción de Hr51 precede a la activación de p53 en el contexto estudiado medimos los niveles de ARNm en presencia de la versión dominante negativa de p53 (*m>RA,p53<sup>DN</sup>*). Encontramos que los niveles de inducción de *hr51* se pierden en los primordios de ala que expresan *p53<sup>DN</sup>* sugiriendo que *hr51* se activa por la acción de p53 (**Figura 40.B-C**). De igual manera evaluamos si *hr51* es activado corriente abajo de la vía JNK en el contexto de coordinación del crecimiento, para lo cual se inactivó la vía JNK mediante la utilización de un ARN de interferencia que silencia a la quinasa Hemipterous (*hep<sup>RNAi</sup>*). Como resultado encontramos que los niveles de inducción de ARNm de *hr51* se pierden en discos imaginales en coordinación del crecimiento sin la vía JNK (*m>RA, hep<sup>RNAi</sup>*) (**Figura 40.D**).

Por otro lado, se evaluó el rol de Hr51 en el contexto de coordinación para lo cual se utilizó un ARN de interferencia capaz de silenciar los niveles de *hr51*, *UAS-Hr51<sup>RNAi</sup>* (*Hr51<sup>RNAi</sup>*). Encontramos que en condiciones basales la utilización del ARNi no genera efectos de proliferación (**Figura 40.E**), mientras que en condiciones de coordinación del crecimiento Hr51 se muestra necesario para la disminución en la tasa de proliferación provocada por *myc<sup>RNAi</sup>* (**Figura 40.F-G**). Estos resultados sugieren que la inducción transcripcional de *hr51* ocurriría corriente abajo de p53 y la vía JNK, y el mismo tendría un rol en el control de la tasa de proliferación en tejidos en coordinación del crecimiento.

Finalmente evaluamos las funciones de Hr51 en condiciones basales mediante experimentos de ganancia y pérdida de función para lo cual utilizamos las líneas *UAS-Hr51* y *UAS-Hr51<sup>RNAi</sup>* respectivamente. El silenciamiento de *hr51* en discos imaginales de ala (*sal>Hr51<sup>RNAi</sup>*) no genera efectos fenotípicos evidentes, las alas se muestran normales en tamaño, forma y patrón de venación (**Figura 40.H**). Sin embargo, alas que sobreexpresan Hr51 (*sal>Hr51*) son aberrantes y no pueden crecer de forma normal (**Figura 40.H**). La sobreexpresión de forma ubicua (*act>Hr51*) causa letalidad (no mostrado). Además, se realizó un ensayo de mosaico genético de clones celulares inducibles (HS-FlpOut) en discos de ala y en tejido graso (*fat body*). A las 48hs de inducción las células que sobreexpresan Hr51 en el disco de ala se muestran anómalas con marcas similares a *debris* (restos celulares) (**Figura 40.I-J**). En el cuerpo graso las células sobreexpresantes poseen un menor tamaño y una forma atípica en comparación con células control (**Figura 40.K-L**). Estos resultados demuestran que altos niveles de Hr51 son capaces de generar efectos nocivos de forma autónoma celular, aunque el mecanismo por el cuál produce estos efectos es incierto.

Resumidamente de acuerdo a estos resultados, Hr51 es un gen que se induce transcripcionalmente ante estrés de forma dependiente de p53 y la vía JNK. Su presencia se encuentra relacionada con los efectos no autónomos de proliferación en el contexto de coordinación del crecimiento, mientras que su función podría estar relacionada con el programa de apoptosis celular que se da en las células dañadas, aunque experimentos más específicos son necesarios. Por otro lado, su rol como activador de p53 resulta aún incierto aunque en las condiciones estudiadas su inducción es posterior a la acción de p53 y la vía JNK.

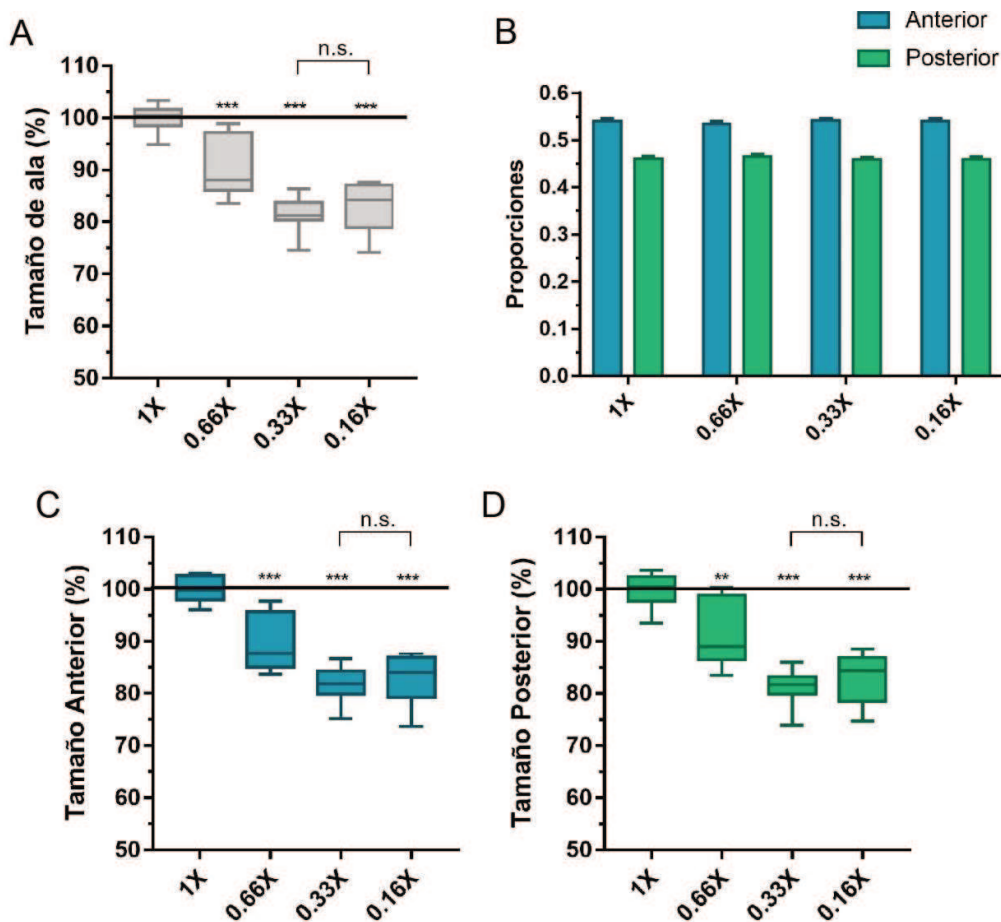


**Figura 40. Hr51 es un gen de respuesta estrés que se activa corriente abajo de p53. (A-D)** Cuantificaciones de los niveles de expresión de *hr51* en primordios de ala de los genotipos indicados. **(E-G)** Inmuntinción de BrdU (rojo) en discos imaginales de ala donde el dominio posterior, marcado en verde, expresa las construcciones indicadas. **(H)** Imágenes de alas adultas de moscas que expresan los constructos indicados específicamente en el ala. **(I-K)** Clones celulares marcados en rojo que muestran las células que sobreexpresan Hr51. **(L)** Clones celulares control de tejido graso (Fat Body)

#### 4.6. Ruido biológico durante el desarrollo y robustez del crecimiento.

Para estudiar el “ruido biológico” del crecimiento durante el desarrollo se utilizó el ala de *Drosophila* como tejido paradigmático para poder describir la robustez o plasticidad que posee su simetría bajo distintas condiciones. Para ello se realizaron cuantificaciones de área sobre el ala adulta de moscas alimentadas con medios de distinta composición nutritiva. Es sabido que los individuos alimentados con dietas restrictivas crecen menos que en condiciones control dado que la disponibilidad de nutrientes es limitante para el tamaño final de los individuos, por lo que observamos el crecimiento de las alas de individuos crecidos en medios diluidos respecto al medio control (**Figura 41.A**). Como resultado encontramos que las alas disminuyen su tamaño conforme la dieta se hace más pobre y alcanzan una disminución máxima del 20% en dietas diluidas tres veces más que la normal (0,33X), mientras que dietas más diluidas (0,16X) no generan una menor disminución del tamaño. En todas las condiciones es posible observar que las proporciones de los compartimentos anterior y posterior de cada ala se mantienen constantes (**Figura 41.B**). Además, se hace evidente que el tamaño de cada compartimento disminuye en la misma magnitud que el ala completa en cada medio alimenticio (**Figura 41.C-D**).

Estos resultados demuestran que el tamaño de los tejidos es plásticos dentro de ciertos parámetros nutritivos y que los mismos disminuyen en condiciones restrictivas. En estas condiciones, las poblaciones celulares que conforman los tejidos disminuyen proporcionalmente, de manera que los mismos mantienen sus condiciones de simetría en todas las dietas. De esta manera se evidencia la presencia de mecanismos robustos que condicionan las proporciones de los tejidos y que prevalecen sobre el tamaño final del tejido en sí.



**Figura 41. Plasticidad del desarrollo en alas.** (A) Tamaño de las alas adultas de individuos crecidos con diferentes cantidades de nutrientes, relativizados a la comida control (1X). (B) Proporciones de los compartimentos anterior y posterior de las alas adultas de los individuos antes mencionados. (C-D) Tamaño de los compartimentos de las alas adultas de los individuos crecidos en diferentes condiciones de nutrientes.

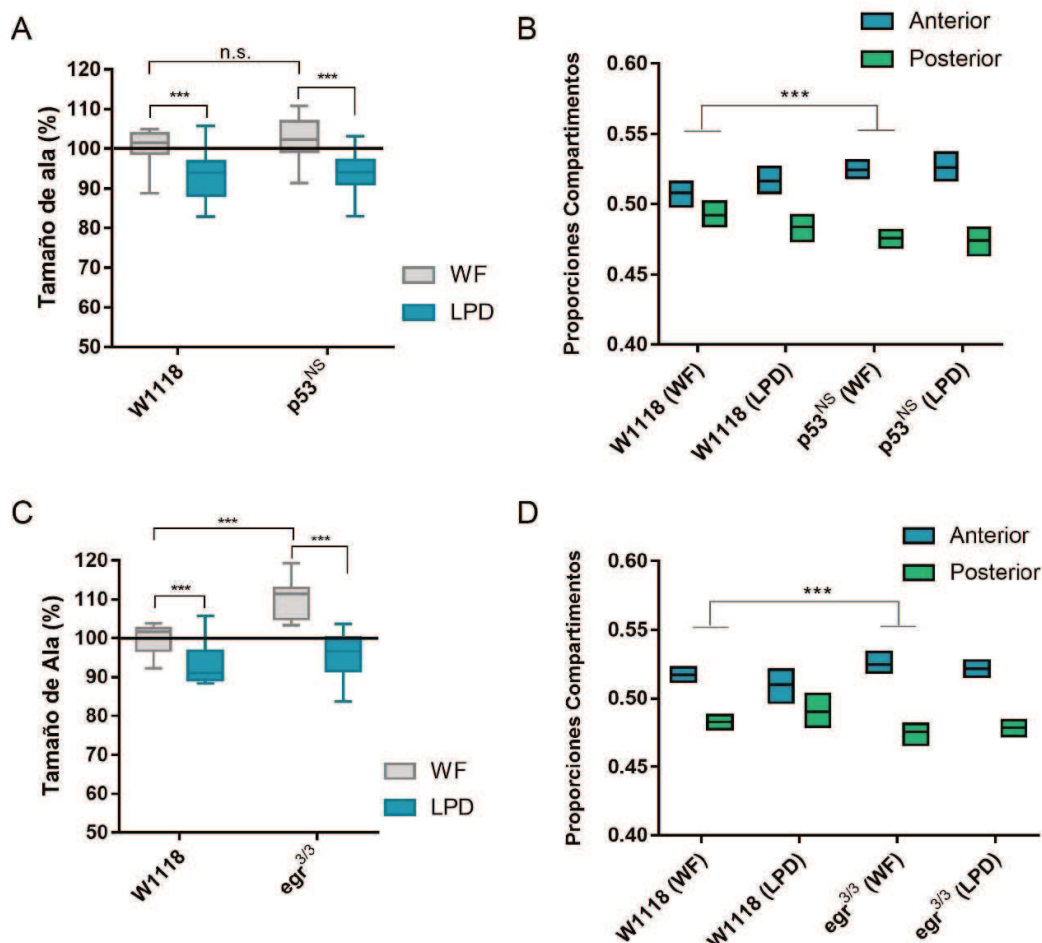
#### 4.6.1. Robustez del desarrollo en mutantes p53 y Eiger.

En *D. melanogaster* p53 se expresa de forma ubicua durante la mayor parte del desarrollo larvario. Sin embargo, se desconoce si p53 posee algún rol en la plasticidad del crecimiento de los tejidos y el tamaño durante el desarrollo normal. Mediante el análisis de tamaño de alas de los mutantes nulos para p53 ( $p53^{NS}$ ), se encontró que los mismos poseen un crecimiento similar al de moscas control ( $W^{118}$ ) cuando son crecidos en condiciones normales, 25°C y medio de alimentación común (WF) que cuenta con 40 gramos de levadura por litro (**Figura 42.A**). En dietas restrictivas en proteínas (LPD), 5 gramos de levadura por litro, las alas de los mutantes disminuyen de forma proporcional a los individuos control (**Figura 42.A**). Además, en las mediciones de las proporciones de los compartimentos de las alas, podemos observar que los individuos mutantes para p53 presentan una proporcionalidad levemente diferente al control (**Figura 42.B**). En ambas dietas los mutantes p53 presentan un aumento en el tamaño del compartimento anterior a expensas de una disminución del posterior.

De la misma manera evaluamos la robustez en el desarrollo de las mutantes nulas de *eiger* ( $egr^{3/3}$ ). Encontramos que las alas de estos individuos son levemente más grandes que las alas de los individuos control en condiciones normales (**Figura 42.C**), mientras que esta diferencia es

menos evidente en dietas pobres en proteínas (LPD) (**Figura 42.C**). Por otro lado, las proporciones de los compartimentos de las alas mutantes muestran la misma tendencia que la mutantes  $p53^{NS}$ , dado que en ambas condiciones de comida existe un leve aumento del dominio anterior (**Figura 42.D**).

Los resultados expuestos demuestran que los tejidos de mutantes de  $p53$  y  $eiger$  poseen cierto nivel de diferencias de crecimiento y proporciones respecto a los individuos control. Lo más curioso resulta en la diferencia en las proporciones de los compartimentos anterior y posterior. Dado que en ambos casos el compartimento anterior es más grande proporcionalmente que el mismo compartimento en los individuos control demostrando una afección sobre el mecanismo de robustez que sostiene las proporcionalidades.



**Figura 42. Plasticidad y robustez del desarrollo de individuos mutantes de  $p53$  y  $eiger$ .** (A) Tamaño de las alas adultas de individuos control y mutantes para  $p53$  crecidos en comida control (WF) y bajas en proteínas (LPD). (B) Proporciones de los compartimentos de las alas adultas de los individuos antes mencionados. (C) Tamaño de alas adultas de individuos control y mutantes para  $eiger$ . (D) Proporciones de los compartimentos de las alas adultas de los individuos  $w^{1118}$  (control) y mutantes de  $eiger$ .

