

**Universidad Autónoma de Madrid Departamento
de Bioquímica – Facultad de Medicina Programa
de Doctorado en Biociencias Moleculares**



**La interferencia de expresión
cardio-específica del gen
mitocondrial *NDUFS2* en
Drosophila melanogaster causa
cardiomiopatía dilatada y
lipodistrofia inducida por *ImpL2***

José María Becedas Baeza

Madrid, 2021

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

La interferencia de expresión cardio-específica del gen mitocondrial *NDUFS2* en *Drosophila melanogaster* causa cardiomiopatía dilatada y lipodistrofia inducida por *ImpL2*

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor
dentro del Programa Oficial de
Posgrado en Biociencias Moleculares, presentada por el Graduado en Biología
con mención en biología sanitaria:

José María Becedas Baeza

Director de tesis

Dr. Juan José Arredondo Lamas
Profesor contratado doctor en Bioquímica

“En resumen, toda obra grande es el fruto de la paciencia y de la perseverancia, combinadas con una atención orientada tenazmente durante meses y aun años hacia un objeto particular”

Santiago Ramon y Cajal, “Los tónicos de la voluntad”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento al Dr. Juan José Arredondo Lamas por acogerme en su proyecto de investigación y enseñarme como se piensa, se escribe y se trabaja en la ciencia. En mi estancia en este laboratorio, gracias a sus consejos y su paciencia, me han ayudado a crecer como investigador y a madurar frente a las adversidades que han surgido en este camino, tanto en la investigación como en lo personal. Mi gratitud a la Dra. Margarita Cervera Jover quien, gracias a sus consejos y experiencia en el mundo de *Drosophila*, me ayudó en los primeros pasos de esta tesis doctoral. Agradecimientos a la intervención del Dr. Rafael Garesse, por transmitirme su confianza en el sistema y el apoyo en la realización de la tesis doctoral.

Quisiera agradecer al servicio de Microscopía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, del Servicio Interdepartamental de Investigación. Especial mención a la responsable del servicio, María Dolores García Morales; Lola, sin tu inestimable ayuda, tu experiencia en el mundo de la mosca y la microscopía confocal, esta tesis sería una mera fracción minúscula de lo que es ahora. A su vez, también traslado mi agradecimiento por la ayuda brindada por el servicio de microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, concretamente a la responsable Mónica Martín Belinchón por su ayuda con la grabación de los latidos del corazón de la mosca. No quisiera olvidarme del Servicio de Genómica del Centro Mixto CSIC-UAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", quienes llevaron a cabo las RT-qPCR mostradas. Agradecer también al laboratorio de Manfred Frasch, por cedernos la línea transgénica de *Drosophila* *TINcΔ4*.

Antes de continuar, quiero dedicar a mi padre, José María Becedas, allá donde esté, esta tesis doctoral. Desde que yo era pequeño, siempre nos enseñaba a mi familia y a mí lo bueno y bonito de la naturaleza y el saber, allá donde viajáramos o incluso en casa. Desde que un cáncer de colon le puso un punto final, decidí que mi dedicación en la carrera y la investigación sería y es aportar y desentramar que hay y habrá en la biología de las enfermedades. Espero que

estuvieras orgulloso de poder decir que, junto con nuestra madre, tu mujer, hayáis conseguido que tus dos hijos sean doctores.

Y con esta declaración en la mano, agradezco eternamente lo que mi madre, María del Carmen Baeza, y mi hermano, el Dr. Mario Becedas, han hecho por mí no solo para esta tesis, sino en el pasado y en el futuro que está por llegar. A mi madre, por lo que siempre ha luchado por nuestra educación y los estudios, por lo que nos ha cuidado y querido, tanto con nuestro padre como sin él, como con la paciencia y apoyo que ha tenido conmigo por todas las horas en el laboratorio, y por estar en casa o fuera de ella enfrascado en los datos y la escritura. A mi hermano, por ser un referente: desde evitar que me perdiera de pequeño, ayudándome en el colegio, guiando mis primeros pasos en la carrera universitaria y allanando el camino en mi tesis doctoral con tu tesis en periodismo en un atril como guía. A mi padre, mi madre y mi hermano, gracias.

En el departamento de Bioquímica, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, fui muy bien recibido cuando llegué al laboratorio B-20. Enormemente agradecido a mi compañera Sara Laine, quien no solo me enseñó todo lo que hay que saber la manipulación, disección y bioquímica de la mosca; los años que hemos sido compañeros han sido muy valiosos para mí, sin ti no hubiera crecido tanto ni como investigador ni como amigo. A Roberto y Leti (y David), por enseñarme lo que el estudio del gen *NDUFS2* podía dar de sí en un laboratorio y por seguir guiándome, con vuestra amistad, aunque no fuera vuestra responsabilidad. Gracias también a Yolanda, Alba, Judith y Sonia por compartir poyata y vuestro buen hacer en las técnicas; sin vosotras, quizá seguiría perdido. A Belén Coarasa por su punto creativo y a Patricia y Gloria, gracias de veras, por el último empujón en los meses finales de la tesis que pudisteis darme.

Antes de continuar con la gente que me ha ayudado en el departamento, quiero hacer especial mención a mi compañera de fatigas y amiga Sandra Fernández. Cierto es que, desde que se acabó la carrera, hemos seguido un camino en laboratorios distintos. Pero, aun así, casi en todo momento de la semana o del mes, hemos buscado tiempo para ayudarnos en nuestras respectivas tesis de noche o de día, a no rendirnos en mitad del camino y a luchar con humor las adversidades en el camino. Por ti, y por nuestras tesis, gracias, Sandra.

Fuera del B-20 no poca ha sido la gente quien decidió parar un momento de sus tesis o proyectos para ayudarme. Alberto, amigo, gracias por orientarme y apoyarme en esos experimentos que tenía dudas. Sara Palacios (y Mati), por siempre escucharme como amiga y aportar otro punto de vista diferente, te deberé siempre el favor. A Raúl, por cederme tus muestras y tu conocimiento, gracias, compañero y amigo de fatigas en la tarde. A Irene (y Javi) y a Lourdes, amigas, por cederme vuestra paciencia y alguna cosilla de vuestro laboratorio en momentos aciagos. Al resto de amistades del departamento, Adri Povo, Sophie, Diego, Ángela, Belén Sierra, Paula, Darío, Adrián Palencia, Belén Hernández, Victoria, Diego Navarro, Marcos, Maricarmen, Pablo, Esther, Viki, Alejandro, Patri, Irene, Eva, Carmen, Alfonso y María por deteneros a preguntar por la tesis y seguir apoyando hasta el final.

La lista no acaba aquí. Amistades de la carrera, amistades de Aranjuez y Madrid también han querido apoyarme por voluntad propia. A Héctor, Carmen, Óscar Brochado, Candela y Sara Hernández por compartir la voluntad y ganas de hacer vuestra tesis hasta el final. A Manu, Belén Prieto, Lorena, Rodri e Idoia por compartir vuestro tiempo. A Ismael, Víctor, Paula M, Paula S, Macarena, Marta, Jennifer, Nono y Cris por ayudarme a desconectar. A Sara Cámara, por querer leer la tesis. A Jorge, Aida, Albert, Pablo, Alex y Julia por seguir ahí. A Carol, Sara Aponte, Ricardo, Pedro, Raúl, Óscar y Charlie por compartir vuestro ocio conmigo. A Carlos Gallego por su apoyo en el máster. A Rosa y Alicia por seguir preguntando. A Lucía por ayudarme a encontrar un trabajo cuando sobrevino el bache de la finalización de mi contrato en la universidad, así como a Tomás y Fátima por acogerme bajo su cargo en el trabajo fuera de la universidad. Gracias a todas y todos.

Por último, quiero mencionar todas aquellas personas que a lo largo de la historia han contribuido a poner su piedra en la pirámide en la biología como Charles Darwin, Mary Anning, Lynn Margulis o Santiago Ramón y Cajal entre millares más, sin las cuales no se llegaría hasta donde está ahora. Por plantar el terreno para que las nuevas generaciones podamos contribuir a la causa, gracias.

RESUMEN

Las enfermedades cardíacas son una de las principales causas de mortalidad en el mundo occidental. Entre las enfermedades cardíacas congénitas destacan aquellas causadas por la pérdida de función mitocondrial, para las que no existe un tratamiento específico y el pronóstico es reservado. En general, esta pérdida de función mitocondrial se debe a defectos en alguna de las proteínas que intervienen en procesos relacionados con la fosforilación oxidativa, como aquellas que componen los complejos de la cadena de transporte de electrones.

NDUFS2 es una proteína estructural del complejo I cuya pérdida de función causa cardiopatía hipertrófica y síndrome de Leigh entre otros síntomas graves. Para un mejor entendimiento de sus bases fisiopatológicas se desarrolló un modelo en *Drosophila melanogaster* en el cual, empleando el sistema de transgenes UAS-GAL4, se interfiere de forma cardio-específica la expresión del gen *NDUFS2*. La interferencia de *NDUFS2* en el corazón da lugar a cardiomiopatía dilatada y lipodistrofia en el tejido adiposo abdominal. Esta reducción del tejido graso abdominal es una respuesta inducida por el aumento de secreción desde el corazón de ImpL2, el cual bloquea los péptidos “*insulin-like*”, activa Foxo y moviliza lípidos y glúcidos como mecanismo compensatorio.

En este modelo de enfermedad mitocondrial, se describe el rol de ImpL2 como efector principal entre el fenotipo cardíaco y el fenotipo del tejido graso. En mamífero, el gen ortólogo de *ImpL2*, IGBP7, se secreta a la sangre en condiciones de fallo cardíaco, hígado graso o diabetes. Esta similitud entre mamífero y *Drosophila* permite recalcar la importancia del estudio de las enfermedades mitocondriales mediante su modelización animal, así como pone de manifiesto la relevancia de los mecanismos de comunicación entre órganos en los procesos patológicos.

ABSTRACT

Cardiac diseases are the foremost cause of death due to health problems in the western society. Amongst the causes of congenital cardiac disease, those caused by mitochondrial inborn errors stand out, known for their difficult treatment and prognosis. In most cases, the loss of mitochondrial function is due to defects in proteins involved in the oxidative phosphorylation process, such as the proteins of the complexes of the electron transport chain.

NDUFS2 is a structural subunit of the complex I core whose loss of function is associated with hypertrophic cardiomyopathy or Leigh syndrome among other severe symptoms. To study the basis of the pathophysiology of these diseases, a *Drosophila melanogaster* model was developed in which nuclear encoded respiratory chain gene *NDUFS2* has been specifically interfered in cardiac muscle using the UAS-GAL4 transgene system. *NDUFS2* heart specific interference causes dilated cardiomyopathy and lipodystrophy in the abdominal adipose tissue. This adipose tissue degeneration is a response from the heart overexpression of ImpL2, which sequesters insulin-like peptides triggering Foxo to upregulate triglycerides and trehalose mobilization, so lifespan decay is reduced.

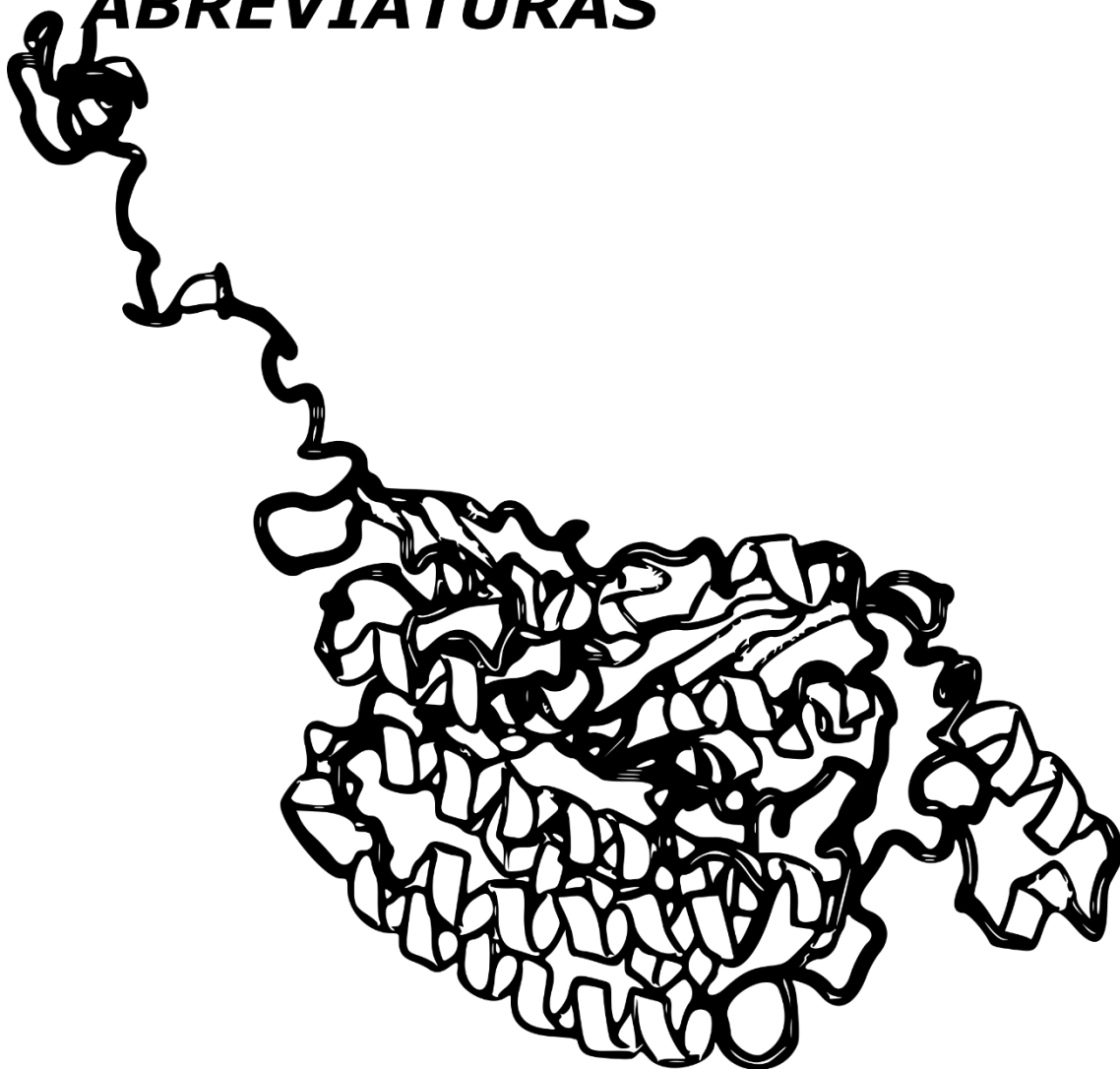
In this model of mitochondrial disease, the role of ImpL2 as a signalling effector between cardiac phenotype and adipose tissue phenotype is described. In mammal, the protein of the ortholog gene of *ImpL2*, IGFBP7, is secreted into blood in cardiac failure, fatty liver, or diabetes. This similarity between mammal and *Drosophila* highlights the importance of studying mitochondrial diseases using animal models and the relevance of communication pathways between organs in a pathological context.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	14
INTRODUCCIÓN	20
1 LA IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES	21
1.1. <i>Genes nucleares en las enfermedades mitocondriales</i>	23
1.2. <i>El Complejo I y el gen NDUFS2 en enfermedades mitocondriales</i>	25
2. LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES CAUSAN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	28
2.1 <i>Las cardiomiopatías y su relación con el metabolismo mitocondrial</i>	29
2.2 <i>El papel del corazón en la comunicación con otros órganos en enfermedades mitocondriales multisistémicas</i>	31
3. MODELIZACIÓN DE LAS ENFERMEDADES MITOCONDRIALES CARDIOVASCULARES	33
3.1 <i>Modelización de enfermedades cardiovasculares en Drosophila melanogaster</i>	34
3.2 <i>ND-49 (NDUFS2) y su asociación a enfermedades en Drosophila melanogaster</i>	36
OBJETIVOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	40
1. MATERIALES	41
1.1 <i>Reactivos, soluciones y tampones</i>	41
1.2 <i>Condiciones estándar para el crecimiento de Drosophila melanogaster</i>	41
1.3 <i>Líneas de Drosophila melanogaster</i>	41
1.4 <i>Oligonucleótidos</i>	42
1.5 <i>Δiones</i>	43
2. MÉTODOS	44
2.1 <i>Sistema UAS-GAL4</i>	44
2.2 <i>Curvas de supervivencia</i>	45
2.3 <i>Análisis de la función y anatomía del corazón y los cuerpos grasos en Drosophila melanogaster</i>	45
2.3.1 <i>Disección del corazón de adultos Drosophila melanogaster</i>	45
2.3.2 <i>Tinción histoquímica del corazón y/o los cuerpos grasos de Drosophila melanogaster</i>	45
2.3.3 <i>Fotografía y análisis de imagen</i>	46
2.3.4 <i>Medición de frecuencia cardíaca de corazones de Drosophila adultas</i>	48
2.4 <i>Bioquímica del corazón y los cuerpos grasos en Drosophila melanogaster</i>	48
2.4.1 <i>Extracción de ADN y PCR genómica de Drosophila melanogaster</i>	48
2.4.2 <i>Extracción de ARN y RT-qPCR de abdomen de Drosophila</i>	49
2.4.3 <i>Medición de triglicéridos y glucosa en Drosophila melanogaster enteras</i>	49
2.4.4 <i>Extracción de hemolinfa y medición de glúcidos y triglicéridos circulantes de Drosophila melanogaster</i>	50
2.4.5 <i>Extracción de proteína mitocondrial y medición de actividad de complejos de cadena de transporte de electrones de Drosophila melanogaster</i>	50
2.4.5.1 <i>Complejo I</i>	51
2.4.5.2 <i>Complejo IV</i>	51
2.4.5.3 <i>Citrato sintasa</i>	52
2.5 <i>Análisis estadístico</i>	52
RESULTADOS	54
1. INTERFERENCIA CARDIO-ESPECÍFICA DE NDUFS2 EN DROSOPHILA MELANOGASTER	55
1.1 <i>Medición de ROS en el corazón de Drosophila melanogaster interferido para NDUFS2</i>	56
1.2 <i>Estructura cardiomiocitos Drosophila melanogaster</i>	58
1.3 <i>Medición dimensiones corazón Drosophila melanogaster</i>	60

1.4	<i>Cambios en fisiología cardíaca Drosophila melanogaster</i>	64
1.5	<i>Análisis supervivencia en Drosophila melanogaster</i>	66
2.	RESPUESTAS ADAPTATIVAS DEL TEJIDO GRASO ABDOMINAL AL DAÑO CARDÍACO EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	68
2.1	<i>Análisis morfológico de los cuerpos grasos abdominales Drosophila melanogaster</i>	68
2.2	<i>Medición área adipocitos Drosophila melanogaster</i>	70
2.3	<i>Valoración de los niveles glúcidos y lípidos en Drosophila melanogaster</i>	73
2.4	<i>Cribado genes responsables de la lipodistrofia en Drosophila melanogaster</i>	75
3.	CARACTERIZACIÓN DE <i>IMPL2</i> COMO CAUSANTE DE LA LIPODISTROFIA CONSECUENCIA DE LA INTERFERENCIA CARDIO-ESPECÍFICA DE <i>NDUFS2</i> EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	78
3.1	<i>Análisis morfológico de los cuerpos grasos en Drosophila melanogaster en un contexto de expresión de Impl2 alterada</i>	79
3.2	<i>Medición área adipocitos Drosophila melanogaster en un contexto modificado para Impl2</i>	82
3.3	<i>Análisis supervivencia en Drosophila melanogaster en un contexto modificado para Impl2</i>	85
3.4	<i>Estructura de los cardiomiocitos de Drosophila melanogaster en un contexto modificado para Impl2</i>	88
3.5	<i>Medición de las dimensiones del corazón de Drosophila melanogaster en un contexto modificado para Impl2</i>	90
3.6	<i>Análisis de la expresión de genes causantes de lipodistrofia por cardiopatía regulados por Impl2 en Drosophila melanogaster</i>	92
3.7	<i>Evaluación histoquímica de la actividad de Foxo en los cuerpos grasos</i>	94
4.	RESPUESTAS COMPENSATORIAS SIMILARES EN UN MODELO PARALELO DE INTERFERENCIA DE <i>NDUFS2</i> EN MÚSCULO NO CARDÍACO	97
4.1	<i>Análisis morfológico de cuerpos grasos en Drosophila melanogaster en un contexto NDUFS2 interferido en músculo no cardíaco</i>	98
4.2	<i>Valoración de los niveles glúcidos y lípidos en Drosophila melanogaster en la interferencia de NDUFS2 en músculo no cardíaco</i>	100
	DISCUSIÓN	103
1.	LA DEFICIENCIA DE <i>NDUFS2</i> (CG1970) EN <i>DROSOPHILA MALENOGASTER</i> CAUSA CARDIOPATÍA DILATADA	105
2.	LA CARDIOPATÍA POR INTERFERENCIA DE <i>NDUFS2</i> CAUSA LIPODISTROFIA EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	108
3.	<i>IMPL2</i> COORDINA EL METABOLISMO CORAZÓN-CUERPOS GRASOS A TRAVÉS DE LA VÍA <i>IIS-FOXO</i> EN EL ADULTO DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	110
4.	PARALELISMO DEL MODELO DE INTERFERENCIA DE <i>NDUSF2</i> <i>DROSOPHILA</i> FRENTE A HUMANO	116
	CONCLUSIONES	120
	BIBLIOGRAFÍA	122
	ANEXOS	135
1.	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN TRANSGENES	136
2.	CONTABILIZACIÓN LATIDOS EN MOSCAS TRATADAS CON CO ₂	137
3.	SUPRESIÓN <i>IMPL2</i> EN MOSCAS ENVEJECIDAS	138
4.	VÍDEOS DE LOS CAMBIOS DE FISIOLOGÍA CARDÍACA EN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	139

ABREVIATURAS



12S: ARN ribosomal mitocondrial 12S

4E-BP: proteína de unión 4E al iniciador de la traducción eucariota (EIF4EBP1)

ACCS: homólogo de la sintasa 1-aminociclopropano-1-carboxilato

ACoAOx: acil-coenzima A oxidasa

Act88F: actina de músculo de indirecto de vuelo 88F

ADN: ácido desoxirribonucleico

Akh: hormona adipocinética

AkhR: receptor de la hormona adipocinética

Akt: quinasa de proteínas serina-treonina *RAC-alfa*

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

CIBERER: Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Raras

CPEO: oftalmoplejía externa progresiva crónica

Cyt B: citocromo B

DILP: péptidos de *Drosophila* similares a insulina

DHE: dihidroetidio

DNTB: ácido 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzoico)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: ácido glicol-etilendiaminotetraacético

FIJI: "*FIJI is just Image J*"

FMN: mononucleótido de flavina

FoxO: proteína "*Forkhead box*"

GAL4: factor de transcripción respuesta a galactosa GAL4

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: proteína fluorescente verde

GLUT1: transportador de glucosa 1

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico

HGMD: “*The Human Gene Mutation Database*”

HNF-4: factor nuclear 4 de hepatocito

IGF-1: factor de crecimiento insulínico 1

IGFBP: proteína de unión al factor de crecimiento insulínico

IIS: “*Insulin/IGF-1 signalling pathway*”

IL-16: interleucina 16

IL-18: interleucina 18

IL-1 β : interleucina-1-beta

ImpL2: proteína de morfogénesis del imago Late 2

KP: fosfato potásico

LHON: neuropatía óptica hereditaria de Leber

LS: síndrome de Leigh

MELAS: encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular

MERRF: epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas

MICOS: “*Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System*”

MIDD: diabetes y sordera de herencia materna

MILS/NARP: síndrome de Leigh de herencia materna / neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa

MKRS: línea *Drosophila melanogaster* “*Tp(3;3)MRS, M(3)76A¹ kar¹ ry² Sb¹*”

MT-ATP6: ATP sintasa de membrana mitocondrial subunidad 6

- MT-ATP8:** ATP sintasa de membrana mitocondrial subunidad 8
- MT-CO1:** citocromo oxidasa mitocondrial 1
- MT-CO2:** citocromo oxidasa mitocondrial 2
- MT-CO3:** citocromo oxidasa mitocondrial 3
- MT-ND1:** oxidorreductasa de NADH ubiquinona de la cadena 1
- MT-ND2:** oxidorreductasa de NADH ubiquinona de la cadena 2
- MT-ND3:** oxidorreductasa de NADH ubiquinona de la cadena 3
- MT-ND4:** oxidorreductasa de NADH ubiquinona de la cadena 4
- MT-ND4L:** oxidorreductasa de NADH ubiquinona de la cadena 4L
- MT-ND5:** oxidorreductasa de NADH ubiquinona de la cadena 5
- MT-ND6:** oxidorreductasa de NADH ubiquinona de la cadena 6
- mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero
- NADH:** dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
- ND-49:** subunidad 49 kDA de la oxidorreductasa de NADH-ubiquinona
- NDUFS2:** proteína hierro-azufre 2 de la NADH deshidrogenasa de ubiquinona
- NDUFV2:** flavoproteína 2 de la NADH deshidrogenasa de ubiquinona
- OXPHOS:** fosforilación oxidativa
- PBS:** tampón fosfato salino
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PFK:** fosfofructoquinasa
- PGC-1 α :** coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas
- RIPA:** ensayo de radio-inmunoprecipitación
- ROS:** especies reactivas de oxígeno
- RPL10:** proteína L10 de la unidad ribosómica 60S

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

SIRT1: sirtuina-1 deacetilasa dependiente de NAD

SREBP: proteína de unión al elemento regulador de esteroides

TES: ácido 2-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil) propan-2-il]amino] etanosulfónico

TFG- β : factor de crecimiento transformante beta.