#### 4.6.2. Robustez del desarrollo autónoma de tejido.

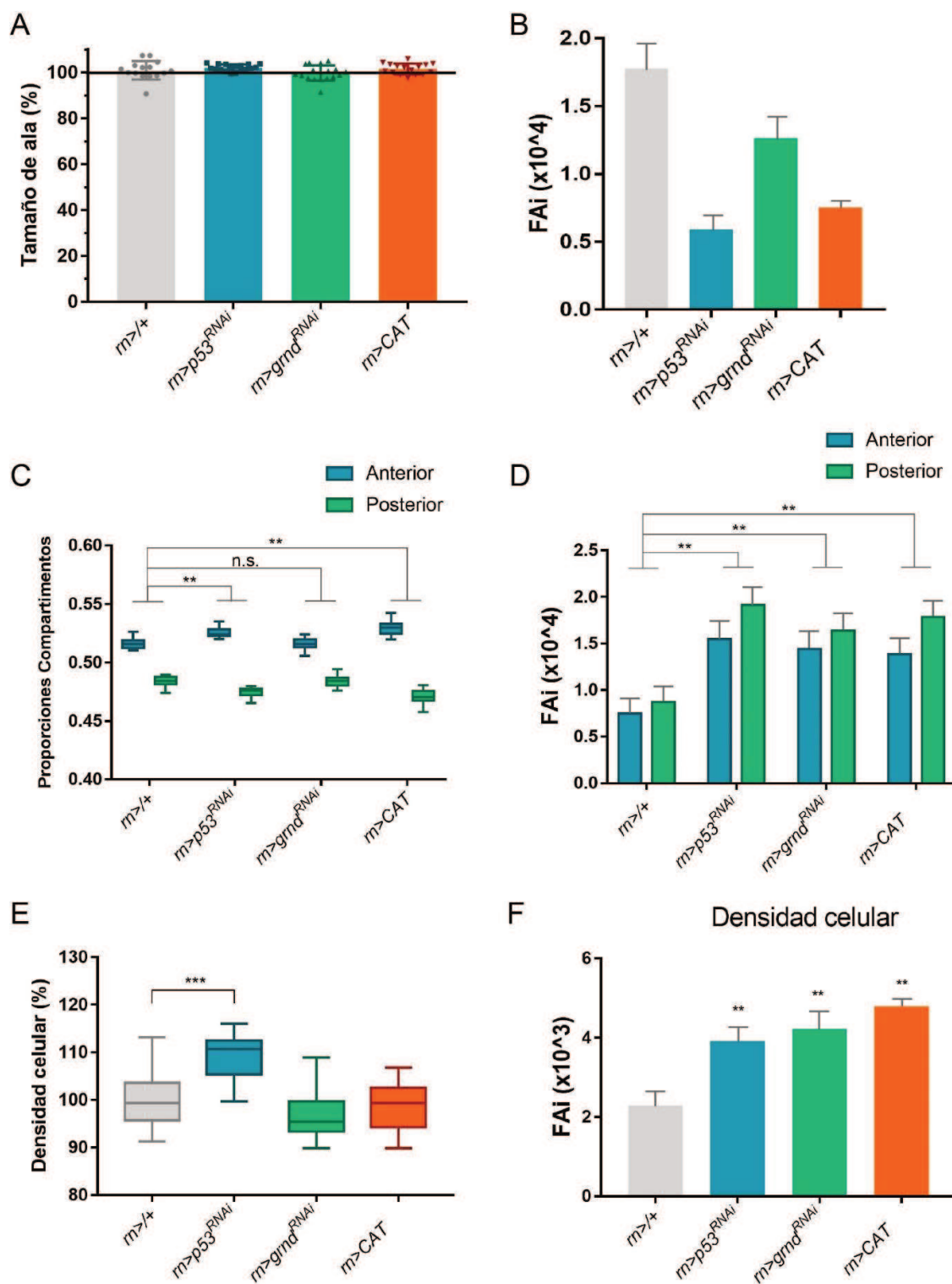
Para evaluar cómo influye el mecanismo molecular descrito en la robustez que sostiene la proporcionalidad durante el desarrollo en forma autónoma de tejido se realizó un análisis detallado del tamaño de las alas, los compartimentos, densidades celulares y la asimetría en alas adultas de

distintos genotipos. Para ello se utilizó la línea *rn-GAL4 (rn>)* que se expresa específicamente en primordios de ala durante el desarrollo; y las líneas *p53<sup>RNAi</sup>*, *grnd<sup>RNAi</sup>* y *CAT* para reducir los niveles de p53, la vía Eiger-JNK y la señalización por ROS respectivamente.

En el análisis del tamaño final de las alas adultas no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos que poseen menores niveles de p53, JNK o ROS respecto al control (**Figura 43.A**). Además, se midió la asimetría entre ala derecha e izquierda de cada individuo cuantificada como índice de asimetría fluctuante (FAi) y se observó que las alas de los distintos genotipos no presentan mayores diferencias que un control (**Figura 43.B**). También se cuantificaron los tamaños y las proporciones de los compartimentos anterior y posterior de cada ala (**Figura 43.C**), donde se visualizó que las alas con bajos niveles de p53 y ROS poseen un dominio anterior más grande que las alas control. Curiosamente, la asimetría (FAi) de las proporciones de los compartimentos de las alas de cada individuo es mayor en todos los genotipos respecto a los individuos control (**Figura 43.D**), evidenciándose mayor asimetría en el compartimento posterior.

Finalmente se cuantificaron las densidades celulares mediante el conteo del número de pelos por unidad de área de las alas de las moscas adultas (**Figura 43.E**). Donde solo encontramos diferencias en la densidad celular de las alas que posee menores niveles de p53 (*rn>p53<sup>RNAi</sup>*), las cuales presentan cerca de un 10% más de células que el control. Además, el contraste de densidad celular entre las alas contralaterales de cada individuo (FAi) demuestra que existen mayores niveles de asimetría en todos los genotipos respecto al control (**Figura 43.F**).

Resumidamente encontramos que las moléculas p53, Grindelwald o las especies reactivas no se muestran importantes para el tamaño final del ala en condiciones normales ni tampoco para la simetría bilateral (izquierda-derecha). Sin embargo, parecerían disminuir el ruido que existe en cuanto al número de células y al tamaño de los compartimentos evidenciados por las asimetrías contralaterales (izquierda y derecha).



**Figura 43. Robustez y ruido biológico durante el desarrollo del ala.** (A) Tamaño de las adultas de los individuos de los genotipos indicados. (B) Asimetría (FAI) entre ambas alas de cada individuo de los genotipos indicados. (C) Proporciones de los compartimentos anterior y posterior de las alas adultas. (D) Asimetría en las proporciones de los compartimentos de las alas adultas. (E) Densidad celular de alas de individuos indicados. (F) Niveles de asimetría en las densidades celulares que existen entre ambas alas de cada individuo de cada genotipo.

## 5. Discusión

El control preciso del crecimiento de las distintas partes del cuerpo animal es necesario para la formación de individuos bien proporcionados. Sin embargo, ha resultado un desafío científico entender como esto sucede dentro de los tiempos de desarrollo de un organismo y de forma coordinada. En esta tesis estudiamos el mecanismo celular y molecular que tiene lugar en la comunicación entre distintas poblaciones de células de un organismo, las cuales coordinan su crecimiento para generar tejidos simétricos. Durante este trabajo, se utilizó el ala de *Drosophila* para comprender como los tejidos sostienen su simetría durante el desarrollo. Esto puede evidenciarse mediante la generación de poblaciones celulares que crecen de forma diferencial y por tanto deben acomodar su crecimiento para que el tejido mantenga sus proporciones. Este contexto de desarrollo llamado “acomodación” por otros autores, involucra el rol central del factor de transcripción p53. En ausencia del mismo el tejido pierde su capacidad de acomodarse y con ello su simetría. p53 es un vasto regulador de la respuesta celular frente a estrés en animales con funciones autónomas celulares bien caracterizadas como apoptosis, reparación del ADN y regulación del ciclo celular, mientras que sus funciones no autónomas celulares se encuentran menos estudiadas resultando clave la utilización de un contexto *in vivo* para ser interpretadas. Es por ello que este trabajo ha sido centrado en el estudio de las dinámicas que ocurren corriente abajo de p53 en condiciones de acomodación durante el desarrollo.

### 5.1. El factor de transcripción p53 media la homeostasis tisular frente a estrés.

p53 es un factor de transcripción que actúa a través de sus genes blancos, entre los cuales encontramos que *ku80* (involucrado en reparación del ADN); *reaper* y *damm* (relacionados a muerte celular); *corp* y *xrp1* se muestran inducidos por p53 en el contexto de acomodación y en otros contextos de estrés (96,97). Estos genes clásicamente se han asociado a la respuesta autónoma celular de p53 a los efectos de radiación (IR) sin referencias obvias que expliquen funciones no autónomas. Es por ello que centramos el estudio hacia aquellos genes que codifican para ligandos extracelulares que pudieran mediar una comunicación célula-célula. Mediante la utilización de diferentes estrategias (análisis del microarreglo, análisis *in-silico* y *screening* de ARNs de interferencia) encontramos que *eiger* es un gen blanco de p53 que codifica para un ligando que actúa en el espacio extracelular (ortólogo del TNF-alpha de mamíferos) y que es necesario para mediar los efectos no autónomos celulares que ocurren en el proceso de acomodación. Posteriormente demostramos que la activación de *eiger* por p53 ocurre de forma directa, mediante la unión de p53 al promotor de *eiger*. Este ligando extracelular es capaz de activar la vía JNK mediante la unión de Eiger a su receptor en la membrana extracelular llamado Grindelwald (ortólogo al TNFR de mamíferos).

La inducción de *eiger* en condiciones de estrés mediada por p53 se ha observado en respuesta a radiación en larvas en desarrollo (52,96). En ese contexto p53 es activado por el daño al ADN y contribuye en el mecanismo de reparación, mientras que las células que presentan daños excesivos activan la vía apoptótica y son eliminadas mediante p53. Los individuos mutantes para p53



presentan menores niveles de apoptosis dado que son incapaces de activar genes pro-apoptóticos como *hid*, *reaper* y *eiger*. Por lo que clásicamente se ha asociado a *eiger* con la respuesta apoptótica mediada por p53, de forma similar a lo que sucede en el compartimento autónomo en el contexto de acomodación. En este trabajo demostramos que p53 es un regulador transcripcional de *eiger* con importantes funciones no autónomas celulares para sostener la homeostasis tisular. Dado que la pérdida de función de p53 y Eiger genera defectos de simetría y de densidad celular de forma no autónoma.

Previamente se ha demostrado que p53 media la regeneración y la extensión del tiempo de desarrollo cuando larvas en desarrollo son sometidas a un contexto de radiación (87). Mutantes nulos de p53 no retrasan el desarrollo larvario frente a radiación y los adultos presentan alas con una morfología anómala. Se ha propuesto que la regeneración mediada por p53 se debe en parte al aumento en el tiempo de transición de larva a pupa, como también a la inducción de factores de crecimiento como Wingless y la inducción de proliferación compensatoria (87), aunque no resulta evidente el mecanismo molecular y celular por el cual p53 interviene en todos estos fenotipos frente a radiación. En nuestro trabajo, se encontró que las mismas células estresadas generan efectos autónomos y no autónomos para los cuales p53 resulta clave. Al igual que en el contexto de radiación, durante la acomodación se produce un retraso del crecimiento sistémico mediado por p53, el cual es capaz de activar de forma indirecta a dLPP8. Este último media el retraso entre los estadios de larva y pupa en condiciones de estrés funcionando como una señal que comunica al tejido dañado con el sistema neuroendocrino (ver más adelante). Por lo que presumiblemente p53 podría actuar bajo el mismo mecanismo en contextos de daño al ADN o radiación.

La conjugación de mecanismos de homeostasis y los tiempos de desarrollo del organismo hacen clave la necesidad de un mecanismo de acción expeditivo que permita la formación de tejidos bien proporcionados y simétricos aún en condiciones de estrés. En este sentido las células proliferativas cuentan con una reserva constante de p53 preparado para ser activado y generar una rápida amplificación, dado que p53 activa su propia transcripción. Un pulso de activación de p53 (experimentos de inducción controlada, *sal*>*p53*<sup>wt</sup>, Figura 25) puede activar en menos de 24 horas a *eiger* y a la vía JNK con los genes blancos *mmp1*, *puc* y *dilp8*. Con lo que podríamos pensar al mecanismo descrito como una respuesta rápida y resolutiva frente a estrés en condiciones de desarrollo. Sin embargo, el mecanismo por el cual p53 es activado permanece incierto. En nuestro trabajo identificamos que p53 puede ser regulado por el micro ARN mir-305 de forma similar a lo reportado por otros autores (60). Cuando se inhibe *myc* en el disco de ala, disminuyen los niveles de este micro ARN y aumenta la expresión del reportero de micro ARNs del 3'UTR de p53. Más aún, en esa condición se encuentran mayores niveles de proteína de p53 (revelados por inmunotinción). Lo que sugiere que menores niveles de este micro ARN conducen a un aumento de p53. Sin embargo, no sucede lo mismo cuando se induce Ricina, lo que indicaría que p53 puede ser activado de múltiples maneras.

## 5.2. Eiger/TNF-alpha media la activación de la vía JNK.

En el presente trabajo encontramos que Eiger cumple funciones importantes para la respuesta autónoma y no autónoma celular, corriente abajo de p53 en el contexto de coordinación del crecimiento. Eiger es una proteína transmembrana que puede funcionar como un ligando extracelular luego de ser clivado por las proteínas TACE (123). En la membrana plasmática puede unirse tanto a Wengen como a Grindelwald ubicados en la misma célula o en células distantes (123–126). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que Eiger une con mayor afinidad a Grindelwald y que este complejo que se internaliza en vesículas hacia el interior celular es el responsable de la apoptosis producida por Eiger (127). En nuestro trabajo encontramos que la ausencia de Grindelwald resulta en fenotipos similares a la ausencia de Eiger, por lo que esta interacción es clave para mediar los efectos de coordinación del crecimiento, aunque no desestimamos una contribución de Wengen en la señalización. La activación de *eiger* genera la inducción de la vía JNK, la cuál es su principal función descrita (101, 128). Mediante la utilización de diversas herramientas demostramos que la vía JNK se activa en las mismas células estresadas, sin evidencias de activación de la vía en las células sanas vecinas. Más aún, la inhibición de Grindelwald o de los componentes de la vía JNK en las mismas células estresadas es suficiente para evitar los fenotipos no autónomos de acomodación, lo que indica una función autócrina de Eiger.

La activación de la vía JNK de forma simultánea con p53 es representativa de diferentes contextos de estrés, donde son capaces de actuar de forma sinérgica y/o de forma independiente como es el caso de la respuesta a radiación o a UV. En el contexto de acomodación encontramos que la vía JNK se activa exclusivamente por acción de p53 y Eiger, lo que representa un mecanismo autónomo celular poco estudiado. En respuesta a IR se ha demostrado exclusivamente que tanto p53 y la vía JNK actúan generando la inducción de los genes pro-apoptóticos *reaper* y *hid* (72). A su vez Hid es capaz de activar indirectamente la vía JNK y a p53 (mediante la inhibición de DIAP1), por lo que podrían generar un ciclo de retroalimentación positiva mediante Hid determinante para desencadenar la respuesta apoptótica. Si bien no descartamos la presencia de este mecanismo de retroalimentación positiva entre p53 y la vía JNK mediado por la maquinaria apoptótica en el contexto de coordinación estudiado, el mismo solo podría ocurrir después de la activación de Eiger. Es de resaltar que los niveles de activación de la vía JNK en el contexto de coordinación del crecimiento estudiado son menos extremos que contextos de radiación que provocan efectos nocivos y daños severos en el ADN. Dado que la activación de la vía JNK mediada por p53 depende totalmente de Eiger y Grindelwald en este contexto, podríamos pensar que este mecanismo autónomo celular de activación de la vía JNK por p53 es novedoso.

Un interrogante que se desprende del mecanismo molecular encontrado resulta de la observación de que las células utilizan un ligando extracelular para activar la vía JNK de forma autónoma. Una posible explicación reside en la evidencia de que la señalización específica por Eiger genera la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) las cuales también encontramos importantes en el contexto de coordinación (ver más adelante). La vía JNK es capaz de generar un estallido (o "*burst*" en inglés) energético que produce la formación de ROS, para lo

cual intervienen componentes metabólicos claves involucrados en la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y el transporte de electrones en la mitocondria (129). Más aún, niveles sostenidos de Eiger (mediante experimentos de sobreexpresión) conducen a la muerte celular mediante dos vías: apoptosis (mediada por caspasas) y a la necroptosis (independiente de caspasas y mediada por ROS). Esto guarda relación con una de las funciones claves que cumple su ortólogo (TNF- $\alpha$ ) en mamíferos en la eliminación de tumores o en respuesta a agentes infecciosos. Por otro lado, en el contexto de coordinación estudiado, la producción de ROS desencadenada por la activación de p53-Eiger-JNK, se asocia con el mecanismo de señalización no autónoma que genera efectos de muerte celular y disminución de la proliferación.

### 5.3. La producción de especies reactivas del oxígeno contribuye en el control del número de células del tejido.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden mediar el crecimiento, la diferenciación, la progresión del ciclo celular o la muerte celular a través de sus funciones como molécula señal y su interacción con diversas vías de señalización (77, 130). En este trabajo encontramos que la vía JNK junto con la vía apoptótica dependiente de caspasas se activan generando ROS en las células estresadas. Además, encontramos que existe una difusión de la señalización producida por las ROS dado que el reportero de *gstD-GFP* se activa en forma de gradiente desde las células estresadas hacia las células sanas (Figura 36). Dado que la señal no autónoma de ROS se ve reducida cuando se inhibe tanto la vía JNK como la vía apoptótica en el compartimento autónomo, podríamos pensar que las células dañadas actúan como una fuente de señalización de ROS que es percibida por las células sanas. Además, el estudio de los efectos de coordinación del crecimiento en un contexto sin ROS demuestra que las mismas son importantes para generar la disminución no autónoma de la tasa de proliferación y la apoptosis en las células sanas. Por lo que evidenciamos un rol funcional de estas moléculas en la regulación del número de células no autónoma en dichas condiciones.

Nuestros resultados encuentran que la señalización mediada por ROS es importante para la comunicación celular entre diferentes regiones del tejido, aunque no se profundizó específicamente en su rol como moléculas señal. En este sentido, las ROS han generado un gran interés en el último tiempo por sus funciones en la señalización, por ejemplo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un perfecto candidato para funcionar como segundo mensajero o como molécula señal dado que cuenta con vida media y estabilidad suficiente para difundir a través de membranas (131). Además se ha vinculado a la señalización no autónoma mediada por ROS extracelular con vías de transducción de señales como MAPKS, NF- $\kappa$ B, PI3K-Akt y la señalización de Ca<sup>2+</sup> entre otros, lo que permite que la misma sean involucradas en diferentes contextos celulares (77, 116).

En contextos como proliferación inducida por apoptosis y regeneración las especies reactivas generan un aumento de la proliferación, opuesto a lo que sucede en la respuesta de coordinación del crecimiento en acomodación. En el caso de proliferación inducida por apoptosis, las ROS extracelulares, producidas por la NADPH oxidasa Duox, son claves en el reclutamiento de hemocitos (células del sistema inmune similares a los macrófagos de vertebrados) hacia las células

apoptóticas. En el caso de daño tisular, discos imaginales pueden regenerar mediante la propagación de las ROS desde las células que rodean la región dañada (132). Esta propagación de ROS es necesaria para la activación de JNK, produciendo un ciclo de retroalimentación positiva que forma una región llamada blastema, en donde se produce la inducción de la proliferación para ocupar el espacio y la reparación del tejido (74,78,133). La activación de JNK en este caso es necesaria para la secreción de mitógenos que estimulan el crecimiento (como Wg) y la reprogramación celular mediante la regulación de marcas epigenéticas efectuadas por los complejos Polcomb y Tritorax (134). De acuerdo a nuestro análisis de microarreglo no evidenciamos inducción de genes que codifiquen para proteínas mitogénicas, por lo que evidenciamos que la vía JNK junto con las ROS median respuestas diferenciales de acuerdo al contexto en el que son activadas.

En este trabajo se ha demostrado que las ROS se producen corriente abajo de Eiger-JNK y la vía apoptótica dependiente de caspasas en el contexto de coordinación del crecimiento estudiado, aunque resulta incierto bajo que mecanismo sucede. Una opción posible podría ser mediante la reducción incompleta del oxígeno en organelas encargadas de mantener la homeostasis metabólica como la mitocondria o los peroxisomas; aunque no hemos identificado elementos que permitan unir ambos mecanismos. Alternativamente las proteínas de membrana del tipo NADPH oxidasas como Duox y Nox también pueden generar especies reactivas del oxígeno cuando son activadas (135). Recientemente se ha demostrado que Duox y Nox pueden ser activados por Dronc (caspasa efectora) lo que uniría directamente al proceso apoptótico con la producción de ROS (136). Otro mecanismo podría ser a través de *moladietz* (*mol*), un blanco transcripcional de la vía JNK, que codifica para un factor necesario para la maduración de Duox y la producción de ROS (78). Aunque, de acuerdo al análisis de microarreglo realizado no existen cambios transcripcionales significativos en este gen en el contexto de coordinación. Por otro lado, encontramos una diversidad de genes relacionados con el metabolismo redox y del glutatión expresados diferencialmente (como *GstE6*, *GstD5*, *Cyp6g2*, etc.) que podrían vincular cambios transcripcionales específicos con la señalización de ROS durante acomodación.

#### 5.4. En condiciones de estrés los tejidos controlan su tamaño de forma sistémica mediante la acción de Dilp8.

El péptido señal del tipo insulina llamado dILP8 ha sido ampliamente estudiado en los últimos diez años por sus funciones de comunicación entre tejidos periféricos y el sistema neuroendocrino. En el contexto de coordinación del crecimiento estudiado encontramos que dILP8 se encuentra inducido en las células estresadas mediante la activación de la vía Eiger-JNK. La producción de dILP8 en estas condiciones retrasa el crecimiento larvario por lo que los individuos demoran más en alcanzar la etapa de pupa. Además, promueve la coordinación del crecimiento de forma inter- e intra- tejido.

Las funciones de dILP8 en contextos de estrés han sido bien descritas en trabajos recientes (34,39,110,137,138). Dilp8 genera un retraso de crecimiento que permitiría aumentar la ventana de tiempo para que la región dañada alcance su tamaño normal. El mecanismo involucra la secreción

de dILP8 desde las células dañadas hacia la circulación, a través de la cual viaja y alcanza a su receptor Lgr3 en un grupo discreto de neuronas en el cerebro. La unión del péptido a su receptor activa el circuito neuronal de las células Lgr3+, que se encuentran en contacto con neuronas IPC (productoras de Insulina) y neuronas PTTH. Estas últimas inervan directamente en la glándula PTTH y generan una disminución en la producción de Ecdisona. De esta manera se activa un mecanismo de detención de secreción de Insulina y Ecdisona, lo cual genera un efecto de disminución del crecimiento de forma sistémica que limita el tamaño de todos los tejidos y contribuye en la formación de individuos simétricos y bien proporcionados. En este trabajo observamos que esto mismo se hace evidente cuando el tamaño del ala se ve reducido por el estrés producido en el ojo y viceversa (Figura 29). En ausencia de dILP8 o de la vía Eiger-JNK el efecto de coordinación inter-tejido se pierde, lo que sugiere que los tejidos se comunican mediante el mecanismo de señalización neuroendócrina ya esclarecido. Consistentemente con nuestros hallazgos, resultados de otro grupo de investigación señalan un mecanismo similar de coordinación entre tejidos en desarrollo mediante dILP8 frente a estrés causado por inhibición de proteínas ribosomales (114); y que en conjunto refuerzan la hipótesis de mecanismos de control que mantienen las proporciones del individuo.

La señalización de dILP8 también contribuye en la simetría intra-tejido, dado que la ausencia del mismo en las alas sujetas al mecanismo de acomodación modifica la relación de tamaño entre los compartimentos. Por lo que encontramos que poblaciones celulares en desarrollo, que presentan un estrés para crecer, pueden utilizar la vía neuroendocrina de señalización para coordinar el crecimiento de forma intra-tejido e inter-tejido. Previamente se ha demostrado que una señalización exacerbada de Ecdisona disrumpe con la simetría de discos de ala que presentan poblaciones celulares que crecen a diferentes velocidades (139). Lo que contribuye con la idea de que los niveles sistémicos de Ecdisona son importantes para el correcto control de la simetría del tejido en condiciones de estrés. Por otro lado, hemos demostrado que dILP8 no contribuiría en la regulación de la tasa de proliferación celular no autónoma. Lo cual es consistente con la idea de que el número de células no determina el tamaño final del ala, y que ambos fenotipos pueden ser disociados en condiciones de estrés (1). De esta manera la señalización de las vías hormonales parecería controlar el tamaño final de los tejidos, mientras que el número de células podría controlarse de forma local.

El mecanismo de activación de dILP8 en condiciones de estrés aún resulta controversial, dado que el mismo parecería ocurrir de múltiples formas dependiendo del contexto estudiado. En trabajos previos de un mismo grupo se han demostrado tres vías independientes de inducción de *dilp8*. Células tumorales neoplásicas pueden inducir *dilp8* mediante la vía JNK (140), o mediante el factor de transcripción Yorkie, efector de la vía Hippo (141); resultando aún poco claro porque ciertos tumores utilizan una u otra vía. Además, recientemente, se ha evidenciado a Xrp1 como un tercer factor de transcripción involucrado en la activación de *dilp8* ante la inhibición de proteínas ribosomales claves para el ensamblaje del ribosoma (114). Lo señalado parecería indicar que *dilp8* cuenta con múltiples activadores, y que todos ellos actuarían de forma transcripcional. En nuestro trabajo, encontramos que *dilp8* se induce por acción de la vía Eiger-JNK, la cual activa al factor de

transcripción AP-1. Evaluamos además la contribución de Xrp1 en este contexto, dado que encontramos aumentada su expresión de forma dependiente de p53. Sin embargo, notamos que el mismo no es necesario para la inducción de *dilp8* ni de *eiger* cuando utilizamos Ricina para generar estrés. Por lo que podríamos pensar que en la señalización mediada por dILP8 se integran múltiples vías de respuestas a estrés que pueden actuar en forma independiente de acuerdo al contexto.

### 5.5. Distintos niveles de coordinación disminuyen el ruido biológico durante el desarrollo.

En este trabajo se ha demostrado la existencia de mecanismos de robustez que mantienen las proporciones de los tejidos bajo condiciones de estrés, mientras que en condiciones normales resulta aún incierto que procesos mantienen un bajo ruido biológico. Para profundizar en este sentido se utilizó el ala adulta de *Drosophila* para estudiar la plasticidad del desarrollo de los tejidos en condiciones fisiológicas.

En condiciones de alimentación normal los tejidos poseen una notable capacidad de crecer de forma proporcionada (relación de tamaño de los compartimentos) con un bajo nivel de ruido biológico en cuanto al tamaño y al número de células (reflejado en las asimetrías entre ala izquierda y derecha). Bajo diferentes condiciones de alimentación, los tejidos disminuyen su tamaño y mantienen sus proporciones (relación Anterior/Posterior) incluso en niveles limitantes de nutrientes.

En individuos mutantes nulos en los genes *p53* y *eiger*, los tejidos disminuyen su tamaño en condiciones restrictivas de nutrientes en igual magnitud que individuos control. Sin embargo, la relación de los compartimentos se muestra sutilmente afectada respecto al control. Además, en un análisis específico de tejido se encontraron escasas diferencias en el tamaño del ala, como también en la asimetría izquierda-derecha cuando se inhibe p53, Grindelwald o se sobreexpresa la enzima Catalasa. Lo cual indicaría que el ruido biológico o las asimetrías de tamaño de ala no dependen en gran medida del mecanismo que actúa en condiciones de estrés.

En trabajos previos se ha reportado que mayores niveles de asimetría existen en mutantes *hid* y *H99* que son incapaces de activar la vía apoptótica (31). Sin embargo, el mecanismo no ha sido descrito, ni se ha abordado un estudio tejido específico. Se ha sugerido que la imposibilidad de estos tejidos de realizar el proceso natural de competición celular por la falta de activación de la vía de caspasas, conduciría a una acumulación anormal de células; hipótesis que conduciría a pensar que el tamaño fino de los tejidos es regulado por el proceso de muerte celular.

En condiciones normales dILP8 también es necesario para contribuir en el control fino del tamaño final de los tejidos (32,36,109,142), dado que la falta de dILP8 o su receptor Lgr3 en el cerebro aumenta los niveles de asimetría izquierda-derecha durante el desarrollo. La secreción de dILP8 en condiciones normales es producida hacia el final del desarrollo larvario por las células de la epidermis (32,142). Lo antes expuesto indicaría que dILP8 y la comunicación con el sistema neuroendócrino es importante para limitar el tamaño de los tejidos en condiciones normales y en estrés, aunque resulta incierta la existencia de mecanismos de control constantemente involucrados en la coordinación del crecimiento.

Por último, se han encontrado diferencias sutiles en cuanto a la relación Anterior/Posterior cuando se inhibe p53 o las ROS específicamente en el ala. Estas diferencias se hacen más evidentes cuando se mide el nivel de ruido entre los compartimentos de alas contralaterales. Por otro lado, la densidad celular se encuentra afectada en las alas que poseen inhibido p53, ya que las mismas acumulan un mayor número de células. Dato que contribuye en pensar que p53 podría controlar el proceso de apoptosis, la proliferación o ambas, durante el desarrollo normal de los tejidos. Mayores niveles de ruido biológico respecto al número de células se hacen evidentes cuando se comparan densidades celulares entre alas contralaterales con menores niveles de p53, Grindelwald o ROS (inducción de Catalasa). De manera que el mecanismo descrito podría contribuir en el control fino del número de células de forma autónoma de tejido.

En esta tesis hemos estudiado dos niveles de robustez del desarrollo: I) intra-tejido, que mantiene la forma propia de un tejido y el número de células y II) inter-tejido, que sostiene las proporciones entre los distintos tejidos que componen el individuo. De acuerdo a nuestros resultados ambas se relacionan, aunque pueden funcionar bajo mecánicas celulares diferentes. Según lo observado la robustez intra-tejido parecería ser más lábil y susceptible de ruido biológico, mientras que a nivel inter-tejido las regulaciones sistémicas brindan un control estricto del crecimiento por lo que resultan más robustas y difíciles de alterar. Más aún, la disociación del control del número de células y el tamaño final del tejido demuestra la existencia de distintos niveles de organización o control durante el desarrollo de los organismos superiores.

## 6. Conclusiones

- El factor de transcripción p53 es clave para mantener la homeostasis y las proporciones de los tejidos en condiciones de estrés durante el desarrollo. p53 se activa e induce la transcripción de genes blancos específicos con funciones autónomas y no autónomas celulares.
- En condiciones de estrés las células activan un mecanismo molecular de señalización mediado por p53 que genera la activación de Eiger/TNF- $\alpha$  y la subsecuente activación de la vía JNK.
- El eje molecular p53-Eiger-JNK es necesario para generar efectos no autónomos de proliferación celular, apoptosis y crecimiento.
- Las especies reactivas del oxígeno (ROS) actúan en la coordinación intra-tejido y controlan la proliferación y la apoptosis no autónoma, de forma que intervienen en una señalización de corto alcance producida por las células apoptóticas estresadas y percibida por las células sanas del compartimento adyacente.
- El péptido de tipo insulina dILP8 actúa en el control del crecimiento y la coordinación inter-tejido. El mismo actuaría como una señal de largo alcance que es secretada por las células dañadas para comunicarse con el sistema neuroendócrino y producir la disminución del crecimiento general acompañado de un aumento del tiempo de desarrollo.
- El control del número de células y del crecimiento se regulan por mecanismos diferenciales y por tanto pueden ser desacoplados. Ambas señales, ROS y DILP8, se activan en las células dañadas por acción de p53-Eiger-JNK.
- La activación de p53 podría estar mediada por una disminución de los niveles del micro ARN mir-305 cuando el daño proviene de la inhibición del factor de transcripción Myc (utilización *myc<sup>RNAi</sup>*). Este mecanismo sería específico, ya que la utilización de Ricina no genera los mismos efectos de regulación mediada por micro ARNs.
- El receptor nuclear Hr51 posee funciones pro-apoptóticas, el mismo se activa en el proceso de coordinación estudiado y sería un presumible efector corriente abajo de p53 y la vía JNK.
- El tamaño de los tejidos es plástico y responde a los niveles de nutrientes disponibles durante el desarrollo, mientras que las proporciones de los tejidos se mantienen constantes y con un bajo nivel de ruido biológico aun cuando un organismo se desarrolla en condiciones de estrés (baja disponibilidad de nutrientes). Por lo que estos aspectos constituyen una prioridad característica del proceso de desarrollo.
- El mecanismo molecular descrito (p53-Eiger-JNK) interviene cuando una de las poblaciones celulares que conforma un tejido en desarrollo percibe un estrés que dificulta su crecimiento, mientras que en condiciones normales el mecanismo molecular descrito podría intervenir en el control fino del número de células que componen el tejido.