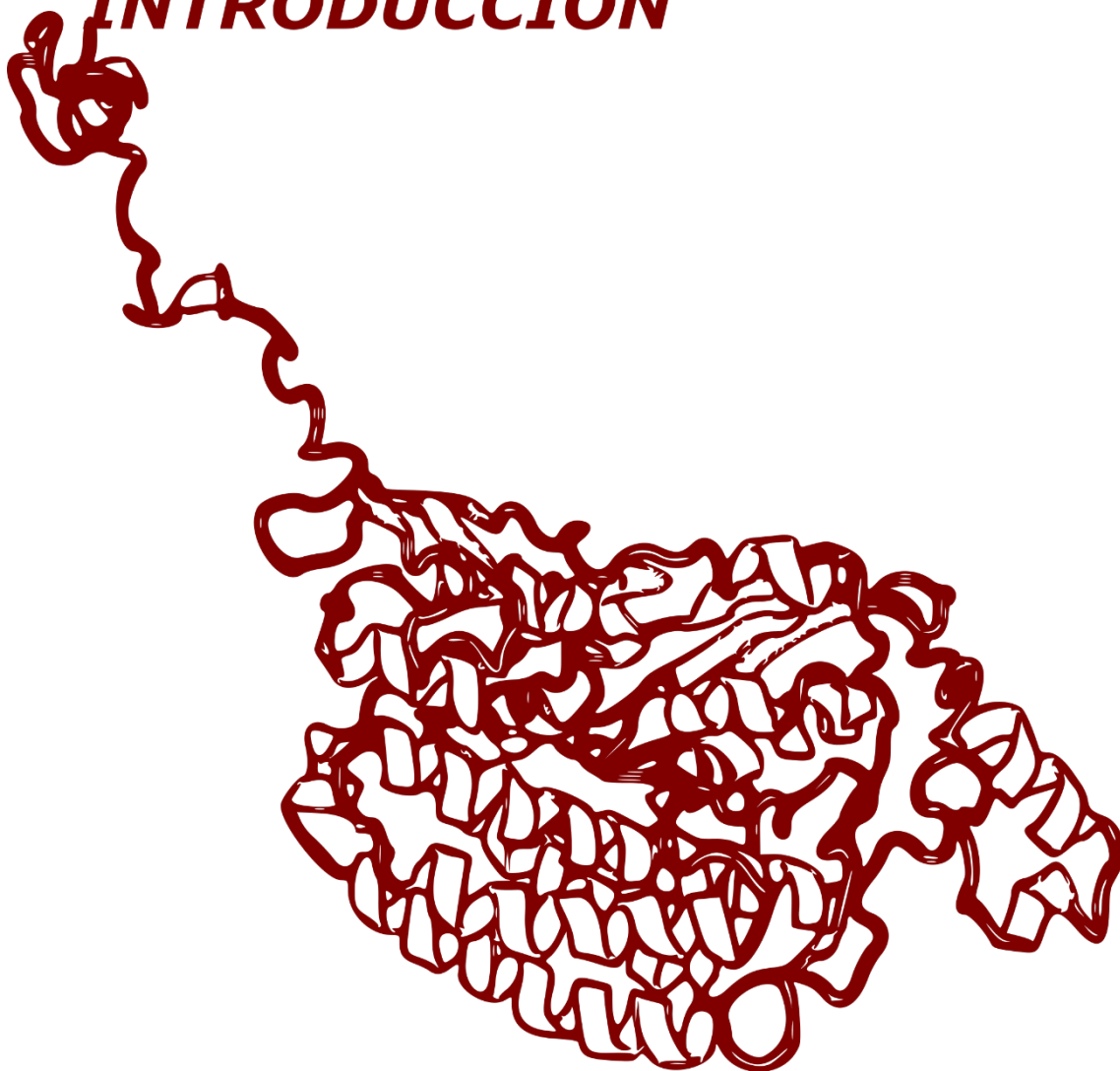
TM3: línea *Drosophila melanogaster* “*In(3LR) TM3, kni^{ri-1} pp vvl^{sep} I(3)89Aa¹ Ubx^{bx-34e} e¹”*

TM6: línea *Drosophila melanogaster* “*In(3LR) TM6, Hn^p ss^{aP88} Ubx^{bx-34e} Ubx^{P15} e¹”*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UAS: secuencia activada aguas arriba

INTRODUCCIÓN



1 La importancia de las enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales son un conjunto de enfermedades que afectan al funcionamiento de las mitocondrias, dando lugar a patologías graves que suelen afectar a tejidos de elevada demanda energética como corazón, cerebro o hígado entre otros [1].

Estas enfermedades suelen estar asociadas a una fuerte reducción en la calidad y esperanza de vida, clasificándose como enfermedades raras puesto que afectan a un pequeño porcentaje de la población [2].

En su conjunto las enfermedades mitocondriales afectan a 1,6 de cada 5000 nacidos vivos [3], lo que las convierte en uno de los defectos congénitos del metabolismo más frecuentes en humanos. Son un grupo bastante heterogéneo de enfermedades que pueden afectar a órganos de forma aislada, como la neuropatía óptica hereditaria de Leber [4] o a sistemas completos, dando lugar a neuropatías y miopatías graves con un pronóstico reservado [5].

Aunque se ha descrito que algunos virus son capaces de modular la actividad mitocondrial con un efecto deletéreo [6], la gran mayoría de defectos de función mitocondrial descritos hasta la fecha se deben a mutaciones en genes mitocondriales, localizados en la mitocondria o en el núcleo y de los que existen 37 y 1100, respectivamente [7].

Los genes de localización mitocondrial se hallan en el cromosoma mitocondrial, una molécula de ADN circular de aproximadamente 16.000 pares de bases. De los 37 genes ubicados en el cromosoma mitocondrial, únicamente 13 codifican proteínas, todas ellas implicadas en el metabolismo de fosforilación oxidativa. De los 24 genes restantes, 22 dan lugar a ARN transferentes y 2 a ARN ribosómicos [8].

Algunas de las principales enfermedades o síndromes asociadas a mutaciones en el genoma mitocondrial [9] se resumen en la Figura 1.

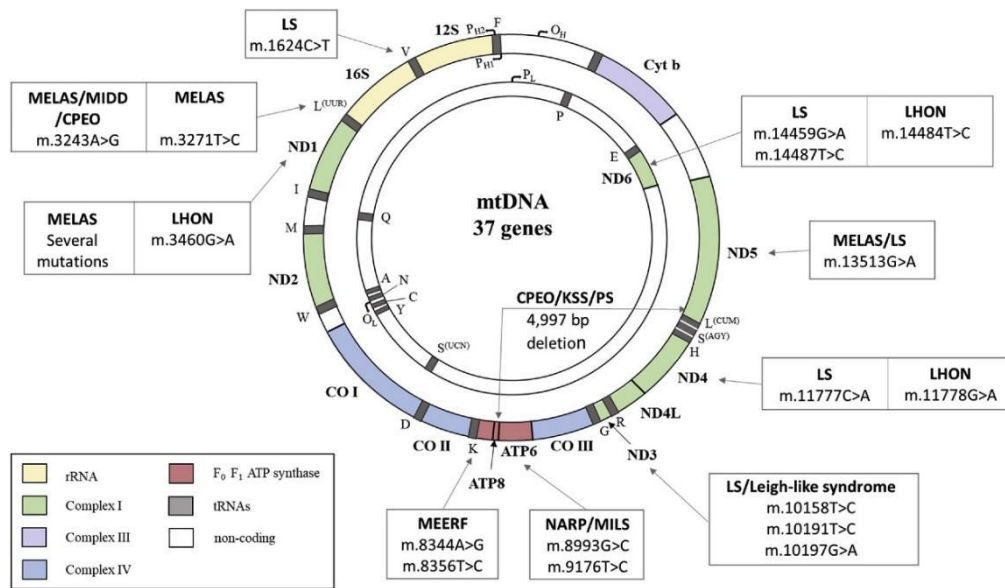


Figura 1. El genoma mitocondrial humano es minúsculo en comparación al nuclear en cuanto a tamaño y número de genes. Se muestra una esquematización del cromosoma mitocondrial en el que se muestran los orígenes de replicación de las cadenas ligera (O_L) y pesada (O_H) así como la posición de los ARN ribosómicos (en amarillo). Los genes en verde corresponden a subunidades del complejo I de la cadena de transporte de electrones, mientras que los marcados en azul pertenecen al complejo IV. En malva se indica el único gen correspondiente del complejo III. En rojo se muestra los genes que codifican subunidades de la ATP sintasa, encargada de formar ATP. Finalmente, en gris se muestran los genes que codifican los ARN transferentes. Se destacan las principales enfermedades asociadas a mutaciones del genoma mitocondrial: CPEO (*Chronic progressive external ophthalmoplegia*), LS (*Leigh syndrome*), LHON (*Leber's hereditary optic neuropathy*), MEERF (*myoclonic epilepsy with ragged red fibres*), MELAS (*Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*), MIDD (*maternally inherited diabetes and deafness*) y MILS/NARP (*Maternally inherited Leigh's syndrome to neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa*). Modificado de Dard et al. 2020 [9].

A diferencia de los autosomas, el número de cromosomas mitocondriales por núcleo diploide puede oscilar según el tejido desde unas 50 copias en espermatozoides o aproximadamente 3700 en músculo esquelético, hasta 7000 en cardiomiocitos e incluso más de 10000 en un ovocito [10,11]. Debido a este elevado número de copias del cromosoma mitocondrial, pueden darse situaciones de heteroplasmia, la coexistencia de cromosomas mitocondriales sanos y portadores de mutaciones en una misma célula (Figura 2). La tasa de heteroplasmia en las células puede ser muy variable, aunque en condiciones fisiológicas es muy baja por la acción de la autofagia mitocondrial o mitofagia [12,13]. En las patologías asociadas a mutaciones en el cromosoma mitocondrial, la heteroplasmia es el motivo por el que éstas pueden manifestarse a edades muy tempranas, en el adulto o no manifestarse [14]. Por otro lado, es relativamente frecuente que idénticas mutaciones en el cromosoma mitocondrial

den lugar a cuadros clínicos distintos [15]. Finalmente, es importante destacar que las mitocondrias de un organismo proceden originalmente del ovocito, por lo que el ADN mitocondrial, a diferencia de los cromosomas nucleares, se hereda únicamente por línea materna [16]. Sin embargo, recientemente, se han hallado secuencias de ADN mitocondrial paterno con un elevado grado de heteroplasmia en algunos individuos, lo cual contribuye aún más a la heterogeneidad de las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el cromosoma mitocondrial [17].

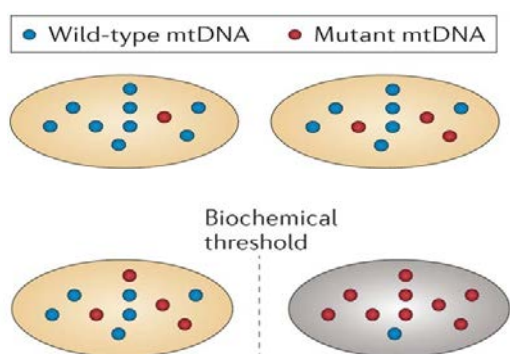


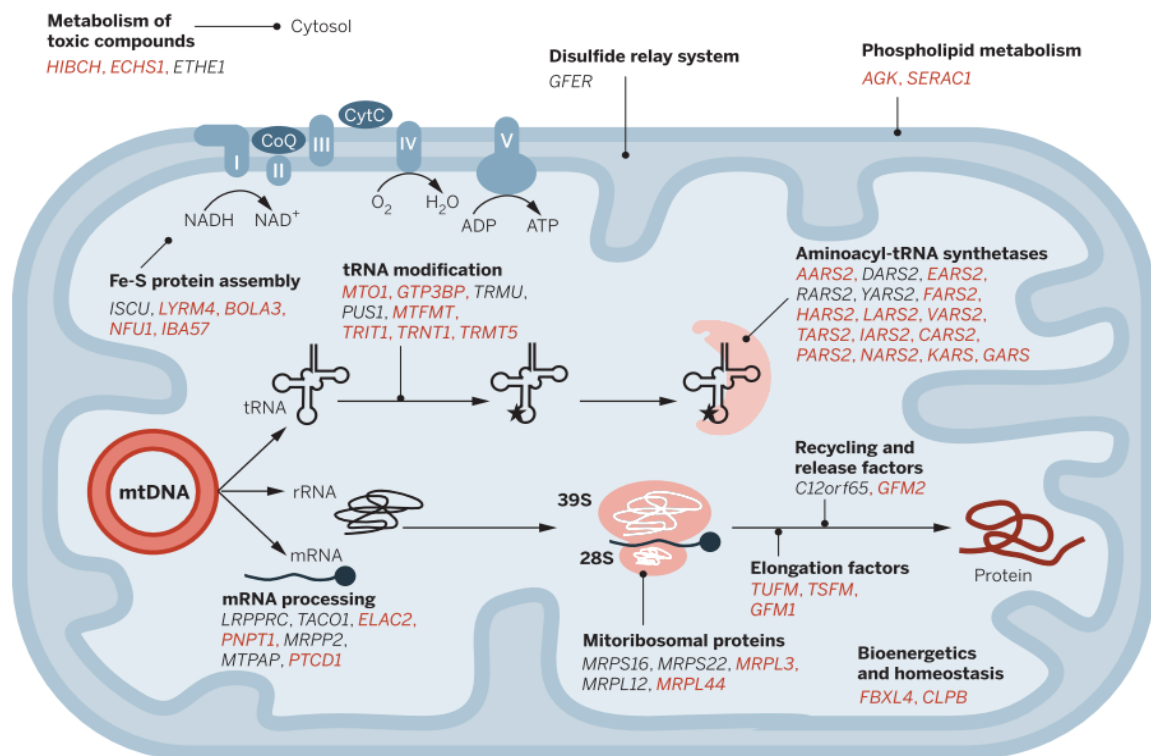
Figura 2. La heteroplasmia ralentiza o camufla las enfermedades por defectos congénitos estrictamente mitocondriales. La coexistencia de múltiples copias de cromosomas mitocondriales sanos y portadores de mutaciones hace posible que los síntomas de una patología mitocondrial puedan no manifestarse: 1 de cada 200 individuos sanos es portador de alguna de las mutaciones más patogénicas. Modificado de Stewart y Chinnery, 2015 [14].

1.1. Genes nucleares en las enfermedades mitocondriales

Las mitocondrias son orgánulos celulares de eucariotas cuyo origen explica la teoría endosimbionte [18]. A lo largo del proceso de incorporación de alfa-proteobacterias como orgánulo en proto-eucariotas [19] ocurrieron múltiples eventos de transferencia de genes de la mitocondria al núcleo, dando lugar a que la gran mayoría de genes mitocondriales se hallen en los autosomas [20,21]. Hasta la fecha no hay constancia de genes mitocondriales en el cromosoma X de mamíferos [22].

Al contrario que los genes del cromosoma mitocondrial, los genes mitocondriales nucleares, entre los que se han contabilizado más de 1100 genes distintos [7], siguen el patrón de herencia mendeliano [23]. De los aproximadamente 1100 genes nucleares descritos, se han hallado mutaciones causantes de enfermedades mitocondriales graves en cerca de 300 [24]. Los genes mitocondriales de codificación en el nuclear (Figura 3), forman parte de la cadena de transporte de electrones [25], se encargan del mantenimiento y replicación del ADN mitocondrial [26], forman y sostienen las crestas mitocondriales (formando parte del complejo MICOS (*Mitochondrial Contact Site and Cristae*

Organizing System) [27]) o están implicados en mecanismos de regulación y proteostasis [28] .



Figuras 3. Los defectos en genes mitocondriales de codificación nuclear causan múltiples anomalías en el metabolismo de fosforilación oxidativa. Esquema en el que se muestran algunos de los genes mitocondriales nucleares, muchos de los cuales son clave en los procesos de traducción mitocondrial, en los que se han identificado mutaciones implicadas en enfermedades mitocondriales humanas con deficiencias OXPHOS. En rojo aquellos genes identificados por secuenciación de nueva generación, que incluyen estudios de secuenciación masiva de todo el exoma. Modificado de Lightowlers et al. 2015 [25].

Una de las principales funciones de la mitocondria es la generación de energía en forma de ATP [29]. Este proceso tiene lugar en la membrana interna mitocondrial; los complejos de la cadena de transporte de electrones, I, II, III y IV (Figura 4) bombean protones a través de esta membrana al espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico que permite que el complejo V o ATP sintasa sintetice ATP [30]. Los complejos no están aislados, sino que se organizan en estructuras ordenadas llamadas supercomplejos que permiten un flujo de electrones eficiente y mejoran la producción de ATP [31,32]. Cada complejo de la cadena de transporte de electrones está compuesto por distintas subunidades proteicas con función estructural o implicadas en

reacciones óxido-reducción [33]; el número de subunidades es variable según el complejo. En mamífero, el complejo I, el más grande de todos, está compuesto por 44 subunidades distintas (Figura 5); 7 son de codificación mitocondrial y el resto nuclear [34]. El complejo II está compuesto por 4 subunidades, todas ellas de codificación nuclear [35] mientras que los complejos III y IV están compuestos por 10 subunidades nucleares, 1 mitocondrial y 10 subunidades nucleares y 3 mitocondriales, respectivamente [36,37]. El complejo V está compuesto por 15 subunidades, 2 de las cuales son de codificación mitocondrial [38].

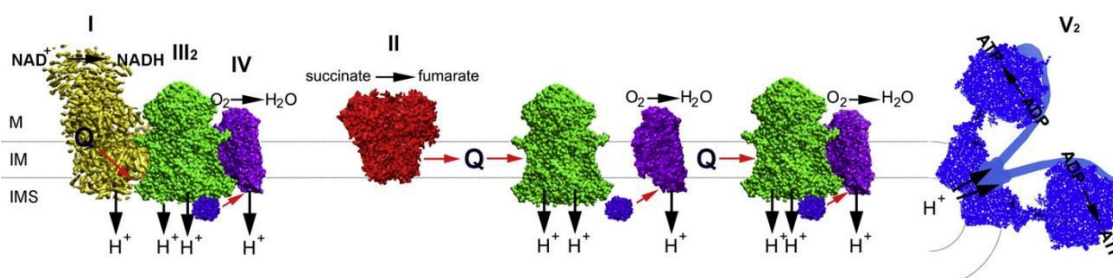


Figura 4. Los complejos de la cadena respiratoria se organizan en supercomplejos de forma transitoria. Esquema de la organización de supercomplejos en la membrana mitocondrial interna de mitocondrias humanas. En amarillo se muestra el complejo I o NADH deshidrogenasa, en rojo el complejo II o Succinato deshidrogenasa, en verde el complejo III o Ubiquinol-citocromo c reductasa y en púrpura el complejo IV o Citocromo C oxidasa. En azul, se muestra la ATP sintasa o complejo V. Las flechas indican la dirección del bombeo de protones y el cambio de los cofactores. (Q) corresponde a ubiquinona y citocromo c la proteína restante morada. (M) corresponde a matriz mitocondrial, (IMS) a espacio intermembrana e (IM) a la membrana interna. Modificado de Chaban et al., 2014 [32].

1.2. El Complejo I y el gen *NDUFS2* en enfermedades mitocondriales

La mayoría de las patologías mitocondriales se asocian a genes nucleares que codifican subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones [33]. De todos ellos, el complejo I es el que presenta mayor número de mutaciones en sus subunidades de origen nuclear [39], dando lugar a disfunciones mitocondriales que causan leucodistrofia, neuropatía o cardiopatía graves entre otras patologías [40].

Funcionalmente, el complejo I se agrupa en 3 módulos: N (encargado de la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$), Q (reductor de la ubiquinona) y P (translocación del protón) [41,42]. El módulo P a su vez se “subdivide” en los submódulos ND1, ND2, ND4 y ND5 [43]. Mientras que el módulo N y Q están orientados hacia la matriz, el módulo P está insertado en la membrana mitocondrial interna (Figura 5) [44].