## 7. Bibliografía

1. Mesquita D, Dekanty A, Milán M. A dp53-dependent mechanism involved in coordinating tissue growth in *Drosophila*. PLoS Biol [Internet]. 2010;8(12):e1000566. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3001892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Green MM. 2010: A Century of *Drosophila* Genetics Through the Prism of the white Gene. Genetics [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2022 Feb 3];184(1):3–7. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/184/1/3/6062821>
3. Cassim J, Kolkman F, Helmer M. *Drosophila* models for human diseases. Vol. 1076, Advances in Experimental Medicine and Biology. 2018. 289–305 p.
4. Lamoureux DO, Sperber GH. Developmental Biology: A Guide for Experimental Study by Mary S. Tyler Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 1994, viii, 172 pp. Am J Med Genet [Internet]. 1995 Nov 6;59(2):268–268. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1320590229>
5. Ashburner M, Roote J. Maintenance of a *Drosophila* Laboratory: General Procedures. Cold Spring Harb Protoc [Internet]. 2007 Mar;2007(3):pdb.ip35. Available from: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.ip35>
6. Adams MD. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. Science (80- ) [Internet]. 2000 Mar 24 [cited 2016 Dec 9];287(5461):2185–95. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5461.2185>
7. Beira J V, Paro R. The legacy of *Drosophila* imaginal discs. Chromosoma [Internet]. 2016 Sep 7;125(4):573–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-016-0595-4>
8. Wang J, Dahmann C. Establishing compartment boundaries in *Drosophila* wing imaginal discs: An interplay between selector genes, signaling pathways and cell mechanics. Semin Cell Dev Biol [Internet]. 2020;107(March):161–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.07.008>
9. Neto-Silva RM, Wells BS, Johnston LA. Mechanisms of growth and homeostasis in the *Drosophila* wing. Annu Rev Cell Dev Biol. 2009;25:197–220.
10. Butler MJ, Jacobsen TL, Cain DM, Jarman MG, Hubank M, Whittle JRS, et al. Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. Development [Internet]. 2003 Feb 15;130(4):659–70. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/130/4/659/52087/Discovery-of-genes-with-highly-restricted>
11. Diaz de la Loza MC, Thompson BJ. Forces shaping the *Drosophila* wing. Mech Dev [Internet]. 2017;144:23–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2016.10.003>

12. Dekanty A, Milán M. The interplay between morphogens and tissue growth. *EMBO Rep* [Internet]. 2011;12(10):1003–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.172>
13. Romanova-Michaelides M, Aguilar-Hidalgo D, Jülicher F, Gonzalez-Gaitan M. The wing and the eye: A parsimonious theory for scaling and growth control? *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(6):591–608.
14. Texada MJ, Koyama T, Rewitz K. Regulation of body size and growth control. *Genetics*. 2020;216(2):269–313.
15. Irvine KD. The wing imaginal disc. 2022;
16. Neufeld TP, de la Cruz a F, Johnston L a, Edgar B a. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell*. 1998;93(7):1183–93.
17. Martín FA, Morata G. Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* [Internet]. 2006 Nov 15;133(22):4421–6. Available from: <https://doi.org/10.1242/dev.02618>
18. García-Bellido A. The cellular and genetic bases of organ size and shape in *Drosophila*. *Int J Dev Biol*. 2009;53(November):1291–303.
19. Bryant PJ, Levinson P. Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev Biol* [Internet]. 1985 Feb [cited 2017 Feb 10];107(2):355–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0012160685903173>
20. Parker J, Struhl G. Control of *Drosophila* wing size by morphogen range and hormonal gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(50):31935–44.
21. Strassburger K, Lutz M, Müller S, Teleman AA. Ecdysone regulates *Drosophila* wing disc size via a TORC1 dependent mechanism. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Nov 18;12(1):6684. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-26780-0>
22. Barrio L, Milán M. Boundary Dpp promotes growth of medial and lateral regions of the *Drosophila* wing. *Elife*. 2017;6:1–20.
23. Misra JR, Irvine KD. The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2018 Nov 23;52(1):65–87. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-120417-031621>
24. Muñoz-Nava LM, Flores-Flores M, Nahmad M. Inducing your neighbors to become like you: Cell recruitment in developmental patterning and growth. *Int J Dev Biol*. 2021;65(5–6):357–64.
25. Oliveira AC, Rebelo AR, Homem CCF. Integrating animal development: How hormones and metabolism regulate developmental transitions and brain formation. *Dev Biol* [Internet]. 2021;475(February):256–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.01.016>

26. Setiawan L, Pan X, Woods AL, O'Connor MB, Hariharan IK. The BMP2/4 ortholog dpp can function as an inter-organ signal that regulates developmental timing. *Life Sci Alliance*. 2018;1(6):1–17.
27. Malita A, Rewitz K. Interorgan communication in the control of metamorphosis. *Curr Opin Insect Sci* [Internet]. 2021;43:54–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.10.005>
28. Allard P, Tabin CJ. Achieving bilateral symmetry during vertebrate limb development. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(4):479–84.
29. Wolpert L. Arms and the man: The problem of symmetric growth. *PLoS Biol*. 2010;8(9):9–11.
30. Rutherford SL, Lindquist S. RutherfordLindquist1998. 1998;396(November):1–7. Available from: [papers3://publication/uuid/3EA7AEBB-68C6-4B03-81A9-DC873CC8553C](https://doi.org/10.1016/j.cell.1998.11.001)
31. Neto-Silva RM, Wells BS, Johnston LA. Mechanisms of growth and homeostasis in the *Drosophila* wing. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2015 Apr 30];25:197–220. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2760035&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Heredia F, Volonté Y, Pereirinha J, Fernandez-Acosta M, Casimiro AP, Belém CG, et al. The steroid-hormone ecdysone coordinates parallel pupariation neuromotor and morphogenetic subprograms via epidermis-to-neuron Dilp8-Lgr3 signal induction. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-23218-5>
33. Gontijo AM, Garelli A. Mechanisms of Development The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mech Dev* [Internet]. 2018;(April):0–1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.005>
34. Garelli A, Heredia F, Casimiro AP, Macedo A, Nunes C, Garcez M, et al. Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9732>
35. Debat V, Bloyer S, Faradji F, Gidaszewski N, Navarro N, Orozco-terWengel P, et al. Developmental stability: A major role for Cyclin G in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. 2011;7(10).
36. Gontijo AM, Garelli A. The biology and evolution of the Dilp8-Lgr3 pathway: A relaxin-like pathway coupling tissue growth and developmental timing control. *Mech Dev* [Internet]. 2018;154:44–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.04.005>
37. Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M. Imaginal Discs Secrete Insulin-Like Peptide 8 to Mediate Plasticity of Growth and Maturation. *Science (80- )* [Internet]. 2012

- May 4;336(6081):579–82. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1216735>
38. Colombani J, Andersen DS, Léopold P. Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing. *Science* (80- ). 2012;336(6081):582–5.
  39. Colombani J, Andersen DS, Boulan L, Boone E, Romero N, Virolle V, et al. *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Curr Biol*. 2015;25(20):2723–9.
  40. Roselló-Díez A, Madisen L, Bastide S, Zeng H, Joyner AL. Cell-nonautonomous local and systemic responses to cell arrest enable long-bone catch-up growth in developing mice. *PLoS Biol* [Internet]. 2017;1–28. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005086>
  41. Díaz-Benjumea J, Gaitán MAFG, García-Bellido A. Developmental genetics of the wing vein pattern of *Drosophila*. *Genome* [Internet]. 1989 Jan 15;31(2):612–9. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/g89-114>
  42. García-Bellido a, Cortés F, Milán M. Cell interactions in the control of size in *Drosophila* wings. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct;91(21):10222–6.
  43. Milán M, Campuzano S, García-Bellido a. Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1997;94(11):5691–6. Available from: <http://www.pnas.org/content/94/11/5691.abstract>
  44. Aylon Y, Oren M. The Paradox of p53: What , How , and Why ? 2016;
  45. Belyi VA, Ak P, Markert E, Wang H, Hu W, Puzio-Kuter A, et al. The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2010;2(6):a001198–a001198. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a001198%5Cnpapers3://publication/doi/10.1101/cshperspect.a001198>
  46. Sutcliffe JE, Brehm A. Of flies and men; p53, a tumour suppressor. *FEBS Lett*. 2004;567(1):86–91.
  47. Muller P a J, Vousden KH. P53 Mutations in Cancer. *Nat Cell Biol*. 2013 Jan;15(1):2–8.
  48. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*. 2006 Dec;6(12):909–23.
  49. Herzog G, Joerger AC, Shmueli MD, Fersht AR, Gazit E, Segal D. Evaluating *Drosophila* p53 as a model system for studying cancer mutations. *J Biol Chem*. 2012;287(53):44330–7.
  50. Ingaramo MC, Sánchez JA, Dekanty A. Regulation and function of p53: A perspective from *Drosophila* studies. *Mech Dev* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2020 Apr 26];154:82–90. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925477318300121?via%3Dihub>

51. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* [Internet]. 2017 Jul 13 [cited 2020 May 12];36(28):3943–56. Available from: <http://www.nature.com/articles/onc2016502>
52. Brodsky MH, Nordstrom W, Tsang G, Kwan E, Rubin GM, Abrams JM. *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*. 2000 Mar;101(1):103–13.
53. Brodsky MH, Weinert BT, Tsang G, Rong YS, McGinnis NM, Golic KG, et al. *Drosophila melanogaster* MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004;24(3):1219–31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=321428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Mollereau B, Ma D. The p53 control of apoptosis and proliferation: lessons from *Drosophila*. *Apoptosis* [Internet]. 2014;19(10):1421–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-014-1035-7>
55. Khoury MP, Bourdon J. The Isoforms of the p53 Protein The Isoforms of the p53 Protein. *Spring*. 2010;1–11.
56. Joruz SM, Bourdon JC. P53 isoforms: Key regulators of the cell fate decision. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8).
57. Zhang B, Rotelli M, Dixon M, Calvi BR. The function of *Drosophila* p53 isoforms in apoptosis. *Cell Death Differ* [Internet]. 2015;22(12):2058–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2015.40>
58. Chakravarti A, Thirimanne HN, Brown S, Calvi BR. *Drosophila* p53 isoforms have overlapping and distinct functions in germline genome integrity and oocyte quality control. *Elife*. 2022;11:1–27.
59. Park JH, Nguyen TTN, Lee EM, Castro-Aceituno V, Wagle R, Lee KS, et al. Role of p53 isoforms in the DNA damage response during *Drosophila* oogenesis. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-47913-y>
60. Barrio L, Dekanty A, Milán M. MicroRNA-Mediated Regulation of Dp53 in the *Drosophila* Fat Body Contributes to Metabolic Adaptation to Nutrient Deprivation. *Cell Rep*. 2014;8(2):528–41.
61. Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol*. 2011;3(1):44–50.
62. Jones MF, Lal A. MicroRNAs, wild-type and mutant p53: More questions than answers. *RNA Biol*. 2012;9(6):781–91.
63. Ayed A, Hupp T. p53 [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2010. 200 p. (Molecular Biology Intelligence Unit; vol. 1). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-8231-5>

64. Dai C, Gu W. P53 post-translational modification: Deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* [Internet]. 2010;16(11):528–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2010.09.002>
65. Schmitt AM, Garcia JT, Hung T, Flynn RA, Shen Y, Qu K, et al. An inducible long noncoding RNA amplifies DNA damage signaling. *Nat Genet* [Internet]. 2016;48(11):1370–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/ng.3673>
66. Ruiz-Losada M, González R, Peropadre A, Gil-Gálvez A, Tena JJ, Baonza A, et al. Coordination between cell proliferation and apoptosis after DNA damage in *Drosophila*. *Cell Death Differ*. 2022;29(4):832–45.
67. Pinal N, Calleja M, Morata G. Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of *Drosophila*: Roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration. *Open Biol*. 2019;9(3).
68. Stronach B. Dissecting JNK signaling, one KKKinase at a time. *Dev Dyn* [Internet]. 2005 Mar;232(3):575–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.20283>
69. Gan T, Fan L, Zhao L, Misra M, Liu M, Zhang M, et al. JNK Signaling in *Drosophila* Aging and Longevity. 2021;1–15.
70. Igaki T. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis* [Internet]. 2009 Aug 23;14(8):1021–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10495-009-0361-7>
71. Kuranaga E, Miura M. Genetic Analysis for JNK-mediated Apoptosis. *ACTA Histochem Cytochem* [Internet]. 2004;37(4):223–6. Available from: <http://doi.org/10.1267/ahc.37.223>
72. Shlevkov E, Morata G. A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death Differ*. 2012;19(3):451–60.
73. Kanda H, Miura M. Regulatory roles of JNK in programmed cell death. *J Biochem* [Internet]. 2004;136(1). Available from: <http://jb.oxfordjournals.org/content/136/1/1.short>
74. Santabárbara-Ruiz P, López-Santillán M, Martínez-Rodríguez I, Binagui-Casas A, Pérez L, Milán M, et al. ROS-Induced JNK and p38 Signaling Is Required for Unpaired Cytokine Activation during *Drosophila* Regeneration. Copenhaver GP, editor. *PLOS Genet* [Internet]. 2015 Oct 23;11(10):e1005595. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1005595>
75. Blaser H, Dostert C, Mak TW, Brenner D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. *Trends Cell Biol*. 2016;26(4):249–61.
76. Diwanji N, Bergmann A. An unexpected friend – ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: Implications for regeneration and cancer. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2018;80:74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.004>

77. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):813–24.
78. Khan SJ, Abidi SNF, Skinner A, Tian Y, Smith-Bolton RK. The *Drosophila* Duox maturation factor is a key component of a positive feedback loop that sustains regeneration signaling. Bosco G, editor. *PLOS Genet* [Internet]. 2017 Jul 28 [cited 2020 Jun 23];13(7):e1006937. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006937>
79. Morata G, Ripoll P. Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol.* 1975;42(2):211–21.
80. Simpson P. Parameters of cell competition in the compartments of the wing disc of *Drosophila*. *Dev Biol.* 1979;69(1):182–93.
81. Vincent J-P, Fletcher AG, Baena-Lopez LA. Mechanisms and mechanics of cell competition in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013;14(9):581–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942450>
82. Kucinski I, Dinan M, Kolahgar G, Piddini E. Chronic activation of JNK JAK/STAT and oxidative stress signalling causes the loser cell status. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00145-y>
83. De La Cova C, Senoo-Matsuda N, Ziosi M, Wu DC, Bellosta P, Quinzii CM, et al. Supercompetitor status of *Drosophila* Myc cells requires p53 as a Fitness sensor to reprogram metabolism and promote viability. *Cell Metab* [Internet]. 2014;19(3):470–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.012>
84. Adachi-Yamada T, O'Connor MB. Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells: Cell competition and morphogenetic apoptosis. *J Biochem.* 2004;136(1):13–7.
85. Fogarty CE, Bergmann A. The sound of silence: Signaling by apoptotic cells [Internet]. 1st ed. Vol. 114, *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Inc.; 2015. 241–265 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.013>
86. Bergantinos C, Corominas M, Serras F. Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2020 Jun 23];137(7):1169–79. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.045559>
87. Wells BS, Johnston LA. Maintenance of imaginal disc plasticity and regenerative potential in *Drosophila* by p53. *Dev Biol* [Internet]. 2012 Jan;361(2):263–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160611013182>
88. Milán M, Campuzano S, García-Bellido A. Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1996 Jan 23 [cited 2017 Feb 28];93(2):640–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8570608>
89. Landt SG, Marinov GK, Kundaje A, Kheradpour P, Pauli F, Batzoglou S, et al. CHIP-seq

- guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome Res.* 2012 Sep;22(9):1813–31.
90. Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *J Am Stat Assoc* [Internet]. 2004;99(468):909–17. Available from: <http://www.jstor.org/stable/27590474>
  91. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 Feb 28];4(1):44–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131956>
  92. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Feb 28];37(1):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033363>
  93. Tripathi S, Pohl MO, Zhou Y, Rodriguez-Frandsen A, Wang G, Stein DA, et al. Meta- and Orthogonal Integration of Influenza &quot;OMICs&quot; Data Defines a Role for UBR4 in Virus Budding. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2015 Dec 9 [cited 2017 Feb 28];18(6):723–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312815004564>
  94. Lyne R, Smith R, Rutherford K, Wakeling M, Varley A, Guillier F, et al. FlyMine: an integrated database for *Drosophila* and Anopheles genomics. *Genome Biol* [Internet]. 2007 [cited 2017 Feb 28];8(7):R129. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2007-8-7-r129>
  95. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* [Internet]. 2000 May [cited 2017 Feb 28];25(1):25–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/75556>
  96. Akdemir F, Christich a, Sogame N, Chapo J, Abrams JM. p53 directs focused genomic responses in *Drosophila*. *Oncogene* [Internet]. 2007;26(36):5184–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310982>
  97. van Bergeijk P, Heimiller J, Uyetake L, Su TT. Genome-wide expression analysis identifies a modulator of ionizing radiation-induced p53-independent apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* 2012;7(5).
  98. Merlo P, Frost B, Peng S, Yang YJ, Park PJ, Feany M. p53 prevents neurodegeneration by regulating synaptic genes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 Dec 16;111(50):18055–60. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1419083111>
  99. Kudron MM, Victorsen A, Gevirtzman L, Hillier LW, Fisher WW, Vafeados D, et al. The ModERN Resource: Genome-Wide Binding Profiles for Hundreds of *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* Transcription Factors. *Genetics* [Internet]. 2018 Mar 1;208(3):937–49. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/208/3/937/6066457>



100. Ollmann M, Young LM, Di Como CJ, Karim F, Belvin M, Robertson S, et al. *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell*. 2000 Mar;101(1):91–101.
101. Igaki T, Kanda H, Yanamoto-Goto Y, Kanuka H, Kuranaga E, Aigaki T, et al. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J* [Internet]. 2002 Jun 17 [cited 2015 Apr 30];21(12):3009–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
102. Sarov M, Barz C, Jambor H, Hein MY, Schmied C, Suchold D, et al. A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. Bellen HJ, editor. *Elife* [Internet]. 2016;5:e12068. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.12068>
103. Muzzopappa M, Murcia L, Milán M. Feedback amplification loop drives malignant growth in epithelial tissues. 2017;
104. Ring JM, Martinez Arias A. puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Dev Suppl* [Internet]. 1993;251–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8049480>
105. Russell MA. Pattern formation in the imaginal discs of a temperature-sensitive cell-lethal mutant of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* [Internet]. 1974 Sep;40(1):24–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0012160674901043>
106. Simpson P, Schneiderman HA. Isolation of temperature sensitive mutations blocking clone development in *Drosophila melanogaster*, and the effects of a temperature sensitive cell lethal mutation on pattern formation in imaginal discs. *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* [Internet]. 1975;178(3):247–75. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00848432>
107. Halme A, Cheng M, Hariharan IK. Retinoids Regulate a Developmental Checkpoint for Tissue Regeneration in *Drosophila*. *Curr Biol* [Internet]. 2010 Mar;20(5):458–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982210000801>
108. Colombani J, Andersen DS, Leopold P. Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing. *Science (80- )* [Internet]. 2012 May 4 [cited 2020 Jun 23];336(6081):582–5. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1216689>
109. Garelli A, Heredia F, Casimiro AP, Macedo A, Nunes C, Garcez M, et al. Dilp8 requires the neuronal relaxin receptor Lgr3 to couple growth to developmental timing. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Dec 29;6(1):8732. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9732>
110. Vallejo DM, Bolivar J. A brain circuit that synchronizes growth and maturation revealed through Dilp8 binding to Lgr3. 2015;(October):1–16.