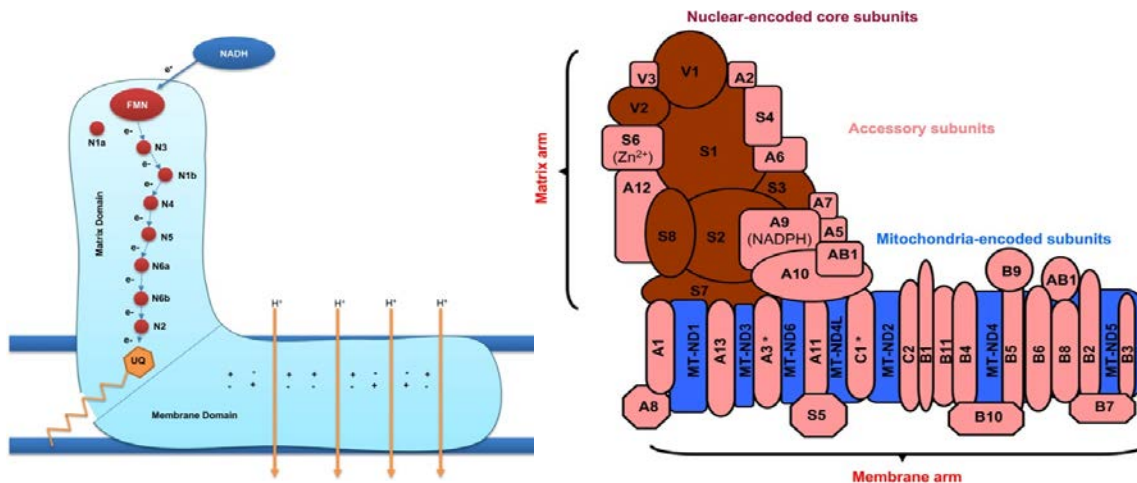


Figura 5. El complejo I está compuesto por 44 polipéptidos organizados en 6 módulos, siendo el complejo más grande de la cadena de transporte de electrones. El complejo I se ancla en la membrana interna a través de la región encargada del bombeo de protones. Esta región está compuesta de subunidades codificadas tanto en el núcleo como en la propia mitocondria. La región expuesta a la matriz mitocondrial es la encargada de aceptar electrones del cofactor NADH para la reducción de la ubiquinona; todas sus subunidades son de codificación nuclear. Se muestran las 44 subunidades (NDUFAB1 se encuentra dos veces en el complejo), su codificación y su localización en el complejo. Modificado de Rhooms et al. 2020 [44].

Se han hallado cerca de 200 mutaciones distintas en genes nucleares que codifican subunidades que conforman el complejo I; la gran mayoría están asociadas a síndrome de Leigh y cardiomiopatía hipertrófica [39]. Uno de los genes cuyas mutaciones están asociadas a una elevada mortalidad es *NDUFS2*.

NDUFS2 (*NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondria*) es una subunidad del complejo I cuya secuencia y asociación a enfermedades mitocondriales fue descrita hace más de 20 años [45]. Trabajos posteriores permitieron clasificar *NDUFS2* como una proteína estructural del módulo Q del complejo I [41].

NDUFS2 es considerado un punto caliente (“hotspot”) mutacional entre los genes que codifican el conjunto de subunidades nucleares del complejo I [46]. A fecha de 2016, se habían hallado hasta 18 mutaciones distintas en la secuencia de *NDUFS2*, muchas de ellas asociadas a patología [39]. Las 3 primeras mutaciones (Figura 6) descritas en pacientes, R228Q, P229Q y S413P, causan cardiomiopatía hipertrófica, en algunos casos acompañada de neuropatía e incremento de lactato. Los pacientes fallecieron a los pocos días o semanas de vida de su nacimiento [47].

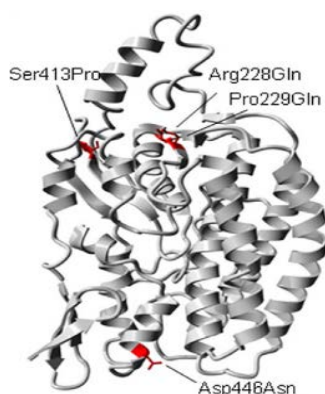


Figura 6. NDUF52 codifica una proteína de 49 kDa que forma parte del complejo I de la cadena respiratoria en la que se han hallado mutaciones asociadas a patología. Estructura tridimensional de la subunidad NDUF52 del complejo I de la cadena de transporte de electrones. Se muestran algunas de las mutaciones que dan lugar a pérdida de actividad o abundancia del complejo I (R228Q, P229Q, S413P y D446N). Modificado de Ngu et al. 2012 [48].

Posteriormente a las primeras 3 mutaciones descritas, se halló 1 mutación adicional (M292T) causante de síndrome de Leigh, cardiomiopatía y acidosis láctica, principales causas de muerte de los pacientes a los pocos meses de vida [46].

Más recientemente se describió una quinta mutación, D446N, la cual da lugar a neuropatía sin cardiomiopatía hipertrófica e incremento de lactato circulante que destaca por causar una pérdida de actividad catalítica del complejo I sin reducción de su abundancia [48]. Entre aquellas mutaciones halladas asociadas a patología, E104A causa síndrome de Leigh y alteraciones cardíacas en la persona afectada [49]. Según se refleja en “*The Human Gene Mutation Database (HGMD®)*” [50], posteriormente a 2016, se han descrito otras 4 mutaciones en NDUF52, dos de las cuales, Y53C e Y308C, están asociadas a neuropatía óptica no hereditaria [51].

Aunque los defectos en la función de NDUF52 también se han asociado a fenotipos de hepatopatía y esteatosis por alteración de la lipogénesis [52,53], las patologías causadas por la deficiencia de NDUF52 más abundantes son la cardiomiopatía hipertrófica, acompañada del incremento de lactato circulante [54]. Este incremento en el lactato circulante es la principal causa de las crisis metabólicas graves [55] que dan lugar a una elevada mortalidad en estos pacientes a edades muy tempranas [56].

2. Las enfermedades mitocondriales causan enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte en el mundo occidental y países en desarrollo con cerca de 18 millones de muertos cifrados en 2017 (Figura 7) [57].

Number of deaths by cause, World, 2017

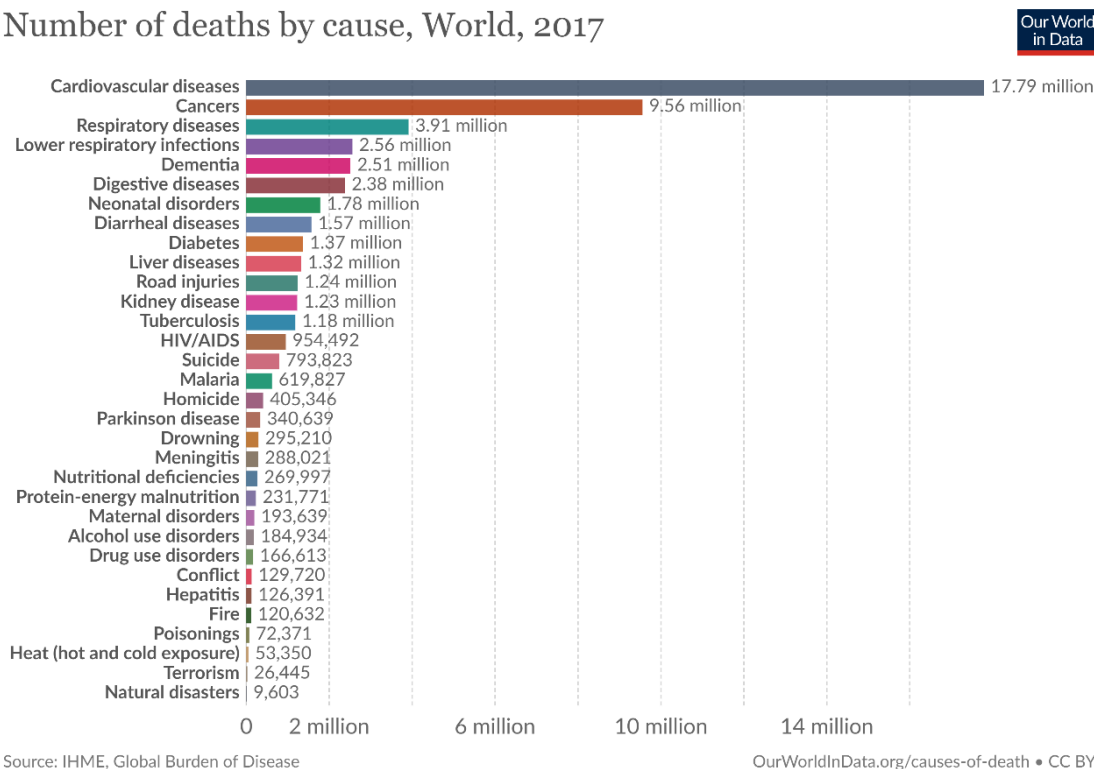


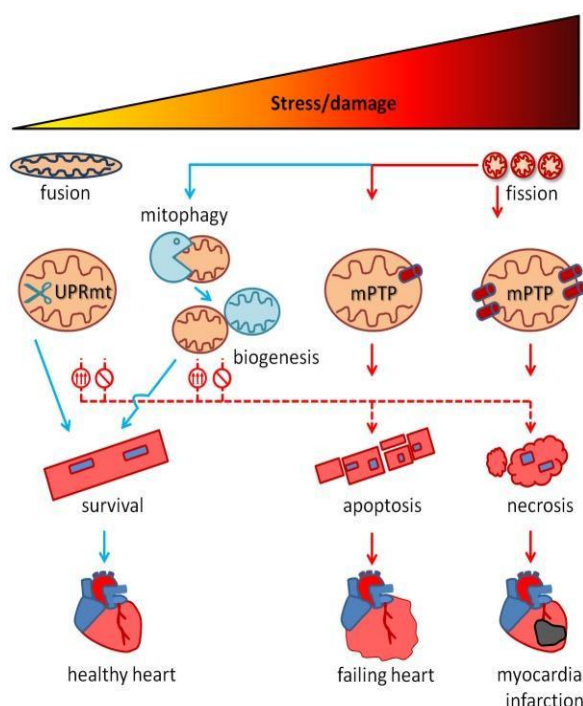
Figura 7. Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte del mundo entero. A fecha de 2017, la mortalidad por problemas cardiovasculares casi duplica la causada por el cáncer, otro conjunto de enfermedades que afecta a la población mundial drásticamente. Obtenido de: " <https://ourworldindata.org/causes-of-death> Hannah Ritchie (2018) - "Causes of Death" [57].

Las enfermedades cardiovasculares se pueden clasificar, según el órgano o parte afectada, en hipertensión, enfermedades coronarias, enfermedades vasculares, fallo cardíaco, enfermedades reumáticas por infección, malformaciones congénitas del corazón y cardiomiopatías [58]. El origen de las enfermedades cardiovasculares es muy diverso pudiendo residir, por ejemplo, en defectos de conducción eléctrica, valvulopatías o defectos genéticos en la formación o funcionamiento del corazón [59].

Dentro de las enfermedades cardiovasculares, debido a su incidencia, inevitabilidad y mal pronóstico, podemos destacar aquellas causadas por pérdida

de función mitocondrial [60]. En las enfermedades cardiovasculares, esta pérdida de función mitocondrial se asocia a alteraciones en la producción de especies reactivas de oxígeno, desregulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular o cambios en la regulación de genes como *PGC1A* y puede dar lugar a patologías como aterosclerosis, fallo cardíaco, hipertensión o síndrome metabólico [61].

En situaciones en que la función mitocondrial se ve comprometida, aumenta la actividad de los procesos de control de calidad mitocondrial, como la *Unfolded Protein Response* (UPR^{mt}) y la mitofagia, el reciclaje de proteínas y mitocondrias respectivamente, que mantienen bajo control la función mitocondrial [13,62]. En las enfermedades cardiovasculares causadas por defectos mitocondriales, este



control de calidad es ligeramente distinto (Figura 8). Tiene lugar una disminución excesiva de la mitofagia y un aumento de los procesos de fisión mitocondrial [63,64], acompañados de una mayor liberación de factores apoptóticos por apertura del poro de transición de membrana mitocondrial (mPTP) [65] que termina por provocar apoptosis de los cardiomiocitos y desemboca en fallo cardíaco o infarto del miocardio [66].

Figura 8. Esquemización del control de calidad mitocondrial en el tejido cardíaco. Las flechas azules indican mecanismos que ocurren en condiciones normales previenen el daño mitocondrial, como UPR^{mt} , mitofagia o fusión mitocondrial. Las mitocondrias muy dañadas (flechas rojas) entran en procesos de fisión y disparan la apertura del mPTP, dando lugar a fallo cardíaco o, en última instancia, infarto. En condiciones de enfermedad mitocondrial, daños leves en la mitocondria puede disparar estos mecanismos, exacerbando el daño real del tejido (flechas rojas punteadas). Modificado de Svaguša et al. 2020 [66].

2.1 Las cardiomiopatías y su relación con el metabolismo mitocondrial

El miocardio tiene una gran demanda energética y dependencia de la función mitocondrial; más del 90% del ATP que consume procede de la fosforilación oxidativa y más de un 30% de la masa del corazón son mitocondrias [67].

En los cardiomiocitos con deficiencias mitocondriales, la cantidad de ATP suministrada por las mitocondrias es mucho menor de lo necesario, además de darse una desregulación en el metabolismo de Ca^{2+} y estrés oxidativo en las mitocondrias y las células [68]. En consecuencia, tiene lugar un cambio metabólico que dispara la producción de ATP vía glucólisis, un mecanismo de compensación que intenta modificar el metabolismo cardíaco a un estado similar al fetal, el cual resulta insuficiente para satisfacer la demanda energética del corazón [69].

Paralelamente a este cambio metabólico, tiene lugar una adaptación anatómica en el miocardio. Se produce un incremento del número de unidades contráctiles del miocardio que permiten al corazón aguantar el incremento de la precarga, así como una menor generación de calor por el incremento de tensión de sus paredes [70]. La remodelación anatómica ligada al cambio metabólico es el principal motivo por el cual entre el 20 y 40% de los nacidos vivos con enfermedades mitocondriales padecen de cardiomiopatía [56]. En el contexto de enfermedad mitocondrial, la cardiomiopatía está ligada a una elevada mortalidad; en una cohorte de pacientes con enfermedades mitocondriales, la mortalidad fue un 40% mayor en aquellos que padecían de cardiomiopatía [71].

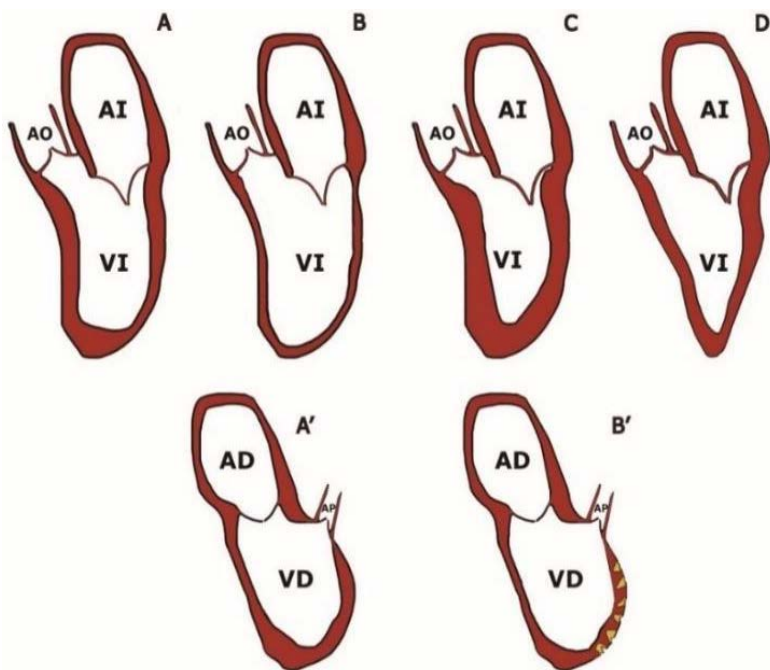


Figura 9. Tipos de cardiomiopatía según la anatomía del miocardio. Representación en vista apical del eje aurículo-ventrículo izquierdo del miocardio (A-D). Respecto al corazón normal (A), las paredes del ventrículo se dilatan aumentando el tamaño interior del ventrículo en la cardiopatía dilatada (B), mientras que éstas aumentan su tamaño hacia dentro limitando el tamaño de la cavidad ventricular en la cardiopatía hipertrófica (C). En la cardiopatía restrictiva (D) las paredes del ventrículo aumentan de tamaño en ambos sentidos

limitando el volumen de éste. Representación en vista apical del eje aurículo-ventrículo izquierdo del miocardio (A'-B'). Respecto al corazón normal (A'), en la cardiomiopatía arritmogénica ventricular izquierda (B') se insertan depósitos de grasa (en amarillo) que ocupan los huecos que aparecen por la debilitación de las paredes. Arteria Aorta (AO), aurícula izquierda (AI), ventrículo izquierdo (VI), arteria pulmonar (AP), aurícula derecha (AD) y ventrículo derecho (VD).

Según el cambio anatómico que experimenten las paredes del corazón (Figura 9), las cardiomiopatías se pueden clasificar en: dilatadas, hipertróficas, restrictivas, arritmogénicas del ventrículo izquierdo y otras (fibroelastosis endocárdica, cardiomiopatía de Takotsubo, etcétera) [72].

Dentro de las cardiomiopatías causadas por defectos mitocondriales, las más frecuentes son las cardiomiopatías dilatada e hipertrófica [73]. Los síntomas característicos de las cardiomiopatías son: fallo cardíaco, arritmia taquicárdica ventricular y muerte súbita [74]. Sin embargo, los síntomas descritos no son el único riesgo de las cardiomiopatías mitocondriales.

Debido a su carácter multisistémico, una de las complicaciones de las enfermedades mitocondriales es la interacción de unos órganos con otros, lo que puede dar lugar a fallos multiorgánicos con crisis metabólicas asociadas a una gran mortalidad antes incluso de aparecer los síntomas de cardiomiopatía, dificultando el pronóstico de la enfermedad [55].

2.2 El papel del corazón en la comunicación con otros órganos en enfermedades mitocondriales multisistémicas

Las enfermedades mitocondriales cardiovasculares destacan no solamente por su elevada mortalidad, sino porque afectan a otros órganos y sistemas aparte del corazón y el sistema vascular [75]. El corazón puede señalizar a otros tejidos o, al contrario, cambios fisiopatológicos en otros órganos pueden dar lugar a cardiopatía [76].

El mecanismo principal por el cual el corazón humano, en un contexto de enfermedad, es capaz de afectar a otros tejidos u órganos es la inflamación. Se ha demostrado que, en condiciones de fallo cardíaco, el corazón es capaz de secretar citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL1 β o IL16 que interactúan con el sistema vascular, el tejido adiposo o el músculo esquelético, dando lugar a aterosclerosis y degeneración [77]. En otro ejemplo de afectación multiorgánica, el incremento de la secreción de IL18 e IL1 β desde el corazón al bazo fuerza la remodelación de este último; esta retroalimentación aumenta los niveles circulantes de macrófagos y células dendríticas que acaban en distintos órganos como riñones o tejido adiposo, alterando su función [78].

Los procesos de degeneración en el corazón también pueden tener lugar cuando la inflamación proviene de otros tejidos. Por ejemplo, la resistencia a insulina, obesidad o dislipidemia alteran el metabolismo mitocondrial cardíaco, dando lugar a cardiomiopatía hipertrófica; de igual modo, una sobreactivación de angiotensina II y aldosterona circulante puede llegar a causar apoptosis y cardiomiopatía metabólica [79].

Además de la inflamación, diferentes mediadores del metabolismo energético y la homeostasis tisular son capaces de afectar a la salud cardíaca directamente. En vertebrados, IGF1 (*Insulin Growth Factor*) e IGFBP7, de la familia de las IGFBP (*Insulin Growth Factor Binding Protein*) [80], que conforman junto con la insulina el eje IIS (*Insulin/IGF1 signaling*), regulan el metabolismo, el crecimiento y mantenimiento de multitud de órganos y la longevidad [81]. La alteración del eje IIS puede comprometer la función cardíaca. Se ha demostrado que IGF1 inhibe la apoptosis y retrasa la aterosclerosis, ejerciendo un efecto protector en el corazón; además, en numerosas enfermedades cardiovasculares los niveles circulantes de IGF1 tienden a ser reducidos [82]. Por otro lado, la concentración de IGFBP7 circulante es mayor en pacientes que presentan anomalías en la anatomía y función cardíacas, siendo esta molécula un marcador de hipertrofia y fibrosis en el corazón [83,84].

Otros mediadores del metabolismo energético también están implicados en mantener la función cardíaca. PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), activado por la sirtuina SIRT1, es responsable de la mejora en la evolución de las cardiomiopatías en condiciones de restricción calórica [85]. La inhibición parcial de una de las subunidades que componen el complejo mTORC1, quien mantiene la homeostasis de los adipocitos [86], retrasa la remodelación y fallo cardíacos en un contexto de infarto de miocardio, alargando la esperanza de vida [87]. La remodelación del corazón en un contexto de fallo cardíaco se ralentiza por la acción de BNIP3 (*Bcl-2 E1B 19-KDa interacting protein 3*), dependiente de JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) y FOXO3a (*Forkhead box protein 3a*) [88].

De las 4 isoformas en humano del factor de transcripción FOXO (FOXO1, FOXO3, FOXO4 y FOXO6), cuya expresión variable según el tejido [89], algunas están implicadas directamente en la función cardíaca. Así, la fosforilación de

FOXO1 y FOXO3 por Akt regula la actividad mitocondrial e impide que la hipertrofia del miocardio derive en cardiomiopatía [90]. La ausencia de complejo mTORC1, que también interacciona con Akt, puede provocar resistencia a la insulina y esteatosis [91], que, a su vez, pueden inducir cardiomiopatía [92].

Estos ejemplos muestran el carácter multisistémico de las enfermedades mitocondriales del corazón, que relacionan la ruta de la insulina, la inflamación, el metabolismo energético del tejido graso y la función de otros órganos. Por ello, es crucial el estudio de estas enfermedades a través de modelos animales que permitan arrojar luz sobre su fisiopatología, posible tratamiento farmacológico y correcto pronóstico de los pacientes.

3. Modelización de las enfermedades mitocondriales cardiovasculares

Las enfermedades mitocondriales cardiovasculares destacan por la falta de un tratamiento curativo eficaz, así como un diagnóstico difícil y un pronóstico reservado [9]. El diagnóstico de estas enfermedades se ha optimizado muy recientemente gracias a las nuevas técnicas de secuenciación genómica y exómica [93]. Sin embargo, debido a lo heterogéneo del fenotipo, la utilización de modelos animales que ayuden a la comprensión de los mecanismos moleculares, las respuestas fisiopatológicas y respuesta a los tratamientos farmacológicos sigue siendo necesaria [94].

Aunque el empleo de animales como modelos de experimentación data de hace más de 2700 años, no fue hasta 1976, con el desarrollo del primer ratón transgénico, hito a partir del cual cobra especial relevancia la experimentación animal para la investigación biomédica [95].

Debido a sus similitudes genéticas con los seres humanos [96,97], y la conservación de los procesos de desarrollo embrionario del corazón [98], *Mus musculus* es muy utilizado en modelización de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, las diferencias en la frecuencia de latido (550 pulsaciones por minuto en reposo en ratón frente a 70 en humanos) entre los modelos de ratón y humano [99], junto con un tiempo de generación superior a los 2 meses, hacen

aconsejable el uso de modelos alternativos cuya fisiología cardíaca sea similar a la humana, y que posean un tiempo de generación más corto.

3.1 Modelización de enfermedades cardiovasculares en *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un modelo animal empleado en el campo de la biomedicina desde principios del siglo XX, cuando revolucionó lo conocido sobre la genética y la evolución mendelianas [100], presenta una serie de características que lo convierten en un modelo animal atractivo. Por un lado, el ciclo de vida *Drosophila melanogaster*, que incluye un proceso de metamorfosis (Figura 10), es solamente de 10 días. La hembra adulta puede poner más de 2000 huevos a lo largo de su vida y los materiales y requerimientos para su cuidado son baratos [101].