111. Lee C-H, Kiparaki M, Blanco J, Folgado V, Ji Z, Kumar A, et al. A Regulatory Response to Ribosomal Protein Mutations Controls Translation, Growth, and Cell Competition. *Dev Cell* [Internet]. 2018 Aug;46(4):456-469.e4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580718305562>
112. Kale A, Li W, Lee C-H, Baker NE. Apoptotic mechanisms during competition of ribosomal protein mutant cells: roles of the initiator caspases Dronc and Dream/Strica. *Cell Death Differ* [Internet]. 2015 Aug 23;22(8):1300-12. Available from: <http://www.nature.com/articles/cdd2014218>
113. Kiparaki M, Khan C, Folgado-Marco V, Chuen J, Moulos P, Baker NE. The transcription factor Xrp1 orchestrates both reduced translation and cell competition upon defective ribosome assembly or function. *Elife* [Internet]. 2022 Feb 18;11. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.71705>
114. Boulan L, Andersen D, Colombani J, Boone E, Léopold P. Inter-Organ Growth Coordination Is Mediated by the Xrp1-Dilp8 Axis in *Drosophila*. *Dev Cell* [Internet]. 2019 Jun;49(5):811-818.e4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580719302278>
115. Sykiotis GP, Bohmann D. Keap1/Nrf2 Signaling Regulates Oxidative Stress Tolerance and Lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* [Internet]. 2008 Jan;14(1):76-85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580707004790>
116. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016(Figure 1).
117. Barrio L, Dekanty A, Milán M. miRNA-mediated regulation of Dp53 in the *Drosophila* fat body contributes to metabolic adaptation to nutrient deprivation. *Cell Rep*. 2014;in press.
118. Bates KE, Molnar J, Robinow S. The unfulfilled gene and nervous system development in *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* [Internet]. 2015 Feb;1849(2):217-23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939914001655>
119. Beuchle D, Jaumouillé E, Nagoshi E. The Nuclear Receptor unfulfilled Is Required for Free-Running Clocks in *Drosophila* Pacemaker Neurons. *Curr Biol* [Internet]. 2012 Jul;22(13):1221-7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212004721>
120. Chen F, Figueroa DJ, Marmorstein AD, Zhang Q, Petrukhin K, Caskey CT, et al. Retina-specific nuclear receptor: A potential regulator of cellular retinaldehyde-binding protein expressed in retinal pigment epithelium and Müller glial cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1999 Dec 21;96(26):15149-54. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.96.26.15149>
121. Much JW, Slade DJ, Klampert K, Garriga G, Wightman B. The fax-1 nuclear hormone receptor regulates axon pathfinding and neurotransmitter expression. *Development* [Internet].

- 2000 Feb 15;127(4):703–12. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/127/4/703/41147/The-fax-1-nuclear-hormone-receptor-regulates-axon>
122. Khanal T, Leung Y-K, Jiang W, Timchenko N, Ho S-M, Kim K. NR2E3 is a key component in p53 activation by regulating a long noncoding RNA DINO in acute liver injuries. *FASEB J* [Internet]. 2019 Jul 16;33(7):8335–48. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201801881RR>
123. Agrawal N, Delanoue R, Mauri A, Basco D, Pasco M, Thorens B, et al. The *Drosophila* TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response. *Cell Metab*. 2016;23(4):675–84.
124. Kanda H, Igaki T, Kanuka H, Yagi T, Miura M. Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for eiger signaling. *J Biol Chem*. 2002;277(32):28372–5.
125. Kauppila S, Maaty WS a, Chen P, Tomar RS, Eby MT, Chapo J, et al. Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. *Oncogene*. 2003;22(31):4860–7.
126. Andersen DS, Colombani J, Palmerini V, Chakrabandhu K, Boone E, Röthlisberger M, et al. The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature* [Internet]. 2015;522(7557):482–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874673>
127. Palmerini V, Monzani S, Laurichesse Q, Loudhaief R, Mari S, Cecatiello V, et al. *Drosophila* TNFRs Grindelwald and Wengen bind Eiger with different affinities and promote distinct cellular functions. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22080-9>
128. Narasimamurthy R, Geuking P, Ingold K, Willen L, Schneider P, Basler K. Structure-function analysis of Eiger, the *Drosophila* TNF homolog. *Cell Res* [Internet]. 2009 Mar;19(3):392–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223855>
129. Kanda H, Igaki T, Okano H, Miura M. Conserved metabolic energy production pathways govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011 Nov 22;108(47):18977–82. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103242108>
130. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011;194(1):7–15.
131. Sinenko SA, Starkova TY, Kuzmin AA, Tomilin AN. Physiological Signaling Functions of Reactive Oxygen Species in Stem Cells: From Flies to Man. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(August):1–21.
132. Serras F. The sooner, the better: ROS, kinases and nutrients at the onset of the damage

- response in *Drosophila*. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022 Oct 24;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.1047823/full>
133. Brock AR, Seto M, Smith-Bolton RK. Cap-n-Collar Promotes Tissue Regeneration by Regulating ROS and JNK Signaling in the *Drosophila melanogaster* Wing Imaginal Disc. *Genetics* [Internet]. 2017 Jul 1;206(3):1505–20. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/206/3/1505/6064213>
  134. Lee N, Maurange C, Ringrose L, Paro R. Suppression of Polycomb group proteins by JNK signalling induces transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Nature* [Internet]. 2005;438(7065):234–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature04120>
  135. Ritsick DR, Edens WA, McCoy JW, Lambeth JD. The use of model systems to study biological functions of Nox/Duox enzymes. Cooper C, Wilson M, Darley-Usmar V, editors. *Biochem Soc Symp* [Internet]. 2004 Mar 1;71:85–96. Available from: <https://portlandpress.com/biochemsocsymp/article/doi/10.1042/bss0710085/50375/The-use-of-model-systems-to-study-biological>
  136. Fogarty CE, Diwanji N, Lindblad JL, Tare M, Amcheslavsky A, Makhijani K, et al. Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced Proliferation via *Drosophila* Macrophages. *Curr Biol* [Internet]. 2016 Mar;26(5):575–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnb.2015.12.064>
  137. Colombani J, Andersen DS, Léopold P. Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing. *Science* (80- ). 2012;336(6081).
  138. Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M. Imaginal Discs Secrete Insulin-Like Peptide 8 to Mediate Plasticity of Growth and Maturation. *Science* (80- ). 2012;336(6081).
  139. Gokhale RH, Hayashi T, Mirque CD, Shingleton AW. Intra-organ growth coordination in *Drosophila* is mediated by systemic ecdysone signaling. *Dev Biol* [Internet]. 2016;418(1):135–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.016>
  140. Colombani J, Andersen DS, Leopold P. Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing. *Science* (80- ) [Internet]. 2012 May 4;336(6081):582–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1216689>
  141. Boone E, Colombani J, Andersen DS, Léopold P. The Hippo signalling pathway coordinates organ growth and limits developmental variability by controlling dilp8 expression. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Nov 22 [cited 2017 Feb 24];7:13505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27874005>
  142. Blanco-Obregon D, El Marzkioui K, Brutscher F, Kapoor V, Valzania L, Andersen DS, et al. A Dilp8-dependent time window ensures tissue size adjustment in *Drosophila*. *Nat Commun*

[Internet]. 2022 Sep 26;13(1):5629. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-33387-6>

## 8. Anexo

**Tabla 6.** Genes diferencialmente expresados en el análisis de microarreglo de discos de ala del genotipo *en>RA,GFP* con respecto al control *en>GFP*. Genes subrayados fueron validados por RT-qPCR.

<b>Gene Name</b>	<b>FlyBase ID</b>	<b>Descripción</b>	<b>logFC</b>	<b>P.Value</b>
<b><u>CG6908</u></b>	FBgn0037936	CG6908 gene product from transcript CG6908-RA	9.7	1.4E-06
<b><u>CG11893</u></b>	FBgn0039316	CG11893 gene product from transcript CG11893-RA	8.4	5.5E-07
<b><u>CG14695</u></b>	FBgn0037850	CG14695 gene product from transcript CG14695-RA	6.7	1.2E-05
<b><u>CG33468</u></b>	FBgn0053468	CG33468 gene product from transcript CG33468-RA	6.4	2.6E-05
<b><u>CG13659</u></b>	FBgn0039319	CG13659 gene product from transcript CG13659-RA	6.2	3.0E-05
<b><u>CG31436</u></b>	FBgn0051436	CG31436 gene product from transcript CG31436-RA	5.7	1.6E-04
<b><u>Arc1</u></b>	FBgn0033926	Activity-regulated cytoskeleton associated protein 1	5.4	1.4E-07
<b><u>Hr51</u></b>	FBgn0034012	Hormone receptor 51	4.9	4.0E-06
<b><u>CG42365</u></b>	FBgn0259711	CG42365 gene product from transcript CG42365-RA	4.3	2.5E-05
<b><u>CG32368</u></b>	FBgn0052368	CG32368 gene product from transcript CG32368-RA	4.3	2.5E-04
<b><u>CG30269</u></b>	FBgn0050269	CG30269 gene product from transcript CG30269-RB	4.2	1.6E-03
<b><u>CG12868</u></b>	FBgn0033945	CG12868 gene product from transcript CG12868-RB	4.1	4.4E-06
<b><u>Ilp8</u></b>	FBgn0036690	Insulin-like peptide 8	3.9	6.6E-03
<b><u>Gp210</u></b>	FBgn0266580	Gp210 ortholog (H. sapiens)	3.9	1.1E-02
<b><u>Swim</u></b>	FBgn0034709	Secreted Wg-interacting molecule	3.8	4.0E-05
<b><u>CG15784</u></b>	FBgn0029766	CG15784 gene product from transcript CG15784-RB	3.7	2.7E-05
<b><u>Sodh-2</u></b>	FBgn0022359	Sorbitol dehydrogenase-2	3.7	2.0E-03
<b><u>TotA</u></b>	FBgn0028396	Turandot A	3.6	1.2E-02
<b><u>CG33469</u></b>	FBgn0053469	CG33469 gene product from transcript CG33469-RB	3.6	1.4E-06
<b><u>CG11897</u></b>	FBgn0039644	CG11897 gene product from transcript CG11897-RB	3.3	8.8E-04
<b><u>GstE6</u></b>	FBgn0063494	Glutathione S transferase E6	3.3	1.4E-05
<b><u>CG31279</u></b>	FBgn0051279	CG31279 gene product from transcript CG31279-RD	3.1	1.0E-02
<b><u>sun</u></b>	FBgn0052088	sisters unbound	3.1	1.0E-03
<b><u>LManII</u></b>	FBgn0027611	Lysosomal alpha-mannosidase II	2.9	7.0E-03
<b><u>CG4576</u></b>	FBgn0038366	CG4576 gene product from transcript CG4576-RA	2.9	7.2E-04
<b><u>ImpL3</u></b>	FBgn0001258	Ecdysone-inducible gene L3	2.9	5.6E-04
<b><u>Ir76a</u></b>	FBgn0260874	Ionotropic receptor 76a	2.9	5.4E-03
<b><u>MtnA</u></b>	FBgn0002868	Metallothionein A	2.9	3.4E-04
<b><u>Glut1</u></b>	FBgn0264574	Glucose transporter 1	2.9	1.7E-06
<b><u>Damm</u></b>	FBgn0033659	Death associated molecule related to Mch2 caspase	2.8	4.4E-06
<b><u>Spn47C</u></b>	FBgn0033574	Serpin 47C	2.8	1.7E-05
<b><u>CG6678</u></b>	FBgn0038917	CG6678 gene product from transcript CG6678-RA	2.7	1.7E-02
<b><u>CG8620</u></b>	FBgn0040837	CG8620 gene product from transcript CG8620-RA	2.6	3.8E-03
<b><u>GstD5</u></b>	FBgn0010041	Glutathione S transferase D5	2.6	4.0E-03
<b><u>CG12535</u></b>	FBgn0029657	CG12535 gene product from transcript CG12535-RF	2.5	1.9E-05
<b><u>CG17018</u></b>	FBgn0039972	CG17018 gene product from transcript CG17018-RE	2.5	6.3E-03
<b><u>CG32625</u></b>	FBgn0052625	CG32625 gene product from transcript CG32625-RA	2.4	5.5E-03
<b><u>CG32195</u></b>	FBgn0052195	CG32195 gene product from transcript CG32195-RA	2.4	2.5E-04
<b><u>CG7768</u></b>	FBgn0036415	CG7768 gene product from transcript CG7768-RA	2.3	2.8E-04
<b><u>Gadd45</u></b>	FBgn0033153	CG11086 gene product from transcript CG11086-RA	2.3	4.0E-04
<b><u>CG11263</u></b>	FBgn0036330	CG11263 gene product from transcript CG11263-RA	2.3	2.6E-03
<b><u>CG34227</u></b>	FBgn0085256	CG34227 gene product from transcript CG34227-RA	2.2	2.2E-03
<b><u>CG30424</u></b>	FBgn0050424	CG30424 gene product from transcript CG30424-RB	2.2	3.6E-03

<i>Rph</i>	FBgn0030230	Rabphilin	2.2	4.7E-02
<i>CG10337</i>	FBgn0032805	CG10337 gene product from transcript CG10337-RA	2.2	4.1E-03
<i>CG31705</i>	FBgn0028490	CG31705 gene product from transcript CG31705-RE	2.1	1.3E-02
<i>Gbeta5</i>	FBgn0030011	CG10763 gene product from transcript CG10763-RA	2.0	4.8E-04
<i>CG31370</i>	FBgn0051370	CG31370 gene product from transcript CG31370-RB	2.0	7.8E-03
<i>Mocs1</i>	FBgn0263241	Molybdenum cofactor synthesis 1 ortholog	2.0	6.0E-04
<i>moody</i>	FBgn0025631	CG4322 gene product from transcript CG4322-RD	2.0	2.5E-02
<i>mbi</i>	FBgn0265487	CG33197 gene product from transcript CG33197-RP	1.9	1.7E-04
<i>CG3568</i>	FBgn0029710	CG3568 gene product from transcript CG3568-RA	1.9	5.1E-03
<i>Tg</i>	FBgn0031975	Transglutaminase	1.9	4.7E-03
<i>CG9171</i>	FBgn0031738	CG9171 gene product from transcript CG9171-RD	1.9	4.1E-04
<i>nAChRalpha4</i>	FBgn0266347	nicotinic Acetylcholine Receptor alpha4	1.8	2.9E-02
<i>unc-13-4A</i>	FBgn0035756	CG32381 gene product from transcript CG32381-RC	1.8	3.4E-02
<i>CG14275</i>	FBgn0032022	CG14275 gene product from transcript CG14275-RA	1.8	1.1E-02
<i>CG3008</i>	FBgn0031643	CG3008 gene product from transcript CG3008-RA	1.8	7.3E-05
<i>CG3448</i>	FBgn0035996	CG3448 gene product from transcript CG3448-RB	1.8	1.5E-03
<i>CG15611</i>	FBgn0034194	CG15611 gene product from transcript CG15611-RA	1.7	7.9E-05
<i>CG31633</i>	FBgn0051633	CG31633 gene product from transcript CG31633-RA	1.7	5.1E-04
<i>CG43117</i>	FBgn0262577	CG43117 gene product from transcript CG43117-RB	1.7	1.3E-03
<i>CG1299</i>	FBgn0035501	CG1299 gene product from transcript CG1299-RA	1.7	3.3E-03
<i>CG2909</i>	FBgn0030189	CG2909 gene product from transcript CG2909-RA	1.6	8.3E-03
<i>CG14879</i>	FBgn0038419	CG14879 gene product from transcript CG14879-RC	1.6	3.6E-02
<i>CG15739</i>	FBgn0030347	CG15739 gene product from transcript CG15739-RA	1.6	4.0E-02
<i>spn-E</i>	FBgn0003483	spindle E	1.6	2.3E-02
<i>Rab9</i>	FBgn0032782	CG9994 gene product from transcript CG9994-RA	1.5	1.5E-03
<i>CG2201</i>	FBgn0032955	CG2201 gene product from transcript CG2201-RF	1.5	3.8E-03
<i>CR42646</i>	FBgn0261429	ncRNA	1.5	2.1E-03
<i>e(y)2b</i>	FBgn0040670	enhancer of yellow 2b	1.5	2.4E-02
<i>her</i>	FBgn0001185	hermaphrodite	1.5	2.5E-02
<i>Cyp6g2</i>	FBgn0033696	CG8859 gene product from transcript CG8859-RA	1.5	3.6E-03
<i>Arc2</i>	FBgn0033928	CG13941 gene product from transcript CG13941-RA	1.4	8.8E-04
<i>CG7924</i>	FBgn0036416	CG7924 gene product from transcript CG7924-RA	1.4	4.4E-02
<i>Ror</i>	FBgn0010407	CG4926 gene product from transcript CG4926-RA	1.4	4.3E-02
<i>CG32196</i>	FBgn0052196	CG32196 gene product from transcript CG32196-RC	1.4	3.1E-03
<i>CHKov2</i>	FBgn0039328	CG10675 gene product from transcript CG10675-RA	1.4	5.8E-04
<i>eqr</i>	FBgn0033483	eiger	1.3	1.1E-02
<i>CG7997</i>	FBgn0034117	CG7997 gene product from transcript CG7997-RB	1.3	1.5E-02
<i>Ugt86Di</i>	FBgn0040251	CG6658 gene product from transcript CG6658-RB	1.3	7.3E-04
<i>CG11843</i>	FBgn0039630	CG11843 gene product from transcript CG11843-RB	1.3	1.0E-02
<i>CG13248</i>	FBgn0036984	CG13248 gene product from transcript CG13248-RA	1.3	4.6E-03
<i>FucTC</i>	FBgn0044872	CG40305 gene product from transcript CG40305-RB	1.3	2.9E-02
<i>CG2017</i>	FBgn0037391	CG2017 gene product from transcript CG2017-RD	1.3	4.4E-03
<i>Zmynd10</i>	FBgn0266709	ZMYND10 homolog	1.3	1.3E-02
<i>CG8950</i>	FBgn0034186	CG8950 gene product from transcript CG8950-RB	1.3	1.5E-04
<i>CG7322</i>	FBgn0030968	CG7322 gene product from transcript CG7322-RA	1.3	1.6E-02
<i>lama</i>	FBgn0016031	lamina ancestor	1.3	3.1E-02
<i>CG13255</i>	FBgn0040636	CG13255 gene product from transcript CG13255-RB	1.3	3.3E-03
<i>Ku80</i>	FBgn0041627	CG18801 gene product from transcript CG18801-RA	1.3	7.3E-03
<i>CG17470</i>	FBgn0032869	CG17470 gene product from transcript CG17470-RA	1.2	1.5E-02

<i>Shal</i>	FBgn0005564	Shaker cognate I	1.2	2.3E-02
<b>CG13029</b>	FBgn0036670	CG13029 gene product from transcript CG13029-RC	1.2	2.2E-04
<i>Blos2</i>	FBgn0036118	Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1	1.2	7.1E-03
<b>CG6321</b>	FBgn0036117	CG6321 gene product from transcript CG6321-RA	1.2	3.5E-02
<i>plum</i>	FBgn0039431	CG6490 gene product from transcript CG6490-RD	1.2	5.5E-04
<i>GstE7</i>	FBgn0063493	Glutathione S transferase E7	1.2	1.9E-04
<b>CG6272</b>	FBgn0036126	CG6272 gene product from transcript CG6272-RB	1.2	5.4E-04
<i>Gcn5</i>	FBgn0020388	Gcn5 ortholog	1.2	1.1E-02
<b>CG13024</b>	FBgn0036665	CG13024 gene product from transcript CG13024-RC	1.2	1.8E-02
<b>CG32549</b>	FBgn0052549	CG32549 gene product from transcript CG32549-RD	1.2	4.2E-02
<b>CG14545</b>	FBgn0040602	CG14545 gene product from transcript CG14545-RA	1.2	1.0E-02
<b>CG6701</b>	FBgn0033889	CG6701 gene product from transcript CG6701-RD	1.2	2.3E-02
<i>GstE9</i>	FBgn0063491	Glutathione S transferase E9	1.2	3.0E-03
<b>CG13890</b>	FBgn0035169	CG13890 gene product from transcript CG13890-RA	1.1	6.9E-05
<b>CG6426</b>	FBgn0034162	CG6426 gene product from transcript CG6426-RA	1.1	2.7E-02
<b>CG10916</b>	FBgn0034312	CG10916 gene product from transcript CG10916-RB	1.1	4.4E-04
<b>CG3726</b>	FBgn0029824	CG3726 gene product from transcript CG3726-RB	1.1	2.0E-02
<b>CG6762</b>	FBgn0030876	CG6762 gene product from transcript CG6762-RD	1.1	4.9E-02
<b>CG31694</b>	FBgn0051694	CG31694 gene product from transcript CG31694-RA	1.1	1.2E-02
<i>Pvfl</i>	FBgn0030964	PDGF- and VEGF-related factor 1	1.1	4.6E-02
<i>fan</i>	FBgn0028379	farinelli	1.1	4.7E-02
<b>CG42299</b>	FBgn0259195	CG42299 gene product from transcript CG42299-RA	1.1	2.4E-02
<i>Alg-2</i>	FBgn0086378	Apoptosis-linked gene-2	1.1	8.8E-03
<b>CG32645</b>	FBgn0052645	CG32645 gene product from transcript CG32645-RB	1.1	1.1E-02
<i>Ttc19</i>	FBgn0032744	Tetratricopeptide repeat domain 19	1.0	5.8E-03
<b>CG7367</b>	FBgn0031976	CG7367 gene product from transcript CG7367-RD	1.0	1.1E-02
<i>LamC</i>	FBgn0010397	Lamin C	1.0	4.1E-02
<b>CG18094</b>	FBgn0032791	CG18094 gene product from transcript CG18094-RB	1.0	2.3E-02
<i>Gclc</i>	FBgn0040319	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit	1.0	8.5E-04
<i>Xrp1</i>	FBgn0261113	CG17836 gene product from transcript CG17836-RB	1.0	9.4E-04
<b>CG3009</b>	FBgn0029720	CG3009 gene product from transcript CG3009-RD	-1.0	4.6E-02
<i>hd</i>	FBgn0086695	humpty dumpty	-1.0	1.4E-02
<b>CG30099</b>	FBgn0050099	CG30099 gene product from transcript CG30099-RA	-1.0	1.0E-03
<b>CG9850</b>	FBgn0034903	CG9850 gene product from transcript CG9850-RC	-1.0	4.2E-02
<i>Gbs-76A</i>	FBgn0036862	Glycogen binding subunit 76A	-1.0	7.5E-03
<b>CG14598</b>	FBgn0037503	CG14598 gene product from transcript CG14598-RA	-1.1	3.4E-02
<i>kar</i>	FBgn0001296	karmoisin	-1.1	2.3E-02
<b>CG13044</b>	FBgn0036599	CG13044 gene product from transcript CG13044-RA	-1.1	4.7E-03
<b>CG4562</b>	FBgn0038740	CG4562 gene product from transcript CG4562-RC	-1.1	2.5E-02
<b>CG13737</b>	FBgn0036382	CG13737 gene product from transcript CG13737-RA	-1.1	4.6E-02
<i>Sep4</i>	FBgn0259923	Septin 4	-1.1	1.3E-02
<i>mthl4</i>	FBgn0034219	methuselah-like 4	-1.1	2.9E-03
<b>CG10211</b>	FBgn0032685	CG10211 gene product from transcript CG10211-RB	-1.2	4.1E-02
<b>RhoGAP100F</b>	FBgn0039883	Rho GTPase activating protein at 100F	-1.2	2.5E-02
<i>grass</i>	FBgn0039494	Gram-positive Specific Serine protease	-1.2	7.4E-03
<b>CG15356</b>	FBgn0031377	CG15356 gene product from transcript CG15356-RA	-1.2	4.9E-02
<b>CR31451</b>	FBgn0051451	ncRNA	-1.2	2.2E-02
<b>NaCP60E</b>	FBgn0085434	Na channel protein 60E	-1.3	3.2E-02
<i>se</i>	FBgn0086348	sepia	-1.3	4.2E-02

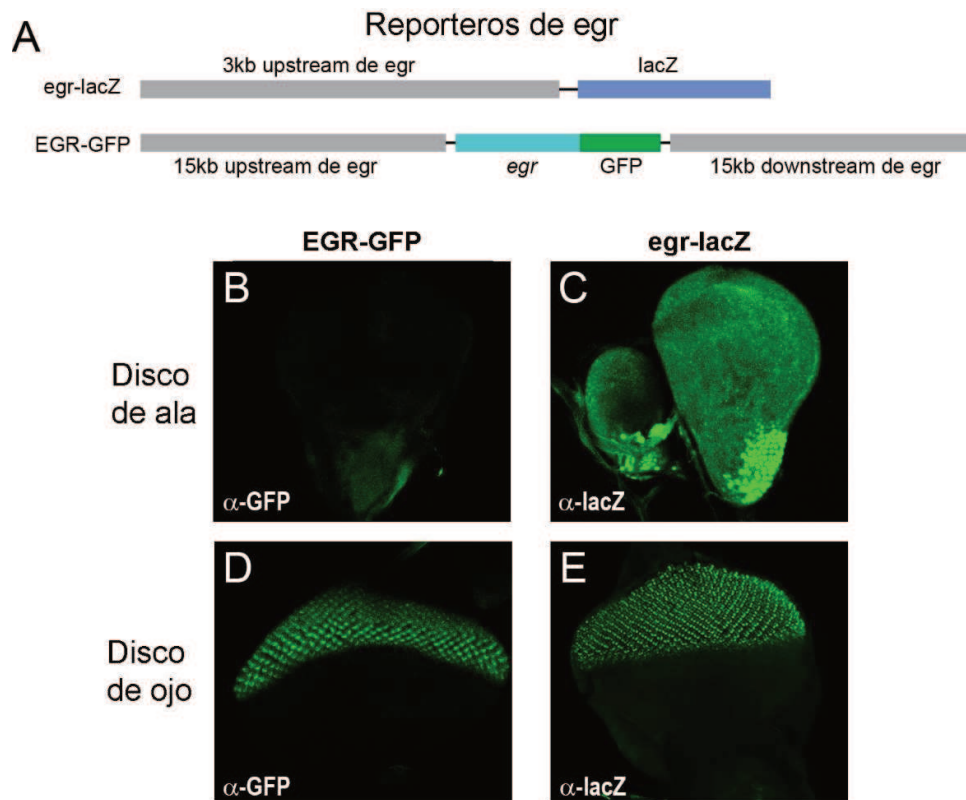


<b>CG14785</b>	FBgn0027795	CG14785 gene product from transcript CG14785-RA	-1.3	3.8E-04
<b>CG31495</b>	FBgn0051495	CG31495 gene product from transcript CG31495-RA	-1.3	4.7E-03
<b>Pdp1</b>	FBgn0016694	PAR-domain protein 1	-1.3	3.0E-02
<b>CG1698</b>	FBgn0033443	CG1698 gene product from transcript CG1698-RA	-1.4	4.5E-02
<b>CG9961</b>	FBgn0031451	CG9961 gene product from transcript CG9961-RB	-1.4	2.1E-02
<b>l(2)34Fc</b>	FBgn0261534	lethal (2) 34Fc	-1.4	7.8E-03
<b>CG10804</b>	FBgn0029663	CG10804 gene product from transcript CG10804-RD	-1.5	2.4E-02
<b>CG4313</b>	FBgn0025632	CG4313 gene product from transcript CG4313-RE	-1.5	1.8E-03
<b>CG14566</b>	FBgn0037127	CG14566 gene product from transcript CG14566-RB	-1.5	3.3E-03
<b>Sema-1a</b>	FBgn0011259	CG18405 gene product from transcript CG18405-RE	-1.5	9.4E-04
<b>Faa</b>	FBgn0016013	Fumarylacetoacetase	-1.6	1.5E-02
<b>Obp56a</b>	FBgn0034468	Odorant-binding protein 56a	-1.6	4.9E-02
<b>CG1894</b>	FBgn0039585	CG1894 gene product from transcript CG1894-RA	-1.6	5.9E-03
<b>CG31324</b>	FBgn0051324	CG31324 gene product from transcript CG31324-RB	-1.6	8.5E-03
<b>CG5335</b>	FBgn0034365	CG5335 gene product from transcript CG5335-RA	-1.6	2.8E-02
<b>CG34002</b>	FBgn0054002	CG34002 gene product from transcript CG34002-RB	-1.6	4.8E-04
<b>Cyp4e2</b>	FBgn0014469	Cytochrome P450-4e2	-1.6	1.2E-03
<b>CG17803</b>	FBgn0038547	CG17803 gene product from transcript CG17803-RB	-1.6	1.4E-03
<b>pgant8</b>	FBgn0036529	polypeptide GalNAc transferase 8	-1.6	4.9E-04
<b>pst</b>	FBgn0035770	pastrel	-1.6	4.1E-03
<b>CG13692</b>	FBgn0031254	CG13692 gene product from transcript CG13692-RA	-1.7	5.1E-03
<b>dnc</b>	FBgn0000479	dunce	-1.7	1.1E-02
<b>CG31140</b>	FBgn0051140	CG31140 gene product from transcript CG31140-RB	-1.7	1.7E-02
<b>CG10344</b>	FBgn0034729	CG10344 gene product from transcript CG10344-RA	-1.8	9.6E-04
<b>CG18537</b>	FBgn0034323	CG18537 gene product from transcript CG18537-RA	-1.9	6.7E-04
<b>Rbm13</b>	FBgn0030067	RNA-binding motif protein 13	-1.9	7.9E-03
<b>tut</b>	FBgn0052364	tumorous testis	-1.9	3.1E-04
<b>CG3323</b>	FBgn0029750	CG3323 gene product from transcript CG3323-RA	-1.9	2.5E-03
<b>Cadps</b>	FBgn0053653	Calcium-dependent secretion activator	-1.9	1.8E-04
<b>CG3168</b>	FBgn0029896	CG3168 gene product from transcript CG3168-RG	-2.0	1.4E-02
<b>CG15465</b>	FBgn0029746	CG15465 gene product from transcript CG15465-RB	-2.2	2.2E-02
<b>Rpn13R</b>	FBgn0029745	Regulatory particle non-ATPase 13-related	-2.4	1.3E-03
<b>CG5455</b>	FBgn0039430	CG5455 gene product from transcript CG5455-RA	-2.7	3.9E-05
<b>fend</b>	FBgn0030090	forked end	-3.1	3.9E-03
<b>GstE1</b>	FBgn0034335	Glutathione S transferase E1	-3.6	9.5E-05
<b>Ac76E</b>	FBgn0004852	Adenylyl cyclase 76E	-5.4	1.9E-04
<b>Tektin-C</b>	FBgn0035638	Tektin C	-6.8	4.3E-05
<b>Syt4</b>	FBgn0028400	Synaptotagmin 4	-7.0	4.0E-06

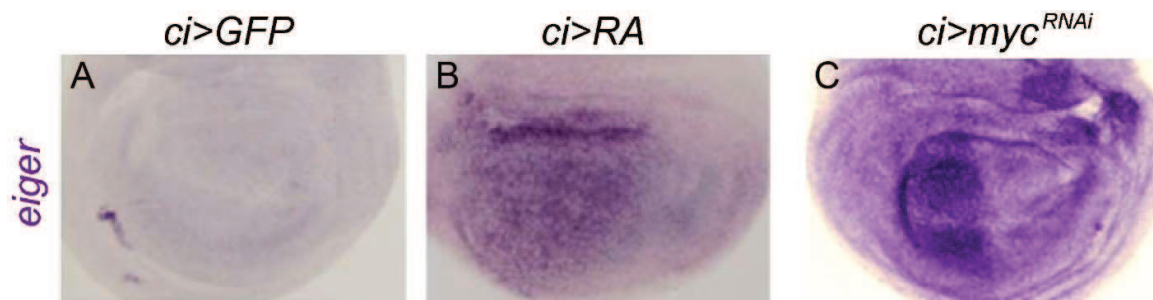
**Tabla 7.** Lista de líneas de ARNs de interferencia que inhiben la expresión de proteínas secretables utilizadas para encontrar señales involucradas en el proceso de coordinación del crecimiento.