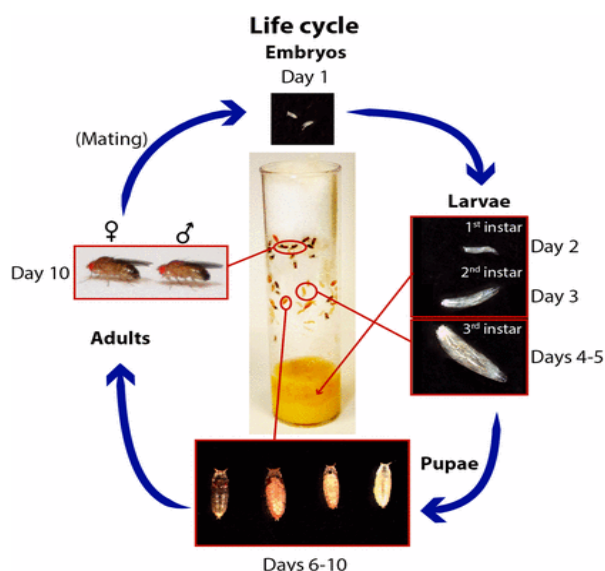


Figura 10. El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. En el transcurso de 24 horas, del embrión se desarrolla una larva móvil que, en el transcurso de 5 días crece hasta 200 veces su tamaño inicial, mudando de cutícula 2 veces. Cada muda da lugar a una fase que se conoce como estadio (“*instar*”) larvario. Tras el último estadio entra en metamorfosis holometábola, que dura aproximadamente 5 días, tras la que emerge un adulto con un marcado dimorfismo sexual. A lo largo de su vida, que oscila entre 2 y 3 meses de vida, la hembra pondrá alrededor de 100 huevos cada día. Obtenido de Hales et al 2015 [102].

Por otro lado, *Drosophila melanogaster* tiene un genoma más pequeño y menos redundante que los vertebrados [103]. Posee 14000 genes repartidos en 4 cromosomas, habiéndose descrito la función de la mayoría [102,104].

Además, la incapacidad de los machos de *Drosophila melanogaster* de formar quiasmas [105], junto con la disponibilidad de marcadores fenotípicos y cromosomas balanceadores [106], permite controlar la dosis génica de elementos transgénicos empleados en investigación como el sistema UAS-GAL4 [107].

Este sistema se compone de dos elementos, el factor de transcripción de levadura GAL4 y el elemento UAS (*upstream activating sequence*) a través del que activa la transcripción. En presencia del factor de transcripción GAL4, el elemento UAS, no presente de manera natural en el genoma de *Drosophila*, actúa como potenciador o “*enhancer*” activando la expresión del gen adyacente.

El uso en *Drosophila melanogaster* del sistema UAS-GAL4 ha permitido generar una amplia gama de líneas de moscas transgénicas con las que se puede expresar o inhibir la función de un único gen de forma tejido-específica [108]. Tradicionalmente, estas líneas se emplean para generar modelos de multitud de enfermedades [109], entre las cuales se hallan las cardiovasculares [110].

La modelización en *Drosophila melanogaster* de enfermedades cardiovasculares es posible gracias a que el corazón de esta especie (Figura 11) está constituido por miocardio rodeado de tejido conjuntivo en el exterior y matriz extracelular en el interior [111]. El corazón también emplea un sistema de conducción eléctrica autónomo, regulada por canales iónicos e intervalos de polarización similares a los de mamíferos [112]. Además, sigue un proceso de desarrollo embrionario muy similar al de mamíferos, regulado por genes ortólogos a los genes de mamífero *Hand*, *Tbx20* o *Nkx2-5* entre otros [113,114].

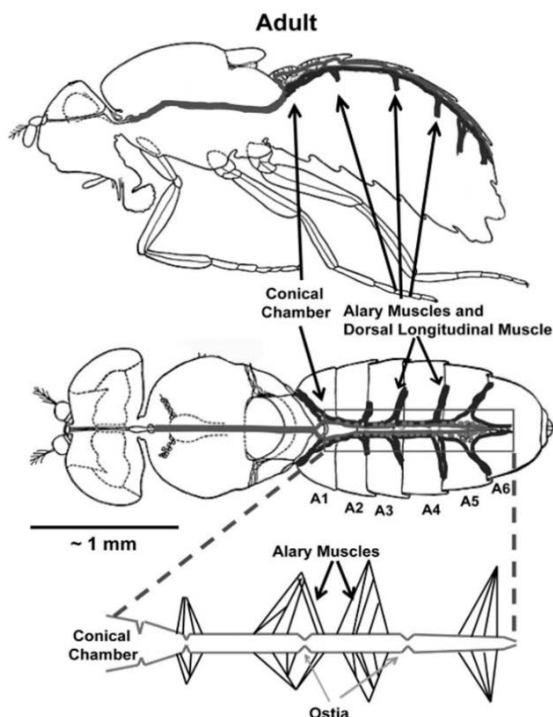


Figura 11. El corazón de *Drosophila melanogaster*. El corazón de *Drosophila* es unicameral, con forma tubular, y está constituido por cardiomiocitos. Presenta unas aperturas valvulares llamadas “ostias” y músculos alares (*alary muscles*) que sujetan el corazón al abdomen [115]. Desde la cámara cónica (*Conical Chamber*), situada en la región anterior del tubo cardíaco, se bombea hacia la cabeza la hemolinfa, que distribuye los nutrientes, en forma de trehalosa y lípidos, y el sistema inmune [111]. La hemolinfa de *Drosophila* no contiene células portadoras de oxígeno [116]. Este se distribuye mediante un sistema de tráqueas, por lo que comprometer la función cardíaca no supone la muerte inmediata del organismo, al contrario que en vertebrados. Obtenido de Matthew.J J Wolf y Rockman 2011 [116].

Estas características convierten a *Drosophila* en válida para el modelado de enfermedades cardiovasculares humanas [113], las cuales han podido ser caracterizadas gracias al desarrollo de diferentes técnicas de manipulación y observación del corazón.

Es posible visualizar el latido y la anatomía del corazón completo de forma sencilla, tanto en larva como en adulto, realizando una disección histológica abdominal [117] o bien por tomografía óptica, menos invasiva pero más costosa [118]. Según los cambios en el corazón tubular de *Drosophila*, es posible clasificar la cardiomiopatía en dilatada, hipertrófica o restrictiva [119]. Finalmente, además del corazón completo, diferentes estructuras del corazón de *Drosophila* como cardiomiocitos, células pericárdicas o fibras ventrales longitudinales [120] son reconocibles mediante técnicas de microscopía de fluorescencia [121].

A las similitudes del sistema cardiovascular de *Drosophila* con el de mamíferos, y las técnicas existentes para su análisis, hay que sumar que, de los 14000 genes descritos en la mosca del vinagre, cerca de 1700 presentan ortólogos en humano asociados a enfermedad [109,122]. Uno de esos genes cuya función y secuencia están altamente conservadas es CG1970, también llamado *ND-49* (subunidad *NADH dehydrogenase (ubiquinone)* 49 kDa), ortólogo del gen humano *NDUFS2* [46,123].

3.2 *ND-49 (NDUFS2)* y su asociación a enfermedades en *Drosophila melanogaster*

Al igual que su ortólogo humano, CG1970 (por claridad se referirá a él como *NDUFS2* a partir de ahora) codifica una subunidad estructural del complejo I de la cadena de transporte de electrones [44].

Aunque no hay mucha información acerca de la pérdida de función de *NDUFS2* en *Drosophila*, se ha demostrado que la interferencia de este gen afecta al corazón del adulto de *Drosophila melanogaster* dando lugar a cardiopatía dilatada grave [124].

Dada la importancia de la disfunción de *NDUFS2* en las cardiopatías humanas, en esta tesis doctoral se describe un modelo de disfunción cardio-específica de

NDUFS2 en *Drosophila melanogaster*. La interferencia de su expresión en el corazón de la mosca causa una cardiomiopatía dilatada acompañada de una alteración del ritmo cardíaco y un aumento de la mortalidad.

Además, se ha identificado un mecanismo de interacción entre el corazón y los cuerpos grasos en el cual *ImpL2* (“*Neural/ectodermal development factor IMP-L2* ó *Imaginal morphogenesis protein-Late 2*”), ortólogo del gen humano *IGFBP7*, modifica la regulación de la *IIS* en el tejido graso a través *Foxo*, ortólogo de *FOXO3a*, para garantizar la supervivencia del animal en detrimento de sus reservas de lípidos y glucógeno.

OBJETIVOS

La pérdida de función de *NDUFS2* en humanos da lugar a cardiomiopatías hipertróficas, síndrome de Leigh o hepatopatías entre otras patologías graves. Los mecanismos fisiopatológicos que conllevan la afectación de multitud de órganos en esta enfermedad mitocondrial son poco conocidos.

El objetivo general de esta tesis doctoral es caracterizar la pérdida de función cardio-específica del gen *NDUFS2* en el modelo de *Drosophila melanogaster* y su impacto multisistémico. Para ello, el objetivo general se apoya en los siguientes objetivos específicos:

1. Describir el fenotipo asociado a la interferencia de *NDUFS2* en el corazón de *Drosophila*
2. Investigar la respuesta que la interferencia de *NDUFS2* en el corazón de *Drosophila* induce sobre el tejido graso.
3. Determinar cuáles son los intermediarios responsables de inducir respuesta en el tejido graso por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MATERIALES

1.1 Reactivos, soluciones y tampones

Todos los reactivos empleados en los experimentos de esta tesis están descritos en métodos o en las referencias.

1.2 Condiciones estándar para el crecimiento de *Drosophila melanogaster*

La mosca de la fruta cosmopolita de la especie *Drosophila melanogaster* es la especie usada en todos de los experimentos. Los ejemplares son mantenidos en medio de cultivo estándar 10% levadura, sacarosa 7,5%, harina de maíz 3,5%, 1,25% agar y 1,25% propiónico a 25°C y 65% de humedad relativa.

1.3 Líneas de *Drosophila melanogaster*

Las líneas transgénicas empleadas se resumen en la Tabla 1. Para la interferencia de expresión, se cruzan hembras vírgenes UAS-*NDUFS2* ARNi, UAS-*NDUFV2* ARNi y UAS-*ImpL2* ARNi con machos *TINcΔ4*-Gal4 o *Act88F*-Gal4 a 25°C. *ImpL2*^{-/-} es una delección de 2000 pares de bases en el extremo 3' del gen CG15009 (*ImpL2*) [125].

Las hembras descendientes, salvo en el caso de las curvas de supervivencia, de los cruces se envejecen a 25°C para su posterior análisis. Las líneas *w*¹¹¹⁸, *TINcΔ4*-Gal4, *Act88F*-Gal4 y todas aquellas que incluyen secuencia UAS se utilizan como controles.

Nombre	Código	Procedencia	Utilidad
<i>w</i> ¹¹¹⁸	<i>W</i> ¹¹¹⁸	Repositorio Universidad Autónoma de Madrid	Control sano con mutación en color de ojos
<i>DB</i>	Dobles balanceados	Repositorio Universidad Autónoma de Madrid	Mapeado de los elementos transgénicos

Tabla 1. Resumen de la utilidad, procedencia y nombre de las líneas control utilizadas de *Drosophila melanogaster*. Todas las líneas son viables y no presentan problemas en el desarrollo o en los cruces.

Nombre	Código	Procedencia	Utilidad
<i>TINcΔ4</i>	<i>TINcΔ4-GAL4</i>	Cedidas laboratorio Manfred Frasch	Expresión de GAL4 cardio-específica en adulto
<i>Act88F-GAL4</i>	FBst0038461	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>	Expresión de GAL4 en músculos indirecto de vuelo
<i>UAS-NDUFS2i</i>	38824	<i>Vienna Drosophila Resource Center</i> (Librería GD)	ARN interferencia para gen CG1970
<i>UAS-NDUFV2i</i>	22194	<i>Vienna Drosophila Resource Center</i> (Librería GD)	ARN interferencia para gen CG5703
<i>ImpL2^{-/-}</i>	FBal0249379	<i>Institute of Molecular Systems Biology</i>	Mutante <i>knock-out</i> para el gen CG15009
<i>UAS-ImpL2_i</i>	FBst0055855	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i> (TRiP collection)	ARN interferencia para el gen CG15009
<i>UAS-ImpL2</i>	550	<i>Institute of Molecular Systems Biology</i>	Sobreexpresión para el gen CG15009
<i>Δ94</i>	FBst0042220	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>	Mutante <i>knock-out</i> para el gen CG3143
<i>FOXO_{GFP}</i>	FBst0038644	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>	Transgén FOXO con GFP N-terminal bajo control promotor FOXO
<i>TDI</i>	<i>UAS-TDI</i>	Construcción en el laboratorio	GFP con 6xHis insertada en la membrana mitocondrial externa

Tabla 2. Resumen de la utilidad, procedencia y nombre de las líneas transgénicas utilizadas de *Drosophila melanogaster*. Todas las líneas son viables y no presentan problemas en el desarrollo o en los cruces.

1.4 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en esta tesis doctoral fueron sintetizados por SIGMA-Aldrich®. Los cebadores que se utilizan para la comprobación de los transgenes se incluyen en la Tabla 2, orientados de 5'→3'.

	Secuencia	Utilidad	Tamaño amplicón
A	GGAAGTATGATGAATGGGAGCA	Cebador 5' identificación GAL4	230 pb
A'	GGAAAGTCCTTGGGGTCTTC	Cebador 3' identificación GAL4	
B	AACAAGTGGGAGTGTGCGCTA	Cebador 5' identificación UAS- <i>NDUFS2_i</i>	190 pb
B'	GCCAATCTATCTGTGACGGC	Cebador 3' identificación UAS- <i>NDUFS2_i</i>	
C	ACCAGCAACCAAGTAAATCAAC	Cebador 5' identificación <i>ImpL2</i>	420 pb
C'	TAATCGTGTGTGATGCCTACC	Cebador 3' identificación <i>ImpL2</i>	
D	GCAGTTTCGTGTTCCGTTTT	Cebador 5' identificación delección <i>ImpL2</i>	850 pb
D'	AATACGAATTGGGTGGGTGA	Cebador 3' identificación delección <i>ImpL2</i>	

Tabla 3. Oligonucleótidos de identificación. Resumen de los cebadores con los que se identifican los fragmentos de los transgenes de las líneas usadas durante toda la tesis.

Se resumen los oligonucleótidos empleados para la cuantificación de expresión relativa de los ARN mensajeros de los genes analizados con el nombre común y el símbolo de anotación según Flybase [126,127], en la Tabla 3.

Gen	Código	Cebador 5'	Cebador 3'
<i>4E-BP</i>	CG8846	AACCCTCTACTCCACCACTCTC	CAATCTTCAGCGACTTGG
<i>ACoAOx</i>	CG17544	GGAGCGCCAAGGAAGTGGAGA	GGGAGAAGTCCAGCTGGCTAT
<i>Akh</i>	CG1171	GCGAAGTCCTCATTGCAGCCGT	CCAATCCGGCGAGAAGGTCAATTGA
<i>AkhR</i>	CG11325	CACACCTCGCTGTCCAATC	CATCACCTGGCCTCTTCCA
<i>Brummer</i>	CG5295	TCCCCGAGTTTCTGTCCAAGT	GCGTCCTTTCTGTGCTTCTT
<i>dAMPKα</i>	CG3051	CATCCGCACATCATCAAGTT	TTCTCTGGCTTCAGGTCTCG
<i>dHNF4</i>	CG9310	GGCGACGGGCAAACATTATG	CGCAAATCTGCAAGTGTACTGAT
<i>Dilp2</i>	CG8167	CGAGGTGCTGAGTATGGTGTG	CCCCAAGATAGCTCCCAGGA
<i>Dilp6</i>	CG14049	CGATGTATTTCCCAACAGTTTCG	AAATCGGTTACGTTCTGCAAGTC
<i>dSesn</i>	CG11299	CTCGACTCGATCCCTCCG	CAGGTCATCGAGCTCGTCC
<i>dSREBP</i>	CG8522	CGCAGTTTGTGCGCTGATG	CAGACTCCTGTCCAAGAGCTGTT
<i>Foxo</i>	CG3143	TGGATCACTTTCCCGAGAGTC	CCTGCGTCATCGTTGTGTTCT
<i>Gapdh2</i>	CG8893	CCTTGCAAGCAAGCCGATAGATAA	GTTGGCGCCCTTATCAATGGC
<i>Glut1</i>	CG43946	TTACCGCGGAGCTCTTCTCC	GCCATCCAGTTGACCAGCAC
<i>GM05240p</i>	CG6178	GGACGAGGACGTGTCTCTTATTG	GGGTTGGATTTGTGAGTCGAGA
<i>ImpL2</i>	CG15009	AACCGCGAATCATCTACACC	GGACGATCTCCTTGTCTCG
<i>Lipasa</i>	CG5966	CTCGCAGTGTCTTTCTTG	TGCTCCTGGTAATCCTCCTG
<i>Mondo</i>	CG18362	AGCGAGACGAGCTAAACAATTC	GTGTAAGAGGCAAGCAAAGTT
<i>NDUFS2</i>	CG1970	CGTGCCGATCCGCATATT	CATTGCTCGTTGCACATCATC
<i>Pfk</i>	CG4001	ACTTCCGCTTATCACCACCA	GTATGTTGCTGCTGTCATGGG
<i>RpL10</i>	CG17521	AAGAAGGTGCTCTGCCTGTC	CGCACATTCTGCCAGTTCT
<i>Spargel</i>	CG9809	GGATTCACGAATGCTAAATGTGT	GATCCCTACCATGCCGCTCAG

Tabla 4. Oligonucleótidos RT-qPCR. Resumen de los cebadores empleados para la RT-PCR cuantitativa relativa de ARN procedente de abdomen.

1.5 Tinciones

Los distintos reactivos empleados en las tinciones inmunohistoquímicas en toda la tesis se indican en la siguiente lista:

Faloidina fusionada con Alexa Fluor® 546 – Invitrogen® A22283

Faloidina fusionada con Alexa Fluor® 647 – Invitrogen® A22287

Rojo Nilo – Invitrogen® N1142

Hoechst 33342 - Invitrogen® 62249

Dihidroetidio Invitrogen® D11347

2. MÉTODOS

2.1 Sistema UAS-GAL4

En esta tesis se ha empleado el sistema UAS-GAL4 para la expresión dirigida de genes tanto en adultos como larvas de *Drosophila melanogaster* [107]. Este mecanismo permite la expresión de los genes de interés de manera ubicua o en un tejido o conjunto de células concreto. La expresión del gen de interés está controlada por la secuencia UAS, la cual está compuesta por sitios de unión para GAL4. GAL4 es un factor de transcripción de levadura que no existe en el genoma de *Drosophila*. La secuencia UAS solamente funciona activando la expresión de la secuencia adyacente y requiere GAL4 para funcionar. La expresión del gen de interés se alcanza cruzando moscas portadoras de la construcción UAS con moscas que expresan GAL4 en un tejido o conjunto de células específico. La F1 porta ambos elementos y expresa el gen de interés en el territorio en que se expresa GAL4.

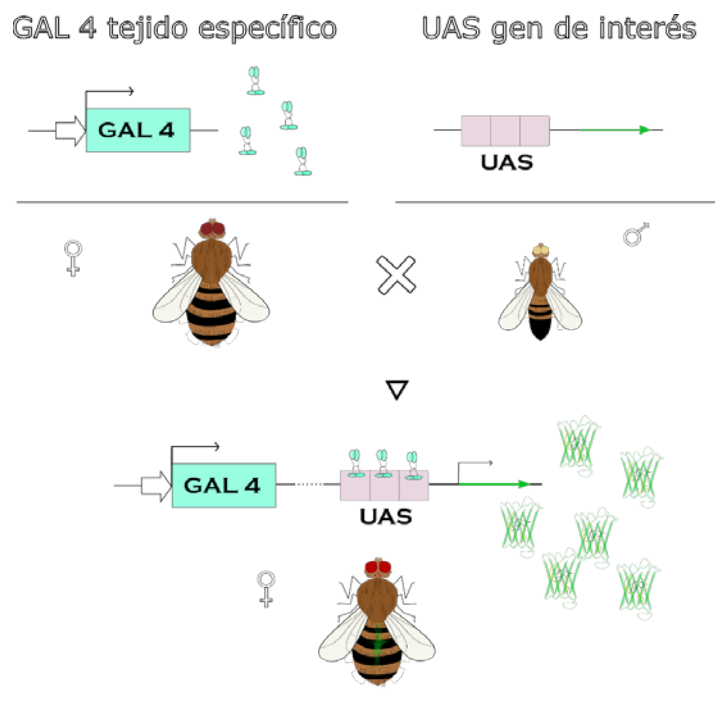


Figura 1. Representación esquemática del sistema UAS-GAL4. *Drosophila melanogaster* transgénicas que portan GAL4 bajo el control de un promotor que dirige su expresión en el tejido de interés se cruzan con moscas que contienen UAS dirigiendo la expresión del gen de interés. La descendencia el gen de interés en el territorio en que se expresa GAL4.

2.2 Curvas de supervivencia

Se sigue el protocolo establecido por Bovier *et al.*, 2019 [128]. Brevemente, se separan 4 grupos de 100 machos de *Drosophila* adultos por línea transgénica, los cuales se mantienen en condiciones estándar a 25°C. Los ejemplares se cambian a medio de cultivo nuevo 2 veces a la semana y se contabilizan las moscas muertas, omitiendo de la curva aquellas que escapan volando o permanecen vivas atrapadas en la papilla. La curva finaliza cuando han muerto todos los ejemplares de cada línea.

2.3 Análisis de la función y anatomía del corazón y los cuerpos grasos en *Drosophila melanogaster*

2.3.1 Disección del corazón de adultos *Drosophila melanogaster*

Se seleccionan y anestesian hembras adultas (de 2 semanas de edad salvo indicación) con FlyNap® (Carolina Biological Supply), durante 2 minutos. Se expone la parte ventral y se cubren con hemolinfa artificial (NaCl 108mM; KCl 5mM; CaCl₂ 2mM; MgCl₂ 8mM; HEPES 15mM; NaH₂PO₄ 1mM; NaHCO₃ 4mM; sacarosa 10mM y trehalosa 5mM [4]; pH=7.1) oxigenada.

Acorde con el protocolo establecido por Vogler y Ocorr, 2009 [117] se eliminan la cabeza y una fracción del tórax con tijeras de microcirugía de 8 cm (Panlab® 73-8483) y pinzas de calibre 5 (GARDAX MEDICA® HB 105) retirando la cutícula ventral, descartando casi todos los órganos y exponiendo el corazón y los cuerpos grasos.

2.3.2 Tinción histoquímica del corazón y/o los cuerpos grasos de *Drosophila melanogaster*

Para visualizar las distintas estructuras del corazón se emplean tinciones de contraste visualizadas en microscopía de fluorescencia, con modificaciones del protocolo de Alayari *et al.*, 2009 [121]. Tras retirar la hemolinfa artificial se incuban los abdómenes en solución de relajación 15 minutos (EGTA 10mM; MgCl₂ 5mM y PBS 1X pH=7.4) para inhibir la contracción del corazón. Posteriormente se fijan los tejidos de los animales con paraformaldehído 4% disuelto en PBS 1X a temperatura ambiente 15 minutos, y se hacen 2 lavados con PBST (PBS 1X -

0,2% Tween-20). Después de los lavados, los abdómenes se incuban “overnight” a 4°C con: falodina Alexa Fluor® 546 1:500 en PBST para teñir las fibras de actina en el corazón, faloidina Alexa Fluor® 647 1:200 o con rojo Nilo 1:2500 N1142 en la PBST para la actina cortical y las gotas de lipidos en los cuerpos grasos. Para las tinciones realizadas en cuerpos grasos, tras 2 lavados con PBS, se procede a realizar la tinción con Hoechst 33342 1:3000 en PBS 1x de 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se realizan 2 lavados en PBS.