Gene ID	Gene Name	VDRC ID
CG11527	Tiggrin	100036
CG11853	takeout	51463
CG11853	takeout	100079
CG11062	activin-beta	108663
CG10382	wrapper	105314
CG6868	tolloid	100930
CG8807	lush	102307
CG10342	neuropeptide F	108772
CG18105	Ecdysis triggering hormone	18825
CG2040	hikaru genki	109863
CG7503	Connectin	101187
CG12410	crossveinless	106311
CG33950	terribly reduced optic lobes	24549
CG14049	dilp6	102465
CG10521	Netrin-B	100840
CG6134	spatzle	105017
CG13780	PDGF- and VEGF-related factor 2	102072
CG5619	trunk	51240
CG17579	scabrous	104703
CG8285	Boss	4366
CG1502	twisted gastrulation	108750
CG14430	boudin	107102
CG32282	dro4	103505
CG6127	Serrate	108348
CG43758	slit	108853
CG4698	Wnt oncogene analog 4	104671
CG4637	hedgehog	109454
CG12919	eiger	108814
CG32279	dro2	109207
CG8167	dilp2	102158
CG31695	screw	105303
CG8458	Wnt8	107727
CG6863	tolkin	2656
CG34378	PDGF- and VEGF-related factor 3	105008
CG1916	Wnt oncogene analog 2	104338
CG18657	Netrin-A	108577
CG10580	fringe	51977
CG13687	Prothoracicotropic hormone	102043
CG13194	pyramus	36523
CG1862	Ephrin	105139
CG30040	jelly belly	103047
CG10334	spitz	3922
CG3619	Delta	109491
CG4531	argos	47181
CG9224	short gastrulation	37407
CG15009	Ecdysone-inducible gene L2	106543
CG32268	dro6	109106
CG1171	Adipokinetic hormone-like	105063
CG14167	dilp3	106512
CG6496	Pigment-dispersing factor	50750
CG7103	PDGF- and VEGF-related factor 1	102699
CG4608	branchless	101377
CG3595	sqh	109493
CG9280	Glutactin	101918
CG15671	crossveinless 2	109915

CG2198	amalgam	22944
CG9559	folded gastrulation	101125
CG10810	Drosomycin	2703
CG4889	wingless	104579
CG6371	hugin	107771
CG5993	outstretched	3282
CG16987	dawdle	105309
CG5014	Vap-33-1	30404
CG17610	gurken	4332
CG4637	hedgehog	1403
CG13317	dilp7	105024
CG17716	faint sausage	102073
CG6588	Fasciclin I	101779
CG10812	dro5	109350
CG8561	convoluted	44361
CG5014	Vap33	100809
CG6736	dilp4	105516
CG10491	vein	109437
CG17610	gurken	101701
CG9224	short gastrulation	105853
CG13419	bursicon	102204
CG31062	sidestep	1283
CG32274	drsl	42370
CG4846	beaten path	4543
CG11326	Thrombospondin	100721
CG6407	Wnt oncogene analog 5	101621
CG2346	FMRFamide-related	103981
CG34395	nubbin	105044
CG32179	Keren	104299
CG14173	dilp1	5198
CG4700	semaphorin II	15810
CG32283	dro3	105013
CG6588	Fasciclin I	23015
CG10236	Laminin A	18873
CG12443	thisbe	102441
CG17673	Accessory gland peptide 70A	109175
CG3135	shifted	14803



**Figura 44. Líneas reporteras de *egr*.** (A) Esquema de las líneas *egr-lacZ* y EGR-GFP con la construcción transgénica reportera. (B-C) Inmunotición de discos imaginales de ala con anticuerpo específicos para revelar la expresión de los reporteros de *egr* en condiciones normales de crecimiento. (D-E) Discos imaginales de ojo teñidos con anticuerpos específicos para observar la expresión de los reporteros durante el desarrollo.



**Figura 45. Hibridización *in-situ* de *eiger* en discos imaginales de ala.** (A-C) Tinción específica para detectar ARN mensajero de *eiger* en primordios de ala de los genotipos indicados.

Tabla 8. Datos y Estadísticas de los experimentos

Figura 18.A	Genotipo	n	Promedio	SEM	t (vs <i>ci&gt;GFP</i> )
Tamaño alas machos	<i>ci&gt;GFP</i>	14	101	1.44	
	<i>ci&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	14	81.42	1.45	<0.0001
	<i>ci&gt;RA</i>	14	65.55	0.74	<0.0001

Figura 18.B	Genotipo	n	Promedio (A)	SEM (A)	t (A)	Promedio (P)	SEM (P)	t (P)
Tamaño compartimentos alas machos	<i>ci&gt;GFP</i>	14	101.7	0.78		99.46	1.31	
	<i>ci&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	14	76.36	1.9	<0.0001	85.07	2.4	<0.0001
	<i>ci&gt;RA</i>	14	63.66	0.57	<0.0001	67.94	0.78	<0.0001

Figura 19.D	Genotipo	n	Promedio (A)	SEM (A)	t (A)	Promedio (P)	SEM (P)	t (P)
Densidad celular	<i>ci&gt;GFP</i>	14	100	2.1		100	0.99	
	<i>ci&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	14	100.5	3.6	0.45	98.73	2.56	0.32

Figura 21.A	Genes	<i>bx&gt;+/+</i> (n=3)		<i>bx&gt;RA</i> (n=3)		t (two tailed)
		Promedio	SEM	Promedio	SEM	
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>Hr51</i>	1	2.7116	335.97	109.9876	0.0062
	<i>CG11893</i>	1	0.258	163.01	75.7	0.0207
	<i>CG6908</i>	1	0.2292	14.18	4.9761	0.0102
	<i>Dilp8</i>	1	0.4205	8.09	2.9463	0.0145
	<i>CG15784</i>	1	0.2564	4.55	2.3191	0.0579
	<i>Damm</i>	1	0.3101	3.73	0.8195	0.0057
	<i>Nlaz</i>	1	0.2305	3.08	3.4898	0.3612
	<i>TotA</i>	1	0.4158	2.16	0.4949	0.0359
	<i>Cys</i>	1	0.2993	1.97	0.1166	0.0064
	<i>Spn47C</i>	1	0.116	1.79	0.2193	0.0053
	<i>mbl</i>	1	0.2991	1.77	0.1322	0.0151

Figura 21.B	Genes	<i>bx&gt;+/+</i> (n=3)		<i>bx&gt;myc<sup>RNAi</sup></i> (n=3)		t (two tailed)
		Promedio	SEM	Promedio	SEM	
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>Hr51</i>	1	1.7116	3.13	3.5352	0.3972
	<i>CG11893</i>	1	0.258	2.34	1.1544	0.1213
	<i>CG6908</i>	1	0.2292	1.25	0.481	0.462
	<i>Dilp8</i>	1	0.4205	5.46	0.8042	0.001
	<i>CG15784</i>	1	0.2564	2.2	0.5668	0.0288
	<i>Damm</i>	1	0.3101	2.3	0.2716	0.0055
	<i>Nlaz</i>	1	0.2305	1.82	0.792	0.1602
	<i>TotA</i>	1	0.4158	1.73	0.854	0.2539
	<i>Cys</i>	1	0.2993	2.14	1.5457	0.2781
	<i>Spn47C</i>	1	0.116	1.38	0.0591	0.0072
	<i>mbl</i>	1	0.2991	1.62	0.2041	0.0413

Figura 21.E	Genes	<i>bx&gt;+/+</i> (n=3)		<i>bx&gt;RA</i> (n=3)		t ( <i>bx&gt;+/+</i> vs <i>bx&gt;RA</i> )	<i>bx&gt;RA, p53<sup>DN</sup></i> (n=3)		t ( <i>bx&gt;RA</i> vs <i>bx&gt;RA, p53DN</i> )
		Promedio	SEM	Promedio	SEM		Promedio	SEM	
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>rpr</i>	1	0.23	2.8	1.8	0.0805	0.91	0.3	0.0736
	<i>corp</i>	1	0.28	6.29	3.7	0.0345	3.93	1.6	0.184
	<i>xrp1</i>	1	0.63	8.23	6.61	0.0662	1.88	1.039	0.0878
	<i>damm</i>	1	0.18	15.93	9.15	0.0238	1.61	1.25	0.0274

**Figura 22.C**

	Genes	<i>Sal&gt;+</i> (n=3)		<i>Sal&gt;p53<sup>wt</sup></i> (n=3)		t (two tailed)
		Promedio	SEM	Promedio	SEM	
Niveles de ARNm medidos por PCR cuantitativa	<i>dilp8</i>	1.12	0.3409	30.11	10.21	0.008
	<i>nlp1</i>	1.023	0.1616	11.56	2.041	0.0009
	<i>upd2</i>	1.031	0.1827	6.738	1.757	0.005
	<i>egr</i>	1.041	0.2179	4.381	0.7415	0.0017
	<i>swim</i>	1.003	0.05618	4.041	0.974	0.0057
	<i>daw</i>	1.053	0.2491	3.814	1.495	0.0343
	<i>cg6908</i>	1.131	0.3655	3.556	1.111	0.0229
	<i>TotA</i>	1.025	0.1497	2.552	0.9888	0.0573
	<i>upd3</i>	1.018	0.1355	1.921	0.453	0.0297
	<i>e75A</i>	1.01	0.1024	1.008	0.2011	0.9885
	<i>mbl</i>	1.006	0.07282	0.8194	0.09159	0.0507
	<i>spn47</i>	1.004	0.06787	0.8428	0.08029	0.0566
	<i>cg11854</i>	1.433	0.6816	0.04221	0.009496	0.0241

**Figura 23.B**

	Genotipos	n	Promedio (A)	SEM (A)	t (A)	Promedio (P)	SEM (P)	t (P)
Tamaño compartimentos alas machos	<i>en&gt;GFP</i>	10	100	0.88		100	1.13	
	<i>en&gt;RA</i>	10	72	1.58	<0,0001	69	2.52	<0,0001
	<i>en&gt;RA,egr<sup>IR</sup></i>	10	88	2.72	<0,001(*)	64	1.42	<0,0001(*)
	<i>en&gt;RA,egr<sup>RNAi</sup></i>	10	93	1.72	0,02(*)	69	1.26	<0,0001(*)

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

**Figura 23.C**

	Genotipos	n	Promedio (A)	SEM (A)	t (A)	Promedio (P)	SEM (P)	t (P)
Tamaño compartimentos alas machos	<i>hh&gt;+</i>	10	100	1.3		100	1.4	
	<i>hh&gt;RA</i>	10	88.4	1.3	<0,0001	90	1.1	<0,0001
	<i>hh&gt;RA,egr<sup>3/3</sup></i>	10	96.5	0.9	0.02	89.5	0.9	0.2806

**Figura 25.C**

	Genotipo	Niveles de ARNm de <i>eiger</i>			
		n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>en&gt;GFP</i>	3	1	0.24	
	<i>en&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	2.2	0.21	<0.01
	<i>en&gt;RA</i>	3	5.3	0.73	<0.01

**Figura 26.D**

	Genotipo	Niveles de ARNm de <i>eiger</i>			
		n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>sal&gt;+</i>	3	1	0.22	
	<i>sal&gt;p53</i>	3	4.38	0.74	0.012

**Figura 26.E**

	Genotipo	Niveles de ARNm de <i>eiger</i>			
		n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>en&gt;GFP</i>	3	1	0,18	-
	<i>en&gt;RA</i>	3	5.3	3,8	0.2
	<i>en&gt;RA, p53<sup>H159N</sup></i>	3	2.5	1,2	0,15 (*)

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

**Figura 26.F**

Análisis de Chip-qPCR de individuos <i>sal-Gal4/+; tub-Gal80ts / UAS.Dmp53</i>	Region	n	lgG	SEM	p53	SEM	p-Value
	<i>rpr-promoter</i>	3	0.39	0.071	4.84	0.421	0.0005
	<i>egr-promoter</i>	3	0.34	0.046	4.31	0.527	0.0017
	<i>egr-intron</i>	3	0.01	0.001	0.05	0.002	<0,0001
	<i>egr-3'UTR</i>	3	0.02	0.004	0.08	0.009	0.003

Enriquecimiento expresado como % de input

**Figura 27.E**

	Genotipo	Niveles de ARNm de <i>mmp1</i>			
		n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>en&gt;GFP</i>	3	1.017	0.13	
	<i>en&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	2.39	0.2	0.0025
	<i>en&gt;RA</i>	3	8.46	2.86	0.03

**Figura 27.G**

	Genotipo	Niveles de ARNm de <i>puc</i>			
		n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>en&gt;GFP</i>	3	1.047	0.2	
	<i>en&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	2.72	0.73	0.046
	<i>en&gt;RA</i>	3	2.09	0.45	0.051

**Figura 28.A-C**

	Genotipos	N	Promedio (A)			Promedio (P)		
			SEM (A)	t (A)	SEM (P)	t (P)		
Tamaño compartimentos alas machos	<i>en&gt;GFP</i>	10	100	0,88	-	100	1,13	-
	<i>en&gt;RA</i>	10	71	0,79	<0,0001	69	0,94	0.0012
	<i>en&gt;RA, tak1<sup>RNAi</sup></i>	10	98	1,17	0,51 (*)	66	0,85	<0,0001 (*)
	<i>en&gt;RA, bsk<sup>DN</sup></i>	10	100	0,38	0,87 (*)	71	1,01	<0,0001 (*)
	<i>en&gt;RA, fos<sup>DN</sup></i>	10	99	1,04	0,72 (*)	80	1,32	<0,0001 (*)

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

**Figura 28.E**

	Genotipo	N	Promedio (A)			Promedio (P)		
			SEM (A)	t (A)	SEM (P)	t (P)		
Densidad celular (%)	<i>en&gt;GFP</i>	10	100	0.73	-	100	±0,85	-
	<i>en&gt;bsk<sup>DN</sup></i>	10	100	1.09	ns	100	2.8	ns
	<i>en&gt;RA</i>	10	100.2	1.09	ns	100.3	±1,32	ns
	<i>en&gt;RA, bsk<sup>DN</sup></i>	10	108.1	1.27	0,002 (*)	101.7	±2,37	ns (*)

(\*) Test t comparado con individuos *en>bsk<sup>DN</sup>*

**Figura 29.A**

	Genotipo	n	Niveles de ARNm de <i>mmp1</i>			Niveles de ARNm de <i>puc</i>		
			Promedio	SEM	t (two tailed)	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>sal&gt;+</i>	3	1	0.06		1	0.13	
	<i>sal&gt;p53</i>	3	2.2	0.23	0.0009	1.51	0.14	0.0099