Para la localización de los núcleos de los adipocitos en las líneas que portan la construcción FOXO_{GFP} se tiñó únicamente con Hoechst 33342 en las mismas condiciones.

Para detectar las especies reactivas de oxígeno en el corazón se emplea la tinción con dihidroetidio. Después de la disección abdominal y la incubación de los abdómenes en solución de relajación, se tiñe con dihidroetidio 1:200 (Invitrogen® D11347) y Hoechst 33342 1:3000 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras 2 lavados con PBS se lleva a cabo la fijación y los lavados en PBS.

Para el montaje de los abdómenes, se imbuyen boca abajo las muestras en Citifluor® 17971-100-ANAME en un cubreobjetos de 25x25 mm, colocándose encima un portaobjetos estándar.

2.3.3 Fotografía y análisis de imagen

Las tinciones histoquímicas fluorescentes se fotografían en microscopio confocal Leica TCS SP5 con cámara digital Leica DFC 350 FX en objetivos de 20x y 63x, mientras que las fotografías del abdomen sin tinción se adquieren en microscopio Nikon 90i® de campo claro con objetivo 20X. Las fotografías poseen una resolución de 1024 x 1024 píxeles con un salto de 3 µm entre planos en el *stack*, salvo que se indique lo contrario. Para el procesado y medición de las regiones de interés (*ROI* en inglés) se utiliza el programa FIJI-Image J 1.53c [129].

Para la valoración de emisión de especies reactivas de oxígeno por los núcleos de los cardiomiocitos se realiza una variación del protocolo establecido por Martínez-Morentin [130]. Brevemente, se adquieren series de fotografías de

corazones con marcaje fluorescente por GFP y teñidos con dihidroetidio D11347 y Hoechst 33342. En el software de análisis FIJI, se suma la fluorescencia de los 10 planos que engloban la mitad inferior del corazón de las fotos, obteniendo una proyección donde se hallan los cardiomiocitos. En cada corazón se mide el área de 10 núcleos y la intensidad de la fluorescencia emitida por el dihidroetidio, además del valor gris medio y la densidad integrada, que relaciona la cantidad de fluorescencia por unidad de área. Estos últimos datos permiten estandarizar todos los valores de fluorescencia que emite el dihidroetidio en los núcleos, los cuales se procesan posteriormente.

Para la medición de las áreas y perímetros de la cámara cónica del corazón se realizan series de fotografías de corazones con un marcaje fluorescente cardio-específico (basado en el sistema UAS-GAL4) con una resolución en Z de 0,5 μm , con la cual se obtiene una serie de fotografías que recoge la estructura tubular completa del corazón. En FIJI se realizan las mediciones de área y perímetro en las proyecciones ortogonales de la serie de fotografías de la cámara cónica y el cardiomiocito. En los corazones teñidos con faloidina Alexa Fluor® 546, se mide el área que ocupan la superficie de las fibras longitudinales, señalada como un recuadro de bordes blancos, en la última sección del corazón en la proyección máxima de los planos de cada serie de fotografías con el software FIJI.

En los cuerpos grasos de las moscas se mide el área de la sección de los adipocitos. Para ello, se realizan fotografías de los cuerpos grasos teñidos con faloidina Alexa Fluor® 546, rojo Nilo N1142 y Hoechst 33342 en series de unos 15 planos planos con una resolución en Z de 1,5 μm . Posteriormente, con el software FIJI se mide el área circundada por la actina cortical de 12 adipocitos por cuerpo graso. En aquellas moscas que portan la construcción FOXOGFP se realizan fotografías de los cuerpos grasos teñidos con Hoechst 33342 en series de 20 planos con una resolución en Z de 1,5 μm y se obtiene la proyección máxima de la fluorescencia emitida por Foxo con el software FIJI.

La manipulación y disposición de imágenes en paneles se lleva a cabo en Adobe Photoshop® y Adobe Illustrator®.

2.3.4 Medición de frecuencia cardíaca de corazones de *Drosophila* adultas

Se disecciona el abdomen de moscas adultas siguiendo los pasos previamente descritos en placas con fondo de cristal de 35 mm (AI-80136 IBIDI®) sin añadir solución de relajación. Se toman fotografías de campo claro a una velocidad de 2,97 fotogramas por segundo durante 2 minutos en Cell Observer Zeiss®. Posteriormente, se utiliza el software FIJI para convertir los sets de imágenes de cada corazón en videos en los que se puede observar los latidos del corazón. Por último, se contabilizan dichos latidos cada minuto de forma manual para su posterior análisis estadístico.

2.4 Bioquímica del corazón y los cuerpos grasos en *Drosophila melanogaster*

2.4.1 Extracción de ADN y PCR genómica de *Drosophila melanogaster*

El ADN genómico se obtuvo siguiendo el protocolo “Single Fly Genomic DNA Prep” por G. Dietzl (Viena 2002) con modificaciones menores. Brevemente, se disgregan dos moscas macho con punta de micropipeta en 50 µL de solución “Squishing buffer” (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA 25 y mM NaCl), a la que se ha añadido 200 µg/mL de proteinasa K® (AM2542 Invitrogen). Se incuban 30 minutos a 60° y se inactiva la Proteinasa K 3 minutos a 95°. Se centrifugan las muestras en tubos de 1.5 mL en Eppendorf™ Centrifuge 5424 R a 10.000 rpm 10 minutos; el sobrenadante que contiene ADN genómico se recoge en un tubo nuevo. Se utilizaron 2 µL del sobrenadante que contiene ADN genómico purificado como molde y Taq polimerasa (1 unidad por reacción) (10002-4100 Biotools®) para llevar a cabo una PCR de 30 ciclos con una temperatura de anillamiento de 55°C y periodos de incubación en cada paso de 30 segundos en el termociclador Applied Biosystems® 2720. Los amplicones resultantes se visualizan en un gel de electroforesis de agarosa 1% con SYBR Safe® (S33102 Invitrogen).

2.4.2 Extracción de ARN y RT-qPCR de abdomen de *Drosophila*

Se extrajo ARN de 40-50 abdómenes de moscas adultas diseccionadas siguiendo los mismos pasos que previamente, empleando 1 mL de TRIzol[®] Reagent Ambion siguiendo las instrucciones del fabricante. Se lleva a cabo retro-transcripción con High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813[®] Applied Biosystems). La PCR cuantitativa la llevó a cabo el Servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” en el termociclador Applied Biosystems[®] 7900 HT FAST Real-Time PCR system empleando el sistema SYBR Green. Los datos se analizan con software SDSv2.2.2, utilizando el gen *RPL10* (proteína L10 de la unidad ribosómica 60S) como gen de referencia para calcular la expresión relativa de los otros genes utilizando el sistema Δ CT.

2.4.3 Medición de triglicéridos y glucosa en *Drosophila melanogaster* enteras

Se sigue el protocolo establecido por Kwon *et al.*, 2015, con ligeras modificaciones [131]. Brevemente, la medición de triglicéridos totales se hace partiendo de 6 moscas. Se homogenizan en 500 μ L de PBT (PBS 1X + 0,1% Triton X-100), se calienta la muestra a 70°C durante 5 minutos y se centrifuga a 14.000 rpm en Eppendorf[™] Centrifuge 5424 R durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante. Las medidas se realizarán siguiendo las instrucciones del kit de BioSystems TRIGLYCERIDES[®] (11528).

Para la medición de glucosa se emplea una variación del protocolo de Williams *et al.*, 2016 [132]. Primero, se homogeneizan 6 moscas en 50 μ L de PBT (PBS + 0,1% Triton[®] X-100). A continuación, se calienta la muestra a 70°C durante 5 minutos, tras lo cual se centrifuga a 14.000 rpm en Eppendorf[™] Centrifuge 5424 R durante 10 min. Después, se toman 30 μ L del sobrenadante y se le añade 30 μ L de trehalasa (2 U/ μ L) (Megazyme[®]; E-TREH) incubando la muestra a 37°C durante 30 minutos para liberar glucosa de la trehalosa (principal glúcido circulante en *Drosophila*, compuesto por dos glucosas unidas por un enlace α (1 \rightarrow 1) [17]). Por último, se miden los niveles de glucosa con un glucómetro ACCU-CHEK[®] Aviva (Roche) aplicando 2 μ L de hemolinfa procesada en las tiras reactivas. El valor obtenido se multiplica por el factor de dilución para obtener las cantidades sometidas a análisis estadístico.

2.4.4 Extracción de hemolinfa y medición de glúcidos y triglicéridos circulantes de *Drosophila melanogaster*

Modificación del protocolo establecido por Kwon *et al.*, 2015 [131]. Para la extracción de hemolinfa se utilizan 120 hembras adultas distribuidas en 3 tubos de 0,5 mL con una ranura en el fondo. Cada uno contiene 40 moscas a las cuales se les ha perforado el tórax con una punta de tungsteno. Éstos se encajaron en tubos de 1,5 mL y se centrifugaron a 5.000 rpm Eppendorf™ Centrifuge 5424 R durante 5 minutos a 4°C. Se obtienen en total 2 µL de hemolinfa, que son diluidos en el mismo volumen de TBS (Tris-HCl 5 mM pH=6.6, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM). Una fracción de 2 µL se trata con trehalosa y se miden los niveles de glucosa como se ha descrito previamente. Otros 2 µL de hemolinfa no diluidos en TBS se utilizan para medir los niveles circulantes de triglicéridos siguiendo las instrucciones del kit de BioSystems TRIGLYCERIDES®.

2.4.5 Extracción de proteína mitocondrial y medición de actividad de complejos de cadena de transporte de electrones de *Drosophila melanogaster*

El protocolo de extracción de proteínas mitocondriales deriva del trabajo de Ferguson *et al.*, 2005 [133]. En un mortero enfriado en congelador se añaden 2 mL de SUC/TES/EDTA (sacarosa 250mM, Na-TES 10 mM y EDTA 1mM) y se presionan suavemente 100 moscas adultas para extraer los jugos gástricos y la hemolinfa. Se descarta el líquido y se añaden 2mL de solución, los cuales se vierten en un homogeneizador de teflón Potter® de 10 mL. Tras añadir otros 7 mL de SUC/TES/EDTA, se disgregan las moscas en 9 pasadas con suavidad, evitando burbujas. El sobrenadante se filtra con una malla de NITEX® de poro de 50 micras y se recogen tubos de 20 mL Nalgene® centrifuge tubes, Oak Ridge Style 3119 centrifugándose en Beckman Coulter® Allegra® 64R High-Speed Centrifuge, a 4°C 500 g 3 minutos. Posteriormente, se recoge el sobrenadante filtrándose de nuevo en malla de NITEX® de poro de 50 micras. Se centrifuga 10 minutos 9000 g 4°C y el sedimento se resuspende en 1 mL de SUC/TES/EDTA. Tras calcular la concentración de proteína de las muestras, diluidas en RIPA 13:20 (Tris-Cl 20 mM pH=7,5; 150 mM NaCl, 1mM Na₂EDTA; 1mM EGTA; 1% NP-40; 1% deoxicolato de sodio; 2,5mM pirofosfato de sodio; 1mM β-

glicerofosfato; 1 µg/mL leupeptina) y 5 µL de cóctel inhibidor de proteasas (78430® Thermo Scientific) con el kit Micro BCA Protein Assay (23235® Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se procede a medir la actividad de los complejos enzimáticos tras la purificación, realizando diluciones de las muestras hasta obtener una concentración de 2 µg/µL para medir los complejos I, IV y V de la cadena respiratoria. Para dicha medición se sigue el protocolo estandarizado de medición de actividad de cadena respiratoria del CIBERER (2012). Para dichas mediciones se realizan ensayos enzimáticos en espectrofotómetro a 37°C en cubetas de plástico de 10 mm de paso óptico.

2.4.5.1 Complejo I

Para medir la actividad del complejo I se realiza por duplicado una solución que contiene 20 µL (2 µg/µL) de mitocondrias purificadas, 100 µM decilubiquinona, y se completa con 500 mM KP pH=7,5 y 50 µg/µL BSA hasta 950 µL. Una de las réplicas contiene rotenona, un inhibidor del complejo I, 2,5 mM y otra 5 µL de etanol/DMSO. Se inicia la reacción con 50 µL de NADH 2 mM y se contabiliza absorbancia a 340 nm durante 3 minutos cada 15 segundos. Se calcula la actividad empleando factor de corrección $40323 * \left(\frac{\text{Absorbancia}}{\text{tiempo}} \right) * \frac{\text{Dilución}}{[\text{proteína}]}$ estandarizado según el protocolo.

2.4.5.2 Complejo IV

Para medir la actividad del complejo IV se realiza por duplicado una solución que contiene citocromo C reducido 100 µM y KP 50 mM pH=7 hasta 980 µL a la que se añaden 20 µL (2 µg/µL) de fracción mitocondrial y se mide la absorbancia a 550 nm durante 3 minutos cada 15 segundos. Para ponderar los valores de oxidación y reducción, se añade unos granos de ferricianuro potásico y ditionito sódico en dos réplicas distintas, lo que genera una solución 100% oxidada y 100% reducida, respectivamente. Se calcula la actividad enzimática empleando el factor de corrección $54054 * \left(\frac{\text{Absorbancia}}{\text{tiempo}} \right) * \frac{\text{Dilución}}{[\text{proteína}]}$.

2.4.5.3 Citrato sintasa

Por último, para medir la actividad de la citrato sintasa (un indicador de masa mitocondrial) se realiza por duplicado una solución que contiene 20 μL (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de la solución de mitocondrias purificadas y 5 mM DNTB (5,5' ditiobis-2-nitrobenzoato), TrisCl 100 mM pH=8,1, 300 μM AcetilCoA y 0,1% Triton X-100 hasta 950 μL . Se inicia la reacción con 500 μM de oxalacetato y se contabiliza absorbancia a 4112 nm durante 3 minutos cada 15 segundos. Se calcula la actividad enzimática con el factor de corrección $3676,5^* \left(\frac{\text{Absorbancia}}{\text{tiempo}} \right) * \frac{\text{Dilución}}{[\text{proteína}]}$, con la que se relativiza cada muestra de cada genotipo de mosca para corregir el sesgo de las diferencias en masa mitocondrial.

2.5 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media de los valores y desviación estándar. Las RT-qPCR fueron analizadas por una ANOVA de 2 vías estándar, asumiendo la distribución normal de las variables. En el caso de las áreas del corazón, la evaluación de ROS y los parámetros bioquímicos se utilizó T-student no pareado, asumiendo la distribución normal de las variables. Respecto a las curvas de supervivencia, se calcula los *Hazard Ratio* con el estadístico Mantel-Cox (*logrank*) con sus respectivos intervalos de confianza. Los análisis fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**), $p < 0,0005$ (***) y $p < 0,0001$ (****). Todos los análisis se realizaron en Prism Statistical Software (Graph Pad® 8) e IBM SPSS Statistics for Windows® 24.



1. Interferencia cardio-específica de *NDUFS2* en *Drosophila melanogaster*

La pérdida de función del gen *NDUFS2* causa enfermedades mitocondriales graves caracterizadas por una elevada mortalidad infantil debida a encefalopatía, cardiopatías hipertróficas y acidosis metabólica [47]. Los mecanismos fisiopatológicos que causan estos síntomas son poco conocidos. El gen *ND-49* (*NDUFS2*) de *Drosophila melanogaster* comparte función con su ortólogo humano, con el que posee una gran homología [46].

En esta tesis doctoral se ha generado un modelo basado en la interferencia de *NDUFS2* en el corazón de *Drosophila melanogaster* con el propósito de investigar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a las cardiopatías humanas causadas por las mutaciones en este gen, así como arrojar luz sobre los mecanismos de comunicación entre órganos, causa principal de las complicaciones en las enfermedades mitocondriales [76].

Experimentos previos del laboratorio demuestran que la supresión del gen *NDUFS2* en todos los tejidos es letal para *Drosophila melanogaster* en la primera fase larvaria, L1, dificultando enormemente el estudio. Para poder evaluar las consecuencias directas de la pérdida de función del gen *NDUFS2* de forma tejido-específica se utilizó el sistema UAS-GAL4 [107].

En el modelo desarrollado, se emplea la secuencia UAS fusionada a un ARN de interferencia para *NDUFS2* [108]. Su expresión es dirigida por el factor de transcripción GAL4 expresado bajo el control de una región del promotor del gen *tinman* [134], *TINcΔ4-GAL4* [135]. *TINcΔ4-GAL4* se expresa únicamente en el corazón de *Drosophila*, restringiendo la interferencia de *NDUFS2* al corazón de la mosca. La línea de moscas portadora de ambos elementos se obtuvo mediante los cruces descritos en la Figura 1. Ambos elementos están insertados en el mismo cromosoma.

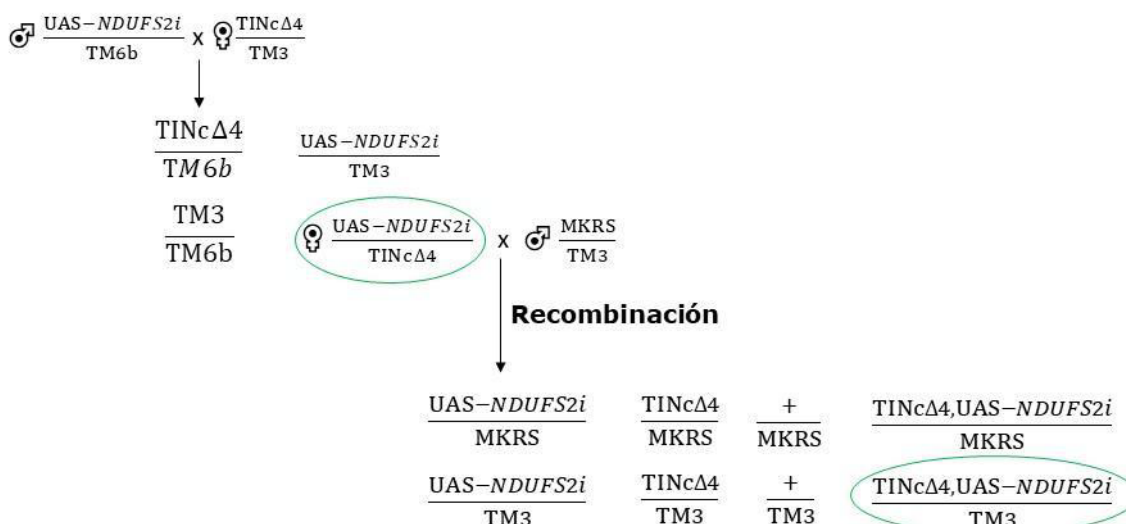


Figura 1. Resumen de los cruces empleados en la obtención de la línea *TINcΔ4>NDUFS2i*. Para poder obtener una línea que incluya ambas construcciones, al hallarse ambas construcciones en el cromosoma 3, se fuerza un evento de recombinación. Se utilizan hembras que portan una copia de cada construcción en un cromosoma y se cruzan contra machos con cromosomas balanceadores [134]. Se seleccionaron los animales que portan ambas construcciones sobre el cromosoma balanceador TM3 (elipse verde). Los cromosomas “+” no portan mutaciones, marcadores ni balanceadores.

Experimentos previos del laboratorio demostraron que la activación del elemento *UAS-NDUFS2i* por el controlador *TINcΔ4* conlleva una interferencia del 50% en el corazón [136]. Con el objetivo de analizar el efecto de esta interferencia del gen *NDUFS2* sobre el corazón de la mosca, se realizó un estudio fenotípico de este órgano. Se diseccionó el abdomen de moscas adultas *w¹¹¹⁸*, sin interferencia de *NDUFS2* y de *TINcΔ4-GAL4*, *UAS-NDUFS2i/TM3* (*TINcΔ4>NDUFS2i* a partir de ahora) de 3 y 14 días de edad. En primer lugar, se analizó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 2), uno de los principales indicadores de mal funcionamiento mitocondrial [137].

1.1 Medición de ROS en el corazón de *Drosophila melanogaster* interferido para *NDUFS2*

En los abdómenes diseccionados, se tiñen los corazones con dihidroetidio (DHE) (Figura 2 A-D) y Hoechst® (Figura 2 A'-D') para marcar, respectivamente, las especies reactivas de oxígeno y los núcleos de los cardiomiocitos (círculos blancos Figura 2). Los núcleos de los corazones de los animales adultos *TINcΔ4>NDUFS2i* (círculos blancos en Figura 2B' y 2D') son de igual tamaño que en el control *w¹¹¹⁸* (círculos blancos en Figura 2A' y 2C'). En animales jóvenes la intensidad de la fluorescencia emitida por los núcleos del control

w¹¹¹⁸ y los de la línea interferida para *NDUFS2* es similar (círculos blancos Figura 2A y 2B).