**Figura 29.B**

	Genotipo	n	Niveles de ARNm de <i>mmp1</i>		
			Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>en&gt;GFP</i>	3	1	0.13	
	<i>en&gt;RA</i>	3	8.46	2.85	0.032
	<i>en&gt;RA, p53<sup>H159N</sup></i>	3	1.34	0.18	0.034

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

**Figura 29.C**

	Genotipo	n	Niveles de ARNm de <i>puc</i>		
			Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala	<i>en&gt;GFP</i>	3	1	0.2	
	<i>en&gt;RA</i>	3	2.09	0.45	0.051
	<i>en&gt;RA, p53<sup>H159N</sup></i>	3	0.9	0.21	0.037

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

**Figura 30.G**

	Genotipo	n		72hs	83hs	90hs	107hs	114hs	131hs
				Porcentaje de pupas normalizados	<i>bx&gt;+</i>	209	Promedio	0	5
SD	0	7	15				1	1	0
<i>bx&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	203	Promedio	0		1	32	94	99	100
		SD	0		1	16	2	1	0
<i>bx&gt;RA</i>	215	Promedio	0		1	30	94	100	100
		SD	0		1	3	5	0	0

**Figura 30.H**

	Genotipo	n		96hs	108hs	112hs	131hs	142hs	155.5hs	165hs	180hs
				Porcentaje de pupas normalizados	<i>bx&gt;+</i>	207	Promedio	0	15	26	88
SD	0	3	6				5	2	0	0	0
<i>bx&gt;RA</i>	199	Promedio	0		0	0	27	62	87	92	100
		SD	0		1	1	9	6	3	2	0
<i>bx&gt;RA, p53<sup>H159N</sup></i>	207	Promedio	0		6	20	85	98	100	100	100
		SD	0		3	3	4	2	0	0	0

Figura 30.J		Discos de Ala				Discos de Ojo/antena			
Tamaño de primordios normalizados	Genotipo	Promedio	SD	n	t	Promedio	SD	n	t
	<i>nub&gt;/+</i>	100	11.94	8		100	10.88	7	
	<i>nub&gt;RA</i>	69.93	16.22	16	0.0001	71.25	18.71	16	0.0011

Figura 30.K		Genotipo	n	Promedio	SEM	t
Tamaño alas machos	<i>ey&gt;/+</i>		24	100	0.5	
	<i>ey&gt;RA</i>		22	89.63	1.44	<0.0001

Figura 31.A		Niveles de ARNm de <i>dilp8</i>			
Niveles de ARNm en discos de ala	Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
	<i>bx&gt;/+</i>	3	1	0.42	
	<i>bx&gt;RA</i>	3	8.09	2.95	0.015
	<i>bx&gt;mycRNAi</i>	3	5.59	0.8	0.012

Figura 31.B		Niveles de ARNm de <i>dilp8</i>			
Niveles de ARNm en discos de ala	Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
	<i>sal&gt;/+</i>	3	1.12	0.34	
	<i>sal&gt;p53</i>	3	30.11	10.21	0.0235

Figura 32.A		Genotipo	n		140hs	144hs	153hs	157hs	160hs	162hs
Porcentaje de pupas normalizados	<i>bx&gt;/+</i>	87	Promedio		0	0	75	95	100	100
			SD		0	0	1	0	0	0
	<i>bx&gt;dilp8<sup>RNAi</sup></i>	96	Promedio		0	0	78	97	100	100
			SD		0	0	2	1	0	0
	<i>bx&gt;RA</i>	86	Promedio		0	0	32	61	94	100
			SD		0	0	2	4	0	0
	<i>bx&gt;RA, dilp8<sup>RNAi</sup></i>	81	Promedio		0	0	59	83	96	100
			SD		0	0	9	6	1	0

Figura 32.B		Genotipo	n	Promedio	SEM	t
Tamaño alas machos	<i>ey&gt;/+</i>		10	100	1.2	
	<i>ey&gt;RA</i>		10	80.2	3.9	<0.0001
	<i>ey&gt;RA, dilp8<sup>RNAi</sup></i>		10	97.9	1.6	0.0004 (*)

(\*) Test t comparado con individuos *ey>RA*

Figura 32.C		Genotipo	n	Promedio	SEM	t (vs <i>ci&gt;GFP</i> )
Densidad celular normalizado (%)	<i>ey&gt;/+</i>		10	102.3	2.97	
	<i>ey&gt;RA</i>		10	98.49	1.65	0.3388
	<i>ey&gt;RA, dilp8<sup>RNAi</sup></i>		10	103.9	1.39	0.0241 (*)

(\*) Test t comparado con individuos *ey>RA*

Figura 33.B		Genotipos	n	Promedio (P)	SEM (P)	t (P)	Promedio (A)	SEM (A)	t (A)
Tamaño compartimentos alas machos	<i>en&gt;GFP</i>		18	100	1.6		100	1.6	
	<i>en&gt;RA</i>		22	80.81	1.72	<0.0001	91	0.95	0.014
	<i>en&gt;RA, Dilp8<sup>RNAi</sup></i>		13	89.35	2.21	0.075(*)	100.2	1.05	0.0015(*)

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

Figura 33.C		Genotipos	n	Promedio (P)	SEM (P)	t (P)	Promedio (A)	SEM (A)	t (A)
Densidad celular normalizado (%)	<i>en&gt;GFP</i>		10	100	1.16		100	1.57	
	<i>en&gt;RA</i>		10	100	1.48	ns	95.7	1.27	0.1
	<i>en&gt;RA, Dilp8<sup>RNAi</sup></i>		10	100.8	1.22	ns (*)	98.31	1.27	0.2(*)

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

Figura 34.A		Niveles de ARNm de <i>dilp8</i>			
Niveles de ARNm en discos de ala	Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
	<i>rn&gt;+</i>	3	1	0.42	
	<i>m&gt;RA</i>	3	2.66	0.49	0.008
	<i>rn&gt;RA, bskDN</i>	3	0.98	0.53	0.01 (*)

(\*) Test t comparado con individuos *m>RA*



Figura 34.F		Genotipo	n	Posterior	SEM	p-Value
Tamaño alas machos		<i>ey&gt;/+</i>	22	100	1.2	
		<i>ey&gt;RA</i>	9	81.8	1.44	0.002
		<i>ey&gt;RA, grnd<sup>RNAi</sup></i>	8	104	1.76	<0,0001(*)

(\*) Test t comparado con individuos *ey>RA*

Figura 35.C		Niveles de ARNm de <i>xrp1</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>en&gt;+</i>	3	1	0.33	
		<i>en&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	4.56	1	0.0042
		<i>en&gt;RA</i>	3	7.41	2.88	0.0186

Figura 35.D		Niveles de ARNm de <i>xrp1</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>en&gt;+</i>	3	1	0.33	
		<i>en&gt;RA</i>	3	7.41	2.88	0.0186
		<i>en&gt;RA,p53<sup>DN</sup></i>	3	1.88	1.04	0.0353(*)

(\*) Test t comparado con individuos *en>RA*

Figura 35.E		<i>bx&gt;/+</i> (n=3)		<i>bx&gt;RA</i> (n=3)		t ( <i>bx&gt;/+</i> vs <i>bx&gt;RA</i> )	<i>bx&gt;RA, xrp1<sup>RNAi</sup></i> (n=3)		t ( <i>bx&gt;RA</i> vs <i>bx&gt;RA, xrp1RNAi</i> )	
		Genes	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM		
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>dam</i>	1.05	0.39	2.06	1.1	0.0742	0.89	0.37	0.0345
		<i>rpr</i>	1	0.08	1.38	0.01	0.6655	0.83	0.079	0.4333
		<i>dilp8</i>	1.01	0.14	1.94	1.18	0.1063	4.66	0.48	<0.0001
		<i>egr</i>	1.04	0.34	1.7	0.09	0.3057	1.98	0.42	0.8002

Figura 39.C		Niveles de ARNm de <i>pri-mir-305</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>en&gt;+</i>	3	1	0.03	
		<i>en&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	0.73	0.03	0.046

Figura 39.D		Niveles de ARNm de <i>dcr-1</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>en&gt;+</i>	3	1	0.21	
		<i>en&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	0.91	0.29	0.73

Figura 39.E		Niveles de ARNm de <i>drosha</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	t (two tailed)
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>en&gt;+</i>	3	1	0.22	
		<i>en&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	1.34	0.21	0.38

Figura 40.A		Niveles de ARNm de <i>hr51</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>bx&gt;+</i>	3	1	0.5	
		<i>bx&gt;RA</i>	3	335.97	109.9876	0.0061
		<i>bx&gt;myc<sup>RNAi</sup></i>	3	3.13	3.5352	0.3592

Figura 40.B		Niveles de ARNm de <i>hr51</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>rn&gt;+</i>	3	1	0.27	
		<i>rn&gt;RA</i>	3	9.79	1.85	0.0012
		<i>rn&gt;RA,p53<sup>DN</sup></i>	3	0.34	0.19	0.0009(*)

(\*) Test t comparado con individuos *rn>RA*

Figura 40.C		Niveles de ARNm de <i>hr51</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>en&gt;+</i>	3	1.3	0.57	
		<i>en&gt;RA</i>	3	177.7	84.9	0.01066
		<i>en&gt;RA,p53<sup>DN</sup></i>	3	19.06	8.6	0.1367(*)

(\*) Test t comparado con individuos *rn>RA*

Figura 40.D		Niveles de ARNm de <i>hr51</i>				
		Genotipo	n	Promedio	SEM	p-Value
Niveles de ARNm en discos de ala		<i>rn&gt;+</i>	3	1	0.16	
		<i>rn&gt;RA</i>	3	17.6	1.69	0.0006
		<i>rn&gt;RA,hep<sup>RNAi</sup></i>	3	0.87	0.02	0.0006(*)

(\*) Test t comparado con individuos *rn>RA*

	Condición	n	Promedio	SEM	t
Tamaño alas individuos +/- machos	<b>1X</b>	30	100	0.7	
	<b>0.66</b>	30	90.36	1.7	<0.0001
	<b>0.33</b>	30	81.46	1.1	<0.0001
	<b>0.16</b>	30	82.94	1.64	<0.0001

	Condición	n	Anterior			Posterior		
			Promedio	SEM	t	Promedio	SEM	t
Proporciones de los compartimentos de alas individuos	<b>1X</b>	30	0.54	0.002		0.46	0.002	
	<b>0.66</b>	30	0.53	0.0015	ns	0.465	0.0015	ns
	<b>0.33</b>	30	0.54	0.0016	ns	0.459	0.0016	ns
	<b>0.16</b>	30	0.54	0.0018	ns	0.459	0.0018	ns

	Condición	n	Promedio	SEM	t
Tamaño compartimento anterior de alas individuos +/-	<b>1X</b>	30	100	0.74	
	<b>0.66</b>	30	89.51	1.63	<0.0001
	<b>0.33</b>	30	81.63	1.14	<0.0001
	<b>0.16</b>	30	82.99	1.65	<0.0001

	Condición	n	Promedio	SEM	t
Tamaño compartimento posterior de alas individuos +/-	<b>1X</b>	30	100	0.97	
	<b>0.66</b>	30	91.36	1.94	0.0009
	<b>0.33</b>	30	81.24	1.12	<0.0001
	<b>0.16</b>	30	82.88	1.69	<0.0001

	Condición	n	WF (Comida normal)			LPD (Comida baja en proteínas)			t test entre comidas
			Promedio	SEM	t	Promedio	SEM	t	
Tamaño de ala relativizado (%)	<b><i>W<sup>1118</sup></i></b>	30	100	1.25		92.88	1.46		0.0009
	<b><i>p53<sup>NS</sup></i></b>	30	102.7	1.4	0.1607	93.64	1.46	0.715	0.0001

	Condición	n	Anterior			Posterior		
			Promedio	SEM	t	Promedio	SEM	t
Proporciones de los compartimentos de alas	<b><i>W<sup>1118</sup></i> (WF)</b>	30	0.508	0.006		0.492	0.006	
	<b><i>W<sup>1118</sup></i> (LPD)</b>	30	0.516	0.006	0.0004 (*)	0.484	0.006	0.0004 (*)
	<b><i>p53<sup>NS</sup></i> (WF)</b>	30	0.524	0.004	<0.0001	0.476	0.004	<0.0001
	<b><i>p53<sup>NS</sup></i> (LPD)</b>	30	0.526	0.005	0.4235 (*)	0.474	0.005	0.4235 (*)

(\*) Test t respecto a su genotipo en WF

	Condición	n	WF (Comida normal)			LPD (Comida baja en proteínas)			t test entre comidas
			Promedio	SEM	t	Promedio	SEM	t	
Tamaño de ala relativizado (%)	<b><i>W<sup>1118</sup></i></b>	30	100.00	3.56		93.84	6.00		0.0001
	<b><i>egr<sup>3/3</sup></i></b>	30	110.40	4.88	0.0001	95.66	5.94	0.2425	0.0001

	Condición	n	Anterior			Posterior		
			Promedio	SEM	t	Promedio	SEM	t
Proporciones de los compartimentos de alas	<b><i>W<sup>1118</sup></i> (WF)</b>	30	0.517	0.001		0.482	0.001	
	<b><i>W<sup>1118</sup></i> (LPD)</b>	30	0.509	0.002	0.0012 (*)	0.490	0.002	0.0012 (*)
	<b><i>egr<sup>3/3</sup></i> (WF)</b>	30	0.524	0.001	<0.0001	0.476	0.001	<0.0001
	<b><i>egr<sup>3/3</sup></i> (LPD)</b>	30	0.521	0.001	0.0538 (*)	0.478	0.001	0.0538

(\*) Test t respecto a su genotipo en WF

	Condición	n	Promedio	SEM	t
Tamaño de ala relativizado (%)	<b><i>rn&gt;/+</i></b>	15	101.00	1.05	
	<b><i>rn&gt;p53<sup>RNAi</sup></i></b>	15	102.10	0.34	0.2891
	<b><i>rn&gt;gmd<sup>RNAi</sup></i></b>	15	99.77	0.78	0.3569
	<b><i>m&gt;CAT</i></b>	15	101.60	0.58	0.62

	Condición	n	Promedio	SEM	t
Asimetría entre alas expresadas como FAi (%)	<b><i>rn&gt;/+</i></b>	3	1.779075689	0.30	
	<b><i>rn&gt;p53<sup>RNAi</sup></i></b>	3	0.593014191	0.16	0.0038
	<b><i>rn&gt;gmd<sup>RNAi</sup></i></b>	3	1.263389733	0.21	0.0713
	<b><i>m&gt;CAT</i></b>	3	0.75491158	0.09	0.0048

**Figura 43.C**

	Condición	n	Anterior			Posterior		
			Promedio	SEM	t	Promedio	SEM	t
Proporciones de los compartimentos de alas	<i>m&gt;/t</i>	15	0.516	0.004		0.484	0.004	
	<i>m&gt;p53<sup>RNAi</sup></i>	15	0.525	0.004	<0.0001	0.475	0.004	<0.0001
	<i>m&gt;gmd<sup>RNAi</sup></i>	15	0.516	0.005	0.8235	0.484	0.005	0.9837
	<i>rn&gt;CAT</i>	15	0.529	0.006	<0.0001	0.471	0.006	<0.0001

**Figura 43.D**

	Condición	n	Anterior			Posterior		
			Promedio	SEM	t	Promedio	SEM	t
Asimetría compartimentos alas expresadas como FAi (%)	<i>m&gt;/t</i>	3	0.75	0.21		0.87	0.19	
	<i>m&gt;p53<sup>RNAi</sup></i>	3	1.55	0.22	0.01	1.92	0.23	0.004
	<i>m&gt;gmd<sup>RNAi</sup></i>	3	1.44	0.20	0.01	1.64	0.21	0.009
	<i>rn&gt;CAT</i>	3	1.38	0.19	0.02	1.79	0.18	0.004

**Figura 43.E**

	Condición	n	Promedio	SEM	t
			<i>m&gt;/t</i>	15	100
Densidad celular (%)	<i>m&gt;p53<sup>RNAi</sup></i>	15	109	1.14	<0.0001
	<i>m&gt;gmd<sup>RNAi</sup></i>	15	96.68	1.15	0.0803
	<i>rn&gt;CAT</i>	15	98.94	1.28	0.5833

**Figura 43.F**

	Condición	n	Promedio	SEM	t
			<i>m&gt;/t</i>	3	2.30
Densidad celular (%)	<i>m&gt;p53<sup>RNAi</sup></i>	3	3.91	0.34	0.0035
	<i>m&gt;gmd<sup>RNAi</sup></i>	3	4.22	0.45	0.0035
	<i>rn&gt;CAT</i>	3	4.80	0.15	0.0002