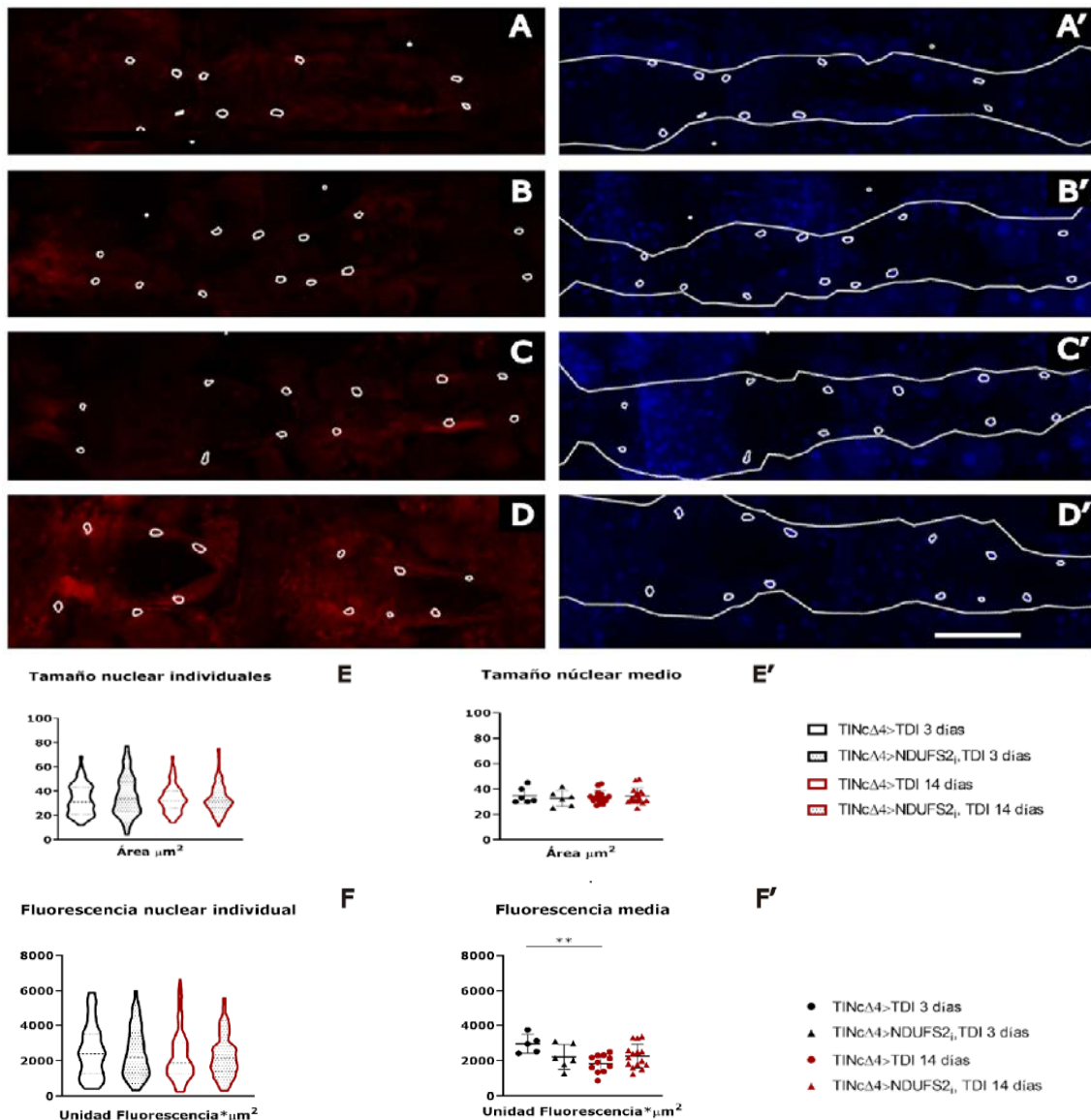


Figura 2. Los niveles de ROS son mínimamente alterados por la interferencia del gen *NDUFS2* en el corazón. Tinción histoquímica de cardiomiocitos de los segmentos A3 y A4 del abdomen de *Drosophila*. Los paneles (A), (B), (C) y (D) corresponden a la tinción con dihidroetidio de *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4>NDUFS2_i* jóvenes y *w¹¹¹⁸* y *TINcΔ4>NDUFS2_i* envejecidas, respectivamente; (A'), (B'), (C') y (D') muestran las tinciones de nucleares del mismo corazón. Las líneas blancas comprenden el área que cubre el corazón, mientras que las circunferencias son los núcleos visibles de los cardiomiocitos en los cuales se ha valorado la emisión de ROS. Los puntos blancos son el valor de fondo de fluorescencia que se resta a la medición de los núcleos. En (E) se muestra el área nuclear en micras cuadradas de todos los núcleos observados de cada línea, mientras que en (E') cada punto es la media de área de los núcleos de un ejemplar aislado. En las gráficas (F) y (F') se refleja la intensidad de fluorescencia de ROS por micra cuadrada del núcleo de todos los núcleos y la media de núcleos por ejemplar, respectivamente. Escala 75 μm . T-Student con **p-valor<0,005. N≥5.

La cuantificación de la señal muestra que ambos parámetros son ligeramente menores en los corazones interferidos, aunque las diferencias no son significativas (Figura 2 E y E' y F y F'). Las moscas envejecidas a 14 días interferidas para *NDUFS2* (Figura 2D) emiten más fluorescencia de media que su contraparte sana (Figura 2C), pero no se observan diferencias significativas en los niveles de fluorescencia emitida por DHE (Figura 2F').

Estos datos sugieren que la interferencia del gen *NDUFS2* específica de corazón tiene un impacto mínimo en la emisión de ROS en los cardiomiocitos.

Para verificar si existe un fenotipo cardíaco asociable a cardiopatía, se realizaron disecciones de abdomen de moscas adultas de las líneas *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4*, *TINcΔ4>NDUFS2_i* y *TINcΔ4>NDUFV2_i* de 2 semanas de edad. *NDUFV2* es otra proteína estructural del complejo I [44] cuya deficiencia causa cardiomiopatía y encefalopatía [138]. La interferencia cardio-específica de la expresión de *NDUFV2* se utilizó como control adicional para determinar si existe un fenotipo cardíaco. Se tiñeron los corazones con faloidina Fluor® Ph546, afín a los filamentos de actina, lo cual permite determinar la estructura y tamaño del corazón y sus fibras musculares (Figura 3).

1.2 Estructura cardiomiocitos *Drosophila melanogaster*

El corazón de las moscas adultas *TINcΔ4* (Figura 3B) es similar al control *w¹¹¹⁸* (Figura 3A). Las fibras musculares están bien organizadas y alineadas en los corazones de ambas líneas (Figura 3A' y 3B'). El corazón de los animales de 2 semanas de edad *TINcΔ4>NDUFS2_i* es sustancialmente más ancho (Figura 3C) comparado con los controles (Figura 3A y 3B), desde la cámara cónica (izquierda Figura 3C) a los últimos cardiomiocitos Figura 3C).

Las fibras musculares de los corazones interferidos (cuadrado amarillo Figura 3C) tienen un aspecto y organización similar a las moscas normales (cuadrado amarillo Figura 3A). Los cardiomiocitos son de mayor tamaño (Figura 3C') respecto a los corazones normales (Figura 3A'). El corazón de las moscas *TINcΔ4>NDUFV2_i* (Figura 3D) es de un tamaño similar al del control *w¹¹¹⁸* (Figura 3A), y sustancialmente más pequeño que el afectado por la interferencia de *NDUFS2* (Figura 3C). Los cardiomiocitos en los que se ha interferido *NDUFV2*

(Figura 3D') son de un tamaño similar a los controles (Figura 3A' y 3B'), aunque la desorganización de las fibras es mayor (cuadrado amarillo Figura 3D y Figura 3D'). La rotura que se aprecia en el cardiomiocito de las moscas *TINcΔ4>NDUFV2i* (Figura 3D') es un artefacto de la manipulación; no se observó en otros corazones de igual genotipo.

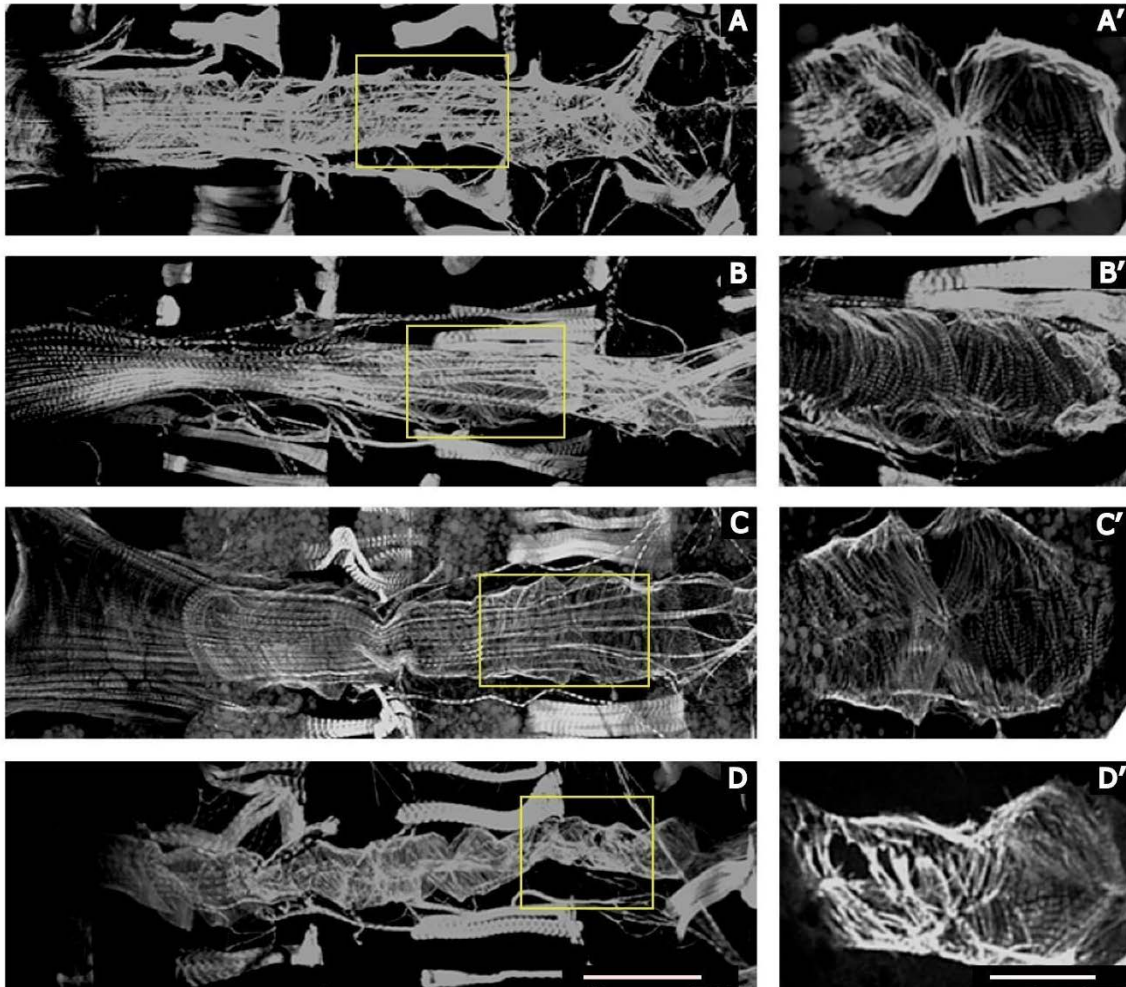


Figura 3. La supresión cardio-específica de *NDUFS2* provoca un aumento de tamaño de los cardiomiocitos, fenómeno que no ocurre al interferir otras proteínas del complejo I. En los paneles (A), (B), (C) y (D) se muestra la tinción inmunohistoquímica con tinción de AlexaFluor® Ph546 de las líneas *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4*, *TINcΔ4>NDUFS2i* y *TINcΔ4>NDUFV2i*, respectivamente. En las imágenes (A'), (B'), (C') y (D') se muestra una mayor magnificación de los últimos cardiomiocitos, enmarcado en amarillo, de los corazones de la izquierda en el mismo orden. Escala primera 125 μ m. Escala segunda 50 μ m. N=6.

Como se aprecia en la Figura 3, el corazón de las moscas interferido para *NDUFS2* es de mayor tamaño en todos los animales observados que en el control *w¹¹¹⁸* o el control *TINcΔ4*. Estos datos sugieren que la interferencia cardio-específica de *NDUFS2* cause una cardiomiopatía en *Drosophila melanogaster*.

Para verificar si efectivamente la interferencia de *NDUFS2* causa una cardiomiopatía en *Drosophila*, se miden el área y la sección de diferentes regiones del corazón de moscas adultas (Figuras 4 y 5); cambios en el tamaño del corazón y el grosor de sus paredes se correlaciona con un tipo de cardiopatía u otro [119].

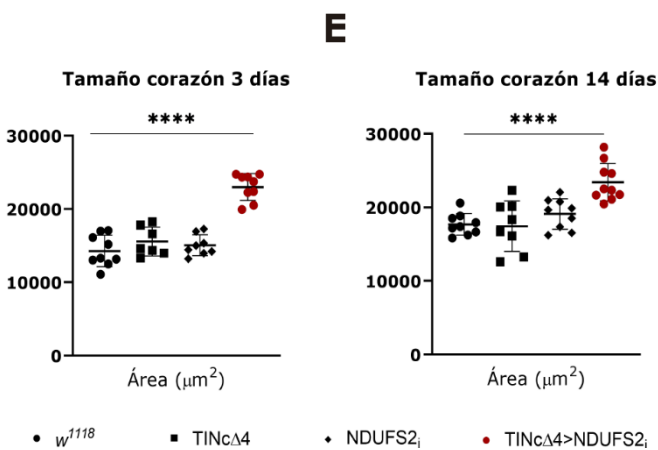
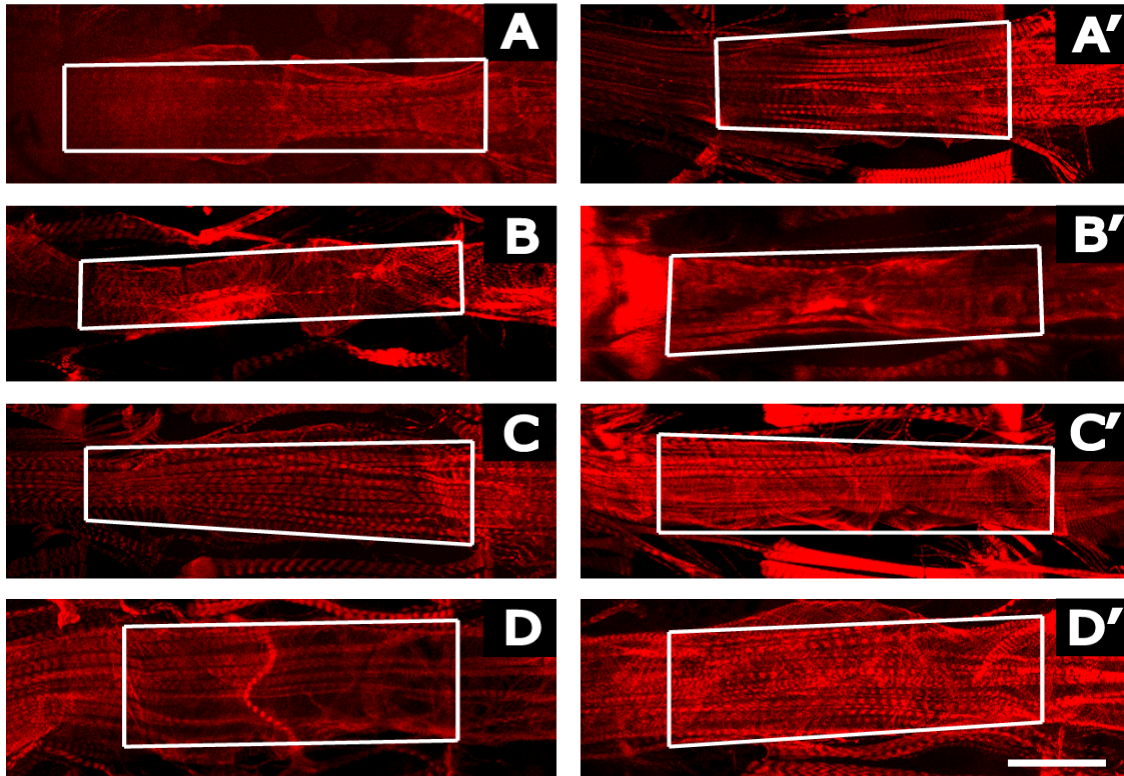
1.3 Medición dimensiones corazón *Drosophila melanogaster*

Se realizó una tinción de filamentos de actina con faloidina Alexa Fluor® 546 de las líneas *w¹¹¹⁸*, *UAS-NDUFS2_i*, *TINcΔ4* y *TINcΔ4>NDUFS2_i* en hembras adultas de 3 y 14 días de edad (Figura 4). Se midió el área que ocupa el corazón en el segmento A4 del abdomen (rectángulos blancos Figura 4), cuya estructura es más uniforme que otras regiones del corazón, lo que previene un sesgo del resultado.

El área ocupada por el corazón en el segmento A4 del control *w¹¹¹⁸* de 14 días (Figura 4A') es ligeramente más ancha que la de 3 días (Figura 4A). En la línea control *TINcΔ4*, las áreas ocupadas por el corazón a ambas edades (Figura 4B y 4B') no muestran diferencias significativas (Figura 4E y 4E'). Así mismo, el corazón del control *NDUFS2_i* a los 3 y 14 días (Figura 4C y 4C') es prácticamente idéntica al control *w¹¹¹⁸*.

El área ocupada por el corazón en el segmento A4 del corazón de moscas de 3 días afectadas por interferencia de *NDUFS2* (Figura 4D) es significativamente más ancha que el resto de las líneas (Figura 4A, 4B y 4C): el área es un 61% mayor (22998 contra 14270 μm^2) en las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* de 3 días respecto al control *w¹¹¹⁸* (Figura 4E).

Esta diferencia se conserva conforme el animal envejece, pues el área ocupada por el corazón en el segmento A4 en *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 4D') es más ancha y larga que en el resto de las líneas en animales de 14 días (Figura 4A', 4B' y 4C'): el área del corazón en los animales de 14 días con disfunción mitocondrial es un 32% superior (23408 frente a 17690 μm^2) (Figura 4E') a la ocupada en moscas *w¹¹¹⁸*.



E' Figura 4. La interferencia cardio-específica de *NDUFS2* causa un aumento del área que ocupa el corazón en el segmento A4. Fotografías de la inmunohistoquímica con tinción Alexa Fluor® 546 en corazón de moscas adultas (fibras longitudinales) en el segmento A4. (A), (B), (C) y (D) corresponden a las líneas *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4*, *UAS-NDUFS2* y *TINcΔ4>NDUFS2*; de 3 días de edad. Las fotografías (A'), (B'), (C') y (D') corresponden a la

misma secuencia de líneas de *Drosophila* envejecidas hasta los 14 días. Cada recuadro blanco corresponde al área medida que ocupa el corazón. En (E y E') se muestra el área ocupada por las fibras longitudinales en micras cuadradas (μm^2) en cada ejemplar de 3 (E) y 14 días de edad (E'). T-Student con **** p-valor<0,0001. N≥7. Escala 75 μm .

Estas mediciones del corazón en el segmento A4 del abdomen permiten confirmar que la interferencia cardio-específica de *NDUFS2* causa un aumento significativo del tamaño del corazón.

Estudios sobre el corazón de *Drosophila melanogaster* demuestran que se pueden clasificar las cardiopatías según el grosor de las paredes del corazón y el área del lumen [119]. Para terminar de confirmar que se trata de una cardiopatía y establecer un diagnóstico de qué tipo de cardiopatía es, se realiza

un marcaje restringido al tejido del corazón. Con este marcaje se cuantifica el grosor de las paredes y el área del lumen; para ello, se emplea la construcción transgénica *TDI*, ya que la tinción con faloidina Alexa[®] Fluor tiñe filamentos de actina del corazón y otros tejidos pudiendo dar un resultado poco claro.

El transgén *TDI* expresa, bajo el control de un módulo UAS, una GFP anclada en la membrana mitocondrial externa. Cuando se cruzan las líneas *TINcΔ4* y *TINcΔ4>NDUFS2_i* con la línea UAS-*TDI*, únicamente se observan las paredes del corazón marcadas por la expresión de GFP.

Para determinar el incremento de tamaño en distintas secciones del corazón, se mide el área de sus paredes en las proyecciones ortogonales de la cámara cónica y del último cardiomiocito (Figura 5). Se adquieren fotografías del corazón de moscas *TINcΔ4>TDI* y *TINcΔ4>TDI, NDUFS2_i* a 3 (Figura 5A y 5B) y a 14 (Figuras 5C y 5D) días de edad. Los corazones afectados por la disfunción mitocondrial (Figura 5B y 5D) son más anchos que el control (Figura 5A y 5C). Esta observación sugiere que la presencia de otro elemento UAS (*TDI*) no tiene efecto sobre la interferencia de *NDUFS2*.

Al realizar las proyecciones ortogonales (elipses blancas izquierda Figura 5) de la cámara cónica (Figura 5A', 5B', 5C' y 5D'), se observa que es claramente más grande en la línea interferida para *NDUFS2* en el corazón (Figura 5B' y 5D') que en los controles (Figura 5A' y 5C'). Sin embargo, el grosor de las paredes del corazón es similar en todos los animales a los 3 y a los 14 días de edad (Figura 5A', 5B', 5C' y 5D'). En las proyecciones ortogonales del último cardiomiocito del corazón (elipses blancas derecha Figura 5) el área del lumen y de las paredes del corazón es bastante mayor en las líneas *TINcΔ4>TDI, NDUFS2_i* (Figura 5B'' y 5D'') que el control (Figura 5A'' y 5C'') tanto a los 3 como los 14 días.

En los cardiomiocitos (Figura 5A'', 5B'', 5C'' y 5D'') no se hallan diferencias apreciables en el grosor de las paredes del corazón, tanto en animales de 3 como en los de 14 días. Para calcular el área de las paredes, se resta el área del lumen al área externa de las paredes del corazón. Tras dicha operación, se obtiene que en la proyección ortogonal de la cámara cónica de las moscas interferidas para *NDUFS2* (Figura 5B') el área es un 30% mayor (Figura 5E) que las moscas

control (Figura 5B') de 3 días y un 34% mayor cuando alcanzan los 14 días de edad (Figura 5E).

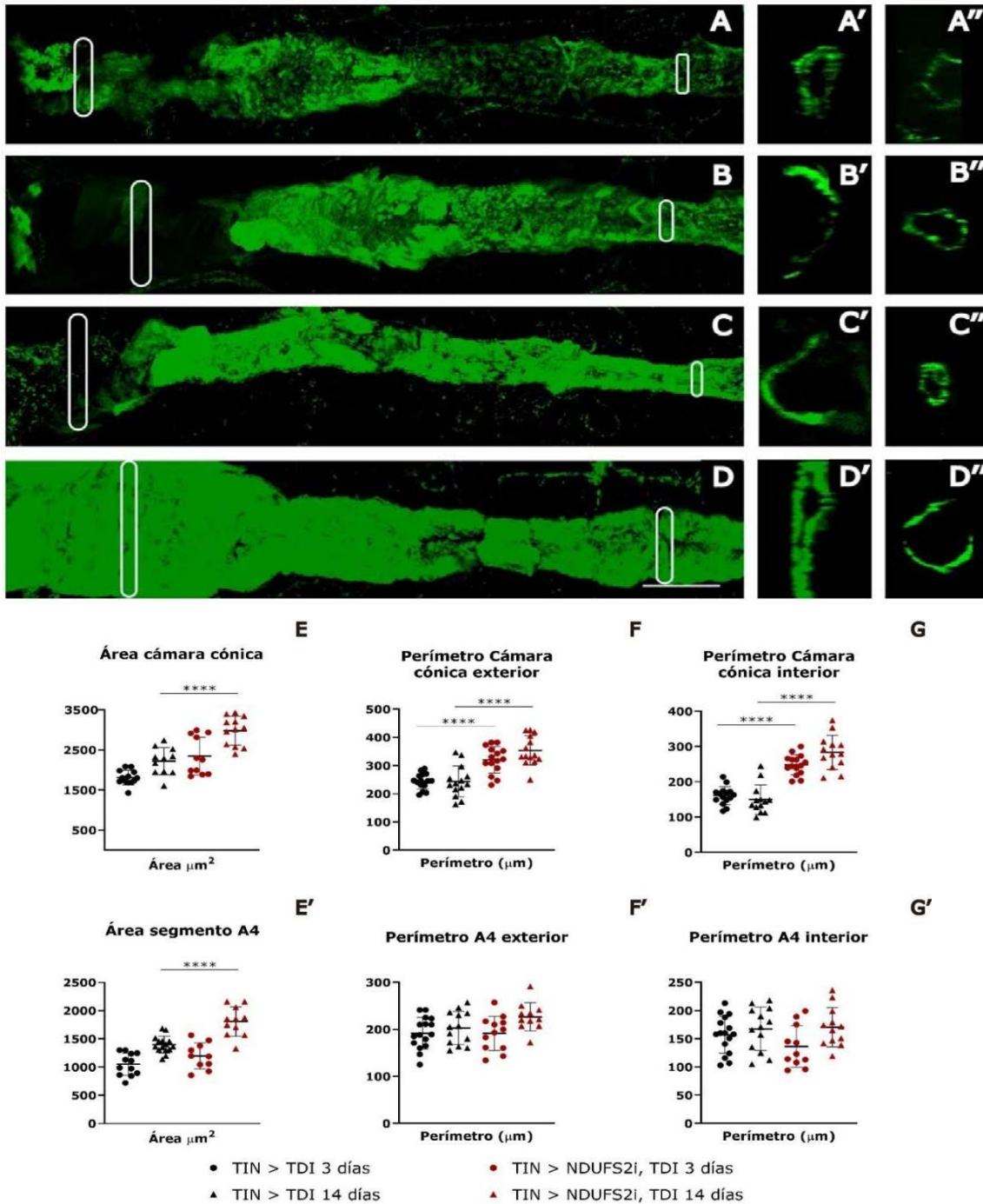


Figura 5. El aumento de tamaño de las paredes del corazón sin cardiopatía dilatada confirma que la interferencia cardio-específica de *NDUF52* causa una cardiopatía dilatada. Los paneles (A) y (B) muestran la proyección máxima de las líneas *TINcΔ4>TDI* y *TINcΔ4>TDI, NDUF52i*; de 3 días de edad. Las imágenes (C) y (D) corresponden a las líneas *TINcΔ4>TDI* y *TINcΔ4>TDI, NDUF52i*; con 14 días de edad. Las elipses blancas marcan la región escogida para hacer las proyecciones ortogonales de la cámara cónica (A', B', C', D') y del último cardiomiocito (A'', B'', C'', D''). N>10. Las gráficas (E) y (E') muestran el área en micras cuadradas de la proyección ortogonal de la cámara cónica y el cardiomiocito. Las gráficas (F) y (F') corresponden a la medición del perímetro en micras de la pared exterior del corazón en la cámara cónica y el cardiomiocito, respectivamente. (G) y (G') muestran la longitud en micras de los perímetros internos de las paredes del corazón en las mismas regiones. Escala 115 μ m. T-Student ****p-valor<0,0001.

Ambas diferencias son estadísticamente significativas (Figura 5E). Por otro lado, el área de las paredes del corazón en la proyección ortogonal del último cardiomiocito es un 14% superior en la mosca *TINcΔ4>TDI, NDUFS2_i* (Figura 5E') de 3 días. Cuando las moscas afectadas por la interferencia alcanzan los 14 días de edad, el área de las paredes del corazón en la región del último cardiomiocito (Figura 5D'') es un 33% mayor (Figura 5E'). Solamente la diferencia a los 14 días es estadísticamente significativa (Figura 5E'). Los perímetros, externo e interno (Figura 5B' y 5D'), de la cámara cónica de los corazones afectados por la disfunción mitocondrial son un 31% (Figura 5F) y 45% (Figura 5G) mayores que el control en animales de 3 y 14 días, respectivamente. Ambas diferencias de tamaño son estadísticamente significativas (Figuras 5F y 5G).

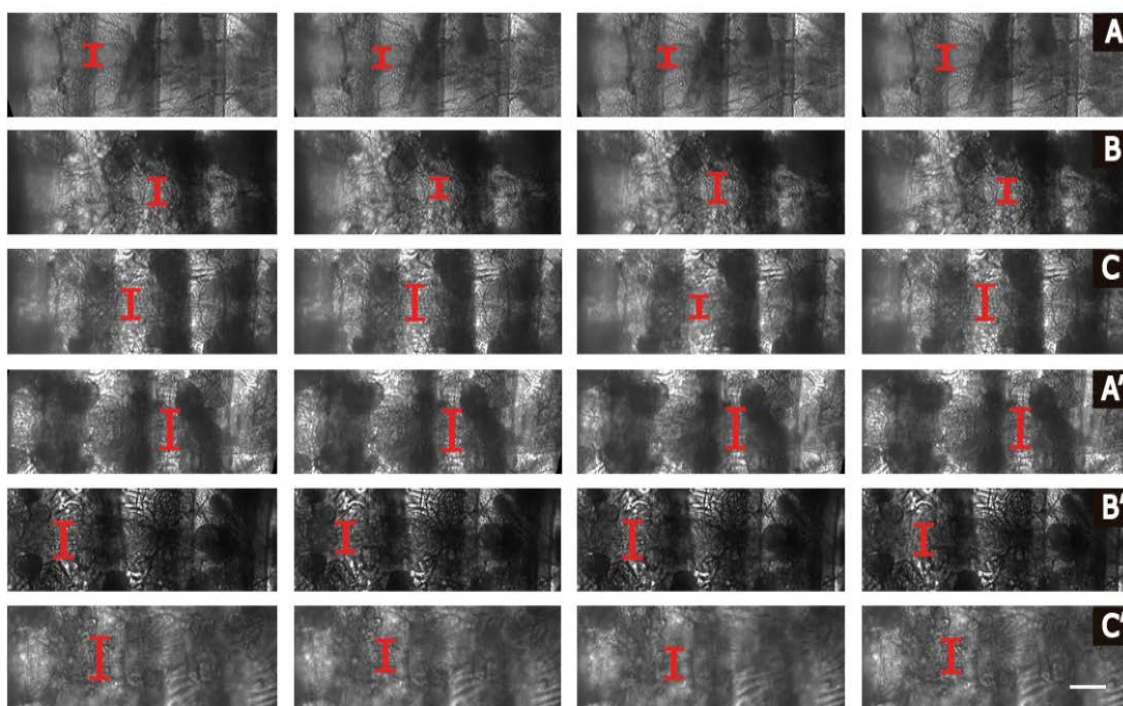
Se confirma que las paredes de los corazones en los que se ha interferido la expresión de *NDUFS2* poseen una sección de mayor tamaño, sin aumentar su grosor. Acorde con la modelización de las cardiopatías en *Drosophila* establecida por M. Wolf [119], estos datos permiten concluir que la interferencia de la expresión del gen *NDUFS2* en el corazón causa una cardiopatía dilatada.

Las cardiopatías están acompañadas de cambios en la frecuencia cardíaca, como arritmias o taquicardias [139]. Para verificar si la cardiopatía dilatada descrita está asociada a cambios en la frecuencia cardíaca, se contabilizan los latidos del corazón por minuto de moscas adultas *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4* y *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 6).

1.4 Cambios en fisiología cardíaca *Drosophila melanogaster*

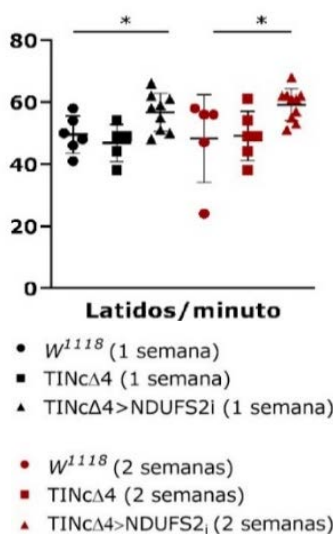
Se disecciona el abdomen de moscas de 3 y 14 días de edad y los corazones se incuban en una solución de hemolinfa artificial [117] que mantiene el corazón latiendo horas después de la disección. Los corazones recién diseccionados que siguen latiendo se fotografían a una velocidad de 2,97 fotogramas por segundo en microscopía de campo claro, en los que se observa la contracción y relajación de todo el corazón (Figura 6A, 6B, 6C, 6A', 6B' y 6C'). Tras recomponer todos los fotogramas de cada línea en un vídeo, se contabilizan los latidos cada minuto de los corazones (Figura 6D) de forma manual.

El corazón de las moscas de la línea *TINcΔ4>NDUFS2* presenta una alteración de la frecuencia cardíaca (Figura 6D). Los corazones de estos animales, a los 3 días de edad, laten a un ritmo de 57 pulsaciones por minuto frente a las 50 y 47 de las líneas *w¹¹¹⁸* y *TINcΔ4*, respectivamente (Figura 6D). En los animales envejecidos, los corazones afectados por la interferencia de *NDUFS2* laten a 60 pulsaciones cada minuto frente a las 48 y 49 de las líneas *w¹¹¹⁸* y *TINcΔ4*, respectivamente (parte derecha Figura 6D). Ambos incrementos de frecuencia cardíaca, en torno a un 20% en todos los casos, son estadísticamente significativos.



D Figura 6. La interferencia de *NDUFS2* en el corazón de *Drosophila* causa un incremento moderado del ritmo cardíaco en *Drosophila*.

Latidos corazón Cell Observer



Las fotografías muestran un corazón adulto completo de ejemplares cuyos genotipos son *w¹¹¹⁸* (A), *TINcΔ4* (B) y *TINcΔ4>NDUFS2* (C) de 3 días de edad. Los paneles (A', B', C') corresponden a ejemplares de las mismas líneas envejecidos hasta las 2 semanas. Los segmentos rojos muestran la anchura relativa del corazón durante un latido. Los cuatro fotogramas componen la secuencia de un único latido: comienzo de la contracción, contracción, comienzo de la relajación y relajación. La gráfica (D) muestra el número de latidos cada minuto de los genotipos mencionados. Escala 75 μm. N≥5. T-Student *p-valor<0,05.

Estos datos confirman que existe una aceleración del ritmo cardíaco que se mantiene conforme el animal envejece. Se concluye que la interferencia de *NDUFS2* en el corazón causa una cardiopatía dilatada con aceleración de la frecuencia cardíaca.

Para demostrar que esta cardiopatía dilatada con aceleración de la frecuencia cardíaca, al igual que la mayoría de las enfermedades cardiovasculares, tiene un impacto negativo en la esperanza de vida de los animales, se estudia la viabilidad de los animales en que se ha interferido la expresión de *NDUFS2*.

1.5 Análisis supervivencia en *Drosophila melanogaster*

Para analizar la viabilidad de las moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón, se realizan 4 curvas de supervivencia de 100 machos cada una de las líneas control w^{1118} y $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ (Figura 7).

Como se puede observar las curvas de Kaplan-Meier, tras realizar el análisis estadístico *logrank* Mantel-Cox [140] se confirma que la mortalidad es significativamente mayor en las moscas con el corazón interferido, incluso en animales con una semana de vida (Figura 7 - línea negra w^{1118} y línea roja $TINc\Delta4>NDUFS2_i$).

El T50, el tiempo en el que queda viva la mitad exacta de la población, de las moscas $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ es de 28 días de edad, mientras que el T50 de las moscas w^{1118} es de 52 días de edad (Figura 7 - 50%). Cuando se compara la evolución en el tiempo de ambas poblaciones, se observa que en un mes ha muerto un 64% de la población $TINc\Delta4>NDUFS2_i$, frente al 27% de las moscas w^{1118} (Figura 7 - 4 semanas). Por otra parte, también la longevidad está comprometida, pues la mosca $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ más longeva alcanza los 76 días de edad (Figura 7- último punto línea roja), mientras que la última mosca w^{1118} muere a los 92 días (Figura 7- último punto línea negra).

Para verificar cómo de grave es la letalidad causada por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón, se utiliza una estimación del riesgo de muerte llamada *Hazard ratio*, o cociente de riesgo. Es uno de los parámetros más utilizados en ensayos de supervivencia y análisis clínicos [141]. El *Hazard ratio* se calcula relativizando las diferencias de mortalidad entre las poblaciones en un tiempo

determinado debidas a un único parámetro como genotipo o fármacos. El *Hazard Ratio* Mantel-Cox promedio de las moscas adultas $TINc\Delta4 > NDUFS2_i$ es 3,17 (Intervalo Confianza 95% 2,74 a 3,68) respecto al control w^{1118} . Es decir, las moscas con interferencia de *NDUFS2* en el corazón tienen un 317% más probabilidades de morir en cualquier punto de su vida que los animales sanos.

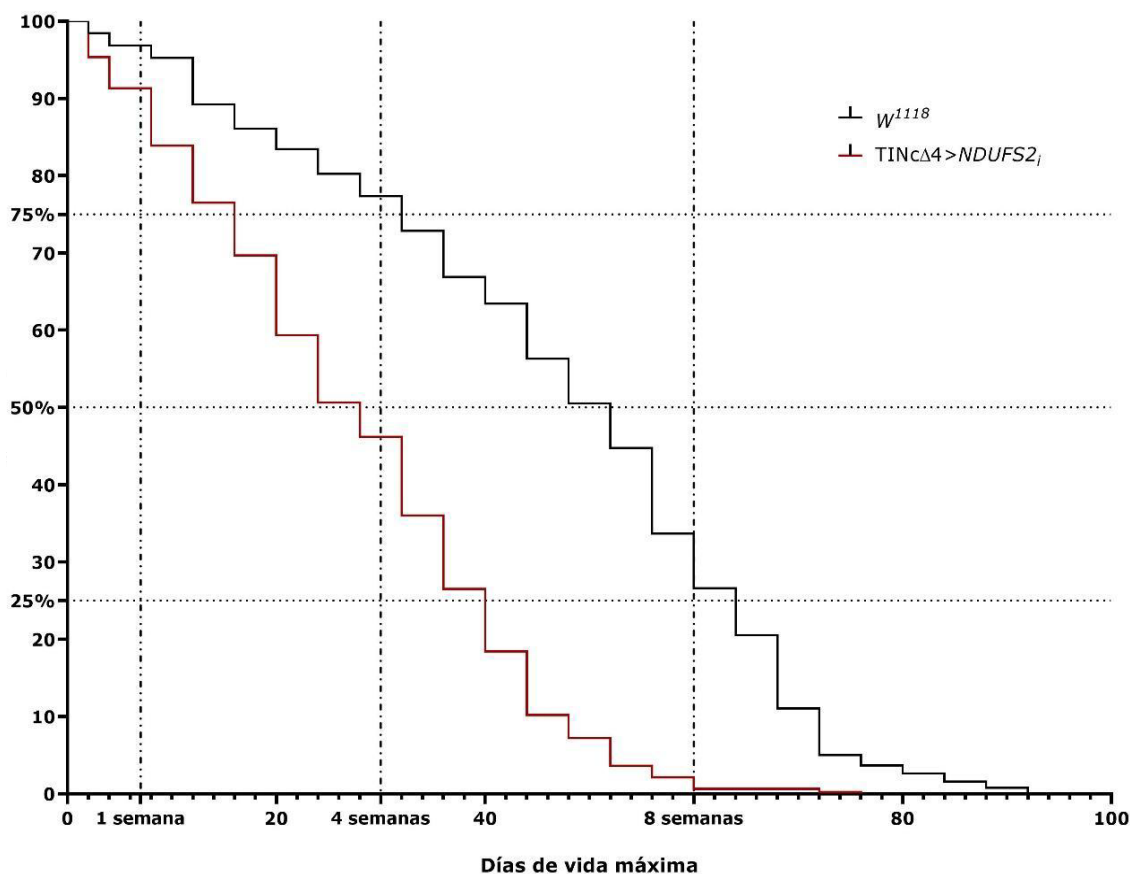


Figura 7. La interferencia cardio-específica de *NDUFS2* aumenta la mortalidad drásticamente a partir de la primera semana de vida. Se muestra el porcentaje de supervivencia relativo de cada genotipo en un intervalo de 3 meses (90 días aproximadamente). Las 3 líneas punteadas horizontales que marcan en qué día cada genotipo alcanzan el 75%, 50% y 25% de supervivencia de media. Las líneas semi-punteadas verticales marcan la proporción de moscas vivas a 1, 4 y 8 semanas. La línea negra comprende la evolución de las poblaciones w^{1118} y la línea roja $TINc\Delta4 > NDUFS2_i$. La diferencia entre curvas es estadísticamente significativa; prueba de Mantel-Cox (*logrank*) con ****p-valor<0,0001.

Estos datos confirman que la cardiopatía causada por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón tiene un impacto grave en la supervivencia de las moscas, al igual que la mayoría de las enfermedades cardiovasculares en humanos afecta negativamente a la esperanza de vida.

2. Respuestas adaptativas del tejido graso abdominal al daño cardíaco en *Drosophila melanogaster*

En la realización de los experimentos previos se observó una notable reducción en tamaño y cantidad del tejido graso abdominal recurrente en los abdómenes de todas las moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón. El tejido graso abdominal en *Drosophila melanogaster* está compuesto por los cuerpos grasos, que se disponen en la parte dorsal dentro del abdomen próximos a la cutícula (Figura 8).

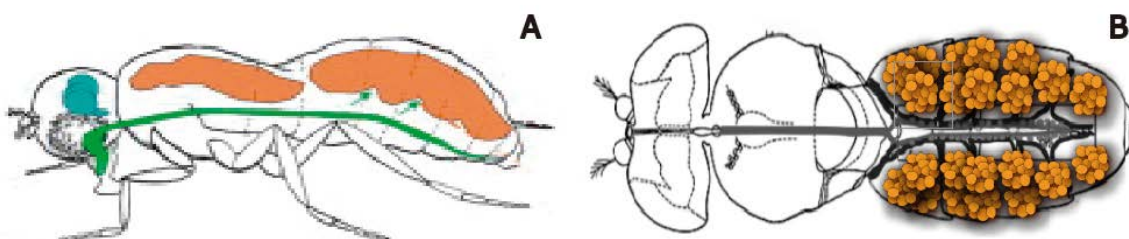


Figura 8. Vista lateral y ventral del tejido graso abdominal de *Drosophila melanogaster*. El tejido graso (en naranja) se halla tanto en el tórax como el abdomen de *Drosophila*, ocupando buena parte de la cavidad celomática (A), modificado de Barrio *et al.* 2014 [142]. El tejido graso abdominal está compuesto por los cuerpos grasos, cúmulos de adipocitos (en naranja), que almacenan lípidos y tienen un importante papel metabólico (B), modificado de Matthew.J J Wolf y Rockman 2011 [116].

Los cuerpos grasos son grandes grupos de adipocitos que almacenan glucógeno y gotas de lípidos y mantienen la homeostasis energética en el crecimiento de las fases larvarias y en la mosca adulta en periodos de escasez de comida [143] a través de reguladores del metabolismo como *Foxo* o la hormona adipocinética *Akh* [144].

Para verificar si la interferencia de *NDUFS2* en el corazón de *Drosophila* es o no responsable directa de la reducción del tejido graso abdominal, se procede a determinar primero los cambios en la morfología de los cuerpos grasos del abdomen de moscas adultas (Figura 9).

2.1 Análisis morfológico de los cuerpos grasos abdominales *Drosophila melanogaster*

Se diseccionan abdómenes de moscas adultas de dos semanas de los genotipos w^{1118} , *TINcΔ4*, *UAS-NDUFS2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i*. Se realizan fotografías en microscopía de campo claro del tejido graso abdominal (Figura 9A-D).

El tejido graso abdominal, de color blanco grisáceo (Figura 9), de las moscas w^{1118} (Figura 9A) es muy similar a los controles $TINc\Delta 4$ y $UAS-NDUFS2_i$ en cuanto a forma y contenido graso (Figura 9B y 9C). Los cuerpos grasos (cuadrados amarillos, Figura 9) de las moscas sanas y demás controles apenas son distinguibles unos de otros, debido a su gran tamaño y abundancia.

En las moscas $TINc\Delta 4 > NDUFS2_i$ el tejido graso abdominal es muy distinto a las líneas control (Figura 9D). Los cuerpos grasos son de menor tamaño, pudiéndose diferenciar unos de otros. Además, se distinguen grupos de adipocitos más reducidos que los controles (círculos amarillos Figura 9A-D). Se confirma que la interferencia de $NDUFS2$ en el corazón provoca una reducción en tamaño y abundancia de los cuerpos grasos. Dicha reducción de tamaño puede estar ligada a un menor contenido lipídico en los adipocitos.

Para verificar si los cuerpos grasos albergan menor contenido lipídico, se tiñen los abdómenes con rojo Nilo N1142[®] para localizar las gotas de lípidos de los adipocitos y Hoechst[®] para localizar los núcleos de cada adipocito. La tinción se realiza en moscas adultas de dos semanas de los genotipos w^{1118} , $TINc\Delta 4$, $UAS-NDUFS2_i$ y $TINc\Delta 4 > NDUFS2_i$ (Figura 9A'-D'). El tamaño y abundancia de las gotas lipídicas en las líneas w^{1118} , $UAS-NDUFS2_i$ y $TINc\Delta 4$ es similar.

En todas las líneas control las gotas lipídicas son de gran tamaño y apenas hay separación (Figura 9A', 9B' y 9C'); se aprecian en negro otras estructuras que no contienen lípidos como las tráqueas (líneas negras Figura 9A', 9B' y 9C'). Sin embargo, en las moscas $TINc\Delta 4 > NDUFS2_i$ las gotas de lípidos son mucho menos abundantes (Figura 9D), habiendo más huecos entre ellas dejando entrever la estructura del corazón y de la cutícula de la mosca justo debajo de los cuerpos grasos. Además, apenas hay gotas de lípidos de gran tamaño en los cuerpos grasos de moscas interferidas para $NDUFS2$, a diferencia de lo que ocurre en las moscas w^{1118} en las cuales hay tanto gotas grandes como minúsculas (Figura 9D').

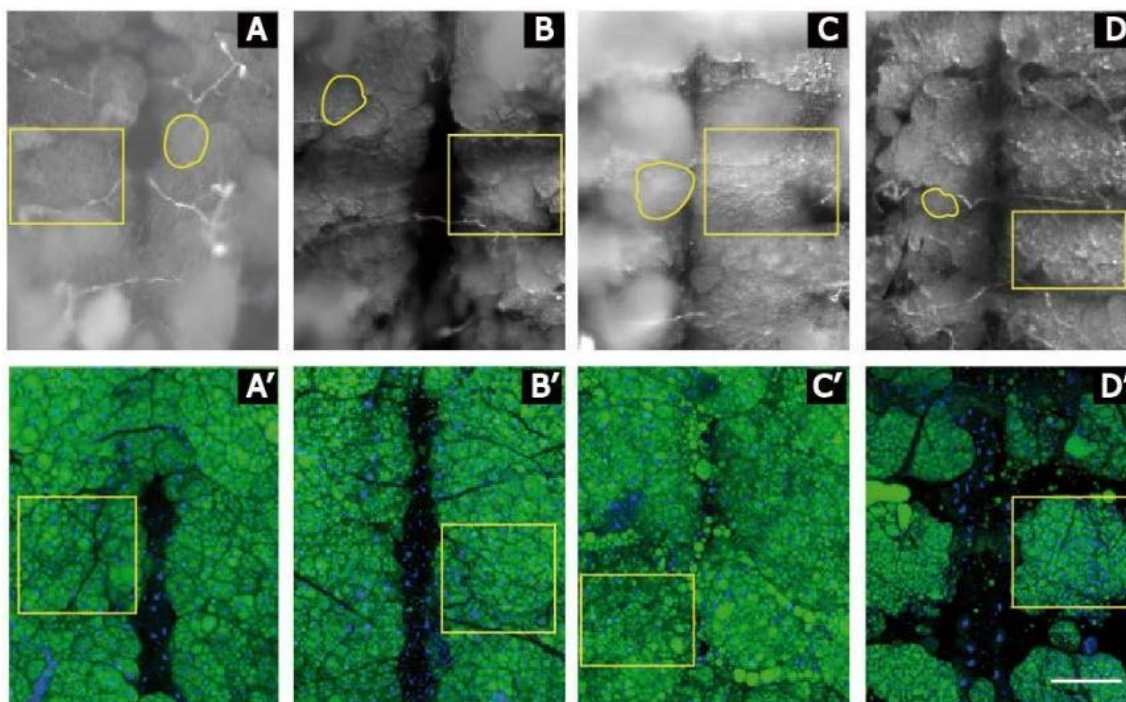


Figura 9. La pérdida de *NDUFS2* en el corazón, además de la cardiopatía dilatada, está asociada a una reducción fuerte del tamaño y contenido graso del tejido graso abdominal. Fotografías de los abdomenes expuestos de moscas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸* (A), *TINcΔ4* (B), *UAS-NDUFS2_i* (C) y *TINcΔ4>NDUFS2_i* (D) en campo claro o con tinción histoquímica de rojo Nilo® y Hoechst®. *w¹¹¹⁸* (A'), *TINcΔ4* (B'), *UAS-NDUFS2_i* (C') y *TINcΔ4>NDUFS2_i* (D'). Escala 100 μm. Cada cuadrado amarillo engloba lo que sería un único cuerpo graso. N=6.

Estas observaciones permiten establecer que la interferencia de expresión del gen *NDUFS2* en el corazón es causa, directa o indirecta, de una fuerte reducción de volumen del tejido graso abdominal en las moscas adultas.

Esta degeneración de los cuerpos grasos puede provenir de varios factores: un menor número de adipocitos en cada cuerpo graso, un menor volumen de los adipocitos o una sinergia entre ambas. Para verificar cuál de los procesos está ocurriendo en las moscas con *NDUFS2* interferido se mide el área del contorno celular de los adipocitos de un cuerpo graso por mosca adulta (Figura 10).

2.2 Medición área adipocitos *Drosophila melanogaster*

Para poder visualizar el área del contorno celular de los adipocitos se tiñe el abdomen de moscas de 2 semanas de edad de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4*, *UAS-NDUFS2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i* con falodina Alexa Fluor® 647, que permite marcar la actina cortical de los adipocitos, rojo Nilo N1142® para visualizar las gotas de lípidos almacenados y Hoechst®, afin al ADN de los núcleos (Figura 10A-D'). La tinción nuclear permite distinguir unos adipocitos de otros, ya que

son células uninucleadas. Se cuantifica el área de grupos de 12 adipocitos de un cuerpo graso por mosca; en cada cuerpo graso se hace la media de las áreas por cada línea de moscas.

Los adipocitos de las moscas *TINcΔ4* son similares a los de la línea *w¹¹¹⁸* en morfología y tamaño (Figura 10A y 10B). El área ocupada por cada adipocito (área celular) en ambos genotipos, tanto individual como el promedio por mosca, no muestra diferencias significativas. Ambas muestran una alta variabilidad con adipocitos cuya área apenas supera los 500 μm^2 y otros más de 1400 μm^2 (Figura 10E y 10E'). Los adipocitos de la línea *UAS-NDUFS2_i* presentan una morfología similar a las otras líneas control (Figura 10A, 10B y 10C), aunque el área celular es ligeramente inferior (Figura 10E y 10E').

En las moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón, los adipocitos (Figura 10D) son ínfimos en comparación con el resto de los genotipos analizados (Figura 10A, 10B y 10C). El tamaño de los adipocitos en estos animales es un 276%, 215% y 329% menor que el que presentan las líneas *TINcΔ4*, *UAS-NDUFS2_i* y *w¹¹¹⁸*, respectivamente (Figura 10E y 10E'). La variabilidad del área celular es mucho menor que en las moscas *w¹¹¹⁸*.

Los adipocitos de las moscas interferidas para *NDUFS2* no alcanzan el tamaño observado en las moscas *w¹¹¹⁸* (Figura 10E-E'), siendo los adipocitos más grandes del mismo tamaño que los más pequeños de las moscas *w¹¹¹⁸*. Estos adipocitos de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* apenas superan los 550 μm^2 de forma individual y los 480 μm^2 por cuerpo graso de media frente a los 2200 μm^2 y 1700 μm^2 de los animales sanos (Figura 10E, 10E'). Por otra parte, aunque su morfología sea similar al resto las gotas de lípidos (círculos verdes Figura 10A'-D') son mucho más pequeñas y hay más espacio entre ellas.

Estas mediciones no permiten confirmar que haya un mayor o menor número de adipocitos en cada cuerpo graso de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* comparados con el control, únicamente que son de menor tamaño, tienen un área 3 veces menor, y las gotas lipídicas en su interior, una de las principales moléculas energéticas en *Drosophila* [145], son menos abundantes y más reducidas.

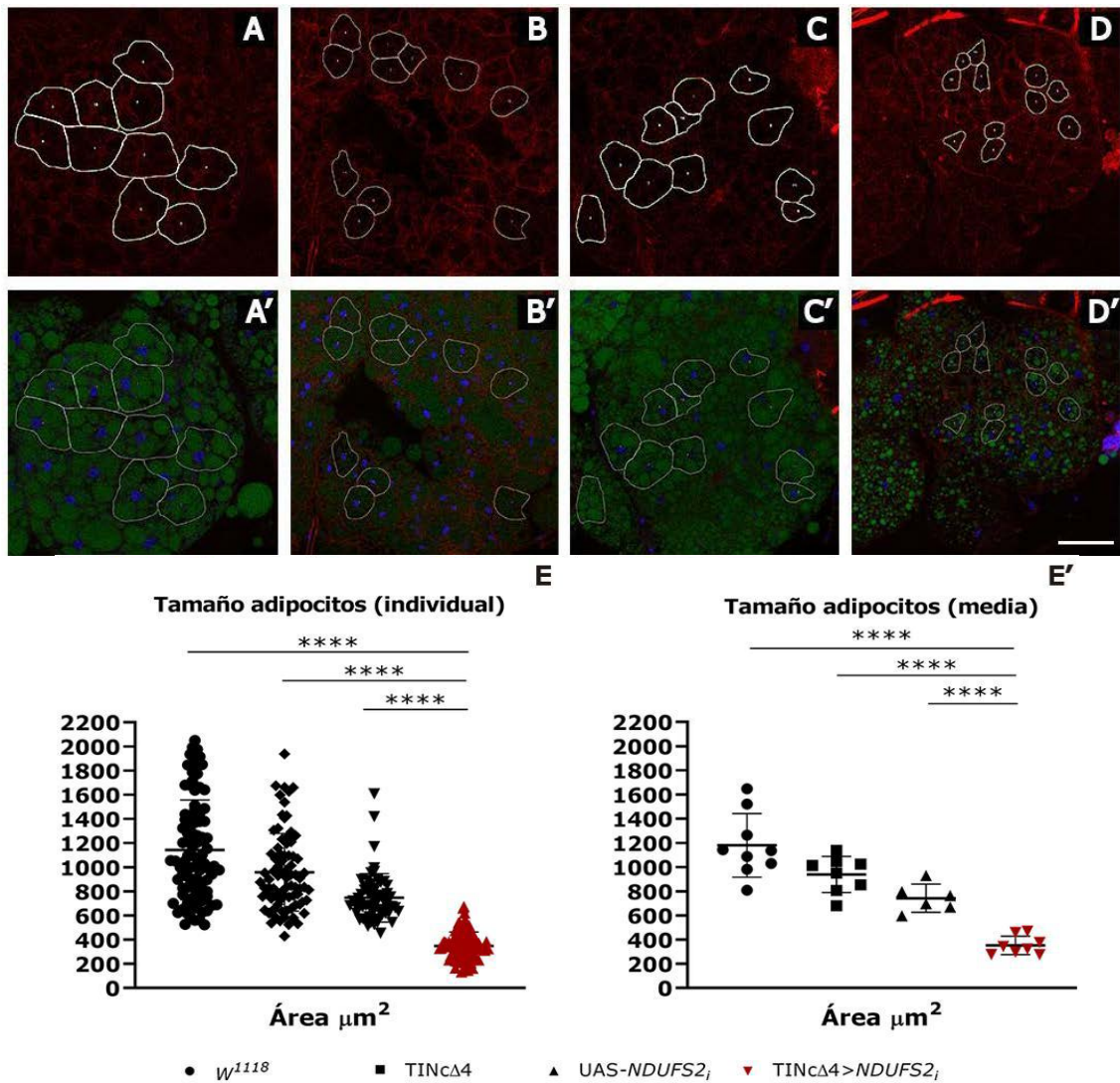


Figura 10. El área celular y contenido en lípidos de los adipocitos es mucho menor en los animales interferidos para *NDUFS2* de forma cardio-específica. Fotografías en microscopía confocal de un cuerpo grasoso de 14 días de edad de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4*, *UAS-NDUFS2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i*; teñidos con faloidina Alexa Fluor® 647 (rojo) (A, B, C y D). Idéntico plano de microscopía confocal incluyendo Hoechst® (azul) y rojo Nilo N1142® (verde) de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4*, *UAS-NDUFS2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i*; (A', B', C' y D'). Se muestran las mediciones del área celular en micras cuadradas (μm^2) de adipocitos de cada genotipo de forma individual (E) y la media de mediciones de cada mosca individual (E'). Escala 50 μm . N adipocitos individuales (E) ≥ 12 por mosca. N moscas (E') ≥ 6 . T-Student con ****p-valor < 0,0001.

La diferencia de tamaño en los adipocitos, junto con una menor capacidad de almacenamiento de lípidos, podría implicar que las reservas energéticas se movilizan de manera acelerada, impidiendo que el animal interferido para *NDUFS2* en el corazón logre almacenarlas al ritmo que lo puede hacer una mosca silvestre.

Para verificar si existen cambios en el ritmo de incorporación y movilización de reservas de lípidos en los adipocitos, se cuantifican los niveles de triglicéridos en

moscas enteras y en hemolinfa (Figura 11). La hemolinfa es el líquido circulante en artrópodos portador de nutrientes y de gran parte del sistema inmune, análogo a la sangre en mamíferos [146].

2.3 Valoración de los niveles glúcidos y lípidos en *Drosophila melanogaster*

La cuantificación de triglicéridos se hace en moscas enteras, en grupos de 6 de 3 y 14 días de edad (Figura 11A), y en hemolinfa, extraída de grupos de 120 moscas de 2 semanas (Figura 11A'), de los genotipos w^{1118} y $TINc\Delta4>NDUFS2_i$.

Los niveles de triglicéridos totales por decilitro (dL) son casi idénticos entre la línea sana y las moscas interferidas para $NDUFS2$, tanto a los 3 como a los 14 días de edad (Figura 11A). Sin embargo, los valores de triglicéridos en hemolinfa son un 1,55 veces mayores en los animales $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ (Figura 11A'). Los mayores niveles circulantes de triglicéridos reflejan la disminución en tamaño y abundancia de las gotas lipídicas de los adipocitos de los animales $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ (Figura 9 y 10). Pese a la mayor movilización de los lípidos, los valores totales de triglicéridos permanecen inalterados.

Estas observaciones podrían implicar que, además de los triglicéridos, se están metabolizando otras moléculas de reserva de los adipocitos. Además de lípidos, los adipocitos contienen glucógeno como sustancia de reserva, el cual es convertido al disacárido trehalosa para su utilización en otros tejidos [146].

Para comprobar si también se está movilizando glucógeno de las reservas de los adipocitos, se cuantifica el contenido en trehalosa en animales enteros, grupos de 6 moscas de 3 y 14 días de edad (Figura 11B), y de hemolinfa, extraída de grupos de 120 moscas de 2 semanas (Figura 11B'), de los genotipos w^{1118} y $TINc\Delta4>NDUFS2_i$. En moscas jóvenes, los niveles totales de glucosa en los animales interferidos para $NDUFS2$ en el corazón son ligeramente inferiores, un 21,4% menores (Figura 11B-3 días). Sin embargo, los niveles totales de trehalosa en animales de 2 semanas de edad son un 26% superiores $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ (Figura 11B- 2 semanas). En hemolinfa, las moscas $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ contienen un 34% más trehalosa por decilitro que la línea w^{1118} , diferencia muy superior a la cuantificación de los valores totales (Figura 11B').

Las diferencias observadas sugieren que la interferencia de *NDUFS2* en el corazón induce la movilización de reservas de glucógeno. Dicha movilización de glucógeno sería el motivo del aumento de glucosa circulante observado en hemolinfa.

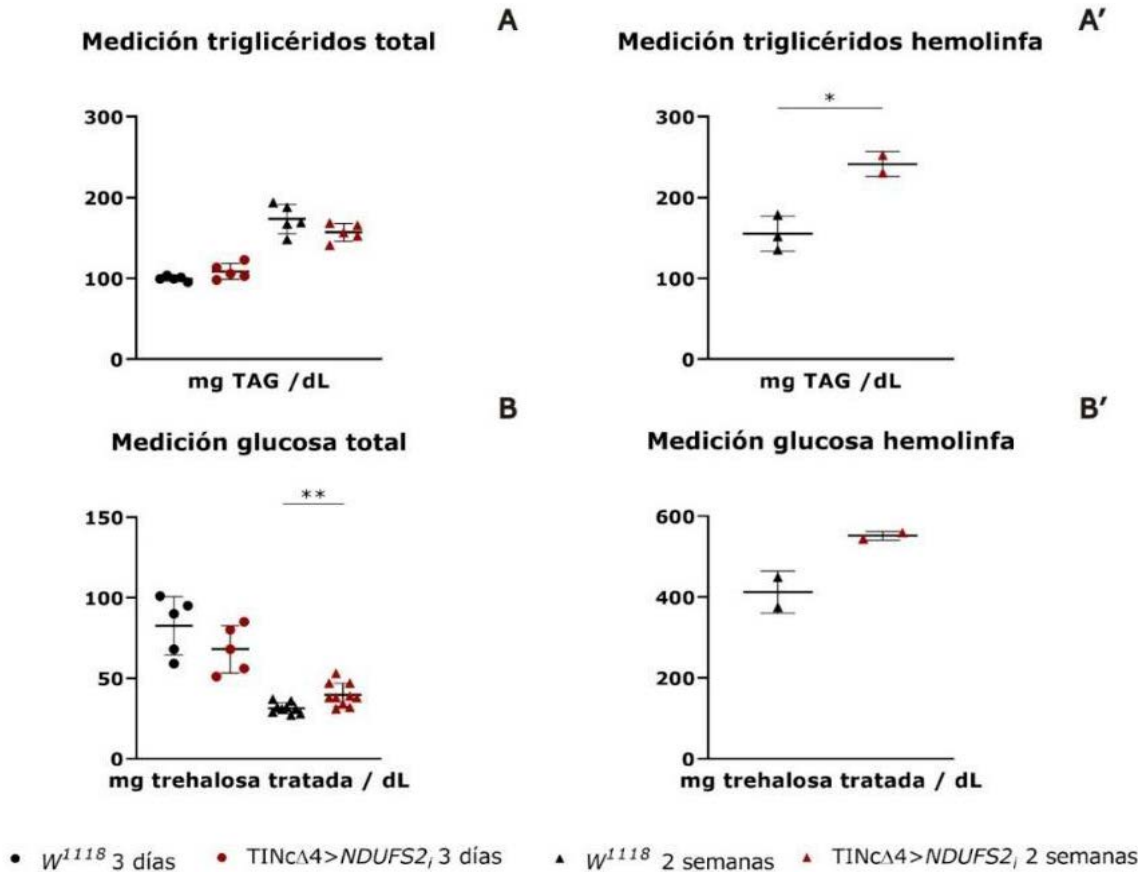


Figura 11. La interferencia de *NDUFS2* en el corazón de la mosca aumenta los niveles circulantes de trehalosa y triglicéridos. Se muestran los niveles de trehalosa y triglicéridos totales en miligramos por decilitro de solución para los genotipos *w¹¹¹⁸* y *TINcΔ4>NDUFS2*; (A, B) y en hemolinfa, miligramos por decilitro de hemolinfa, (A', B'). N (grupos de 6 moscas) ≥ 5 . N (grupos 120 moscas) ≥ 2 . T-Student **p-valor < 0,01 y *p-valor < 0,05.

Una disminución del tamaño de los adipocitos de más del 300%, junto con la degeneración de los cuerpos grasos y el aumento de movilización de las reservas de triglicéridos permiten concluir que la interferencia de *NDUFS2* en el corazón además de cardiopatía dilatada causa lipodistrofia.

Para determinar cuáles son los genes responsables de la degeneración del tejido graso abdominal se analiza la expresión de diferentes genes relacionados con el metabolismo en los cuerpos grasos y reguladores del metabolismo general mediante RT-qPCR.

Entre los genes analizados se incluye el propio *NDUFS2* con objeto de verificar si el promotor *TINcΔ4* o la secuencia *UAS-NDUFS2_i* pudieran tener actividad basal o fugas de expresión [147] en los adipocitos que pudiesen causar la degeneración de los cuerpos grasos por la pérdida de expresión de *NDUFS2* en los adipocitos (Figura 12).

2.4 Cribado genes responsables de la lipodistrofia en *Drosophila melanogaster*

Para analizar los niveles de expresión de los genes seleccionados se extrajo ARN de los cuerpos grasos a partir de 50 abdómenes diseccionados. Las moscas analizadas, de 2 semanas de edad, tenían los genotipos *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4* y *TINcΔ4>NDUFS2_i*. Los valores de expresión relativa se calculan vía sistema ΔCt .

El análisis de expresión de *p* en adipocitos de las moscas *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4* y *TINcΔ4>NDUFS2_i* no mostró diferencias significativas (Figura 12). Estos datos permiten concluir que la interferencia de *NDUFS2* se restringe al corazón.

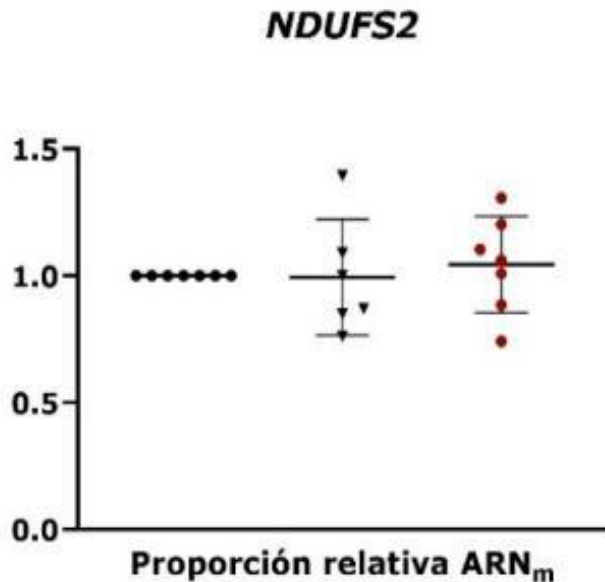


Figura 12. La expresión de *NDUFS2* en los cuerpos grasos en animales con la expresión de este gen interferida en el corazón es normal. Se muestra la expresión relativa del mensajero del gen *NDUFS2* en los genotipos *w¹¹¹⁸* ●, *TINcΔ4* ▼ y *TINcΔ4>NDUFS2_i* ● en animales de 2 semanas de edad. El cálculo de la expresión relativa se realizó tomando como referencia el gen *RPL10* (Proteína L10 de subunidad ribosómica 60S).

A continuación, se analiza la expresión de diferentes genes que tienen implicación en el metabolismo general, y en la movilización de lípidos y glúcidos para detectar aquel gen o conjunto de genes causantes de la lipodistrofia. En la Tabla 1 se resumen los genes analizados y su función:

Gen	Código	Función
<i>4E-BP</i>	CG8846	Regulador del metabolismo ante situación de estrés y crecimiento celular
<i>GM05240p</i>	CG6178	Sintasa de ácidos grasos-CoA mitocondrial
<i>ACoAOx</i>	CG17544	Deshidrogenasa mitocondrial de acetilCoA
<i>Akh</i>	CG1171	Hormona adipokinética, encargada de movilizar glicógeno y reservas de lípidos
<i>AkhR</i>	CG11325	Receptor de la hormona adipokinética, dispara la señalización catabólica
<i>dAMPKα</i>	CG3051	Sensor de niveles de energía celulares e inhibidor procesos de energía
<i>Brunner</i>	CG5295	Lipasa encargada de la homeostasis de triglicéridos y almacenaje de lípidos
<i>dHNF4</i>	CG9310	Estimula la secreción de <i>Ilp</i> , regula homeostasis de glucosa y apoya función mitocondrial
<i>dSesn</i>	CG11299	Sensor de estrés metabólico que reduce la expresión del complejo TOR, implicado en homeostasis metabólica
<i>dSREBP</i>	CG8522	Sensor que activa genes lipogénicos ante estrés metabólico
<i>Foxo</i>	CG3143	Factor de transcripción que regula la homeostasis energética y modula el sistema inmune
<i>Gapdh2</i>	CG8893	Deshidrogenasa encargada de la homeostasis de glucosa
<i>Glut1</i>	CG43946	Principal transportador de glucosa, muy abundante en adipocitos
<i>Ilp6</i>	CG14049	Péptido con función equiparable a IGF mamífero; regulador del almacenamiento de reservas en los cuerpos grasos
<i>ImpL2</i>	CG15009	Secuestrador de <i>Ilp</i> , y contribuye a secreción ecdisona en larva
<i>Lipasa</i>	CG5966	Lipasa que se expresa en multitud tejidos
<i>Mondo</i>	CG18362	Controla la expresión de genes dependientes de niveles de glúcidos y fomenta lipogénesis; su <i>knockout</i> provoca atrofia muscular
<i>Pfk</i>	CG4001	Fosfofructokinasa que interviene en glucólisis y regulación de niveles de glúcidos
<i>RpL10</i>	CG17521	Proteína L10 de subunidad ribosómica 60S

Tabla 1. Los genes analizados están directa e indirectamente implicados en homeostasis del metabolismo general y la regulación de los niveles de lípidos y glucosa. Se resumen los genes analizados en las columnas “Gen” (nombre común en *Drosophila*), “Código” (Nombre del gen en anotaciones ID con siglas CG [126,127]) y “Función” (el rol del gen en *Drosophila melanogaster*).

Para el análisis de expresión génica de los genes implicados en el metabolismo en los cuerpos grasos y reguladores del metabolismo general en se realiza se purificó ARN de 50 abdómenes de moscas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4* y *TINcΔ4>NDUFS2_i*. Las únicas diferencias significativas de expresión entre los animales *w¹¹¹⁸* y *TINcΔ4>NDUFS2_i* detectadas en el análisis implican a los genes *4E-BP*, *AkhR*, *Foxo*, *Ilp6*, *ImpL2* y la lipasa *CG5966*. En el abdomen de las moscas interferidas para *NDUFS2*, los niveles de expresión de *4E-BP*, *AkhR* e *ImpL2* son 0,77, 0,34 y 0,19 respecto al control *w¹¹¹⁸*. Por otro lado, la expresión de los genes *Foxo* e *Ilp6* está aumentada en el abdomen de la línea *TINcΔ4>NDUFS2_i* 1,32 y 2,49 veces, respectivamente (Tabla 2).

Gen	$w^{1118}:TINc\Delta4>NDUFS2_i$	$w^{1118}:TINc\Delta4$	$TINc\Delta4:TINc\Delta4>NDUFS2_i$
<i>4E-BP</i>	1:0,772 ± 0,09126*	1:1,344 ± 0,2070	1,344:0,772 ± 0,2703
<i>AkhR</i>	1:0,341 ± 0,03472****	1:2,196 ± 0,3037**	2,196:0,341 ± 0,3594***
<i>Foxo</i>	1:1,324 ± 0,06765***	1:1,178 ± 0,1273	1,178:1,324 ± 0,1466
<i>Ilp6</i>	1:2,489 ± 0,5255*	1:2,857 ± 0,2134****	2,857:2,489 ± 0,5671
<i>ImpL2</i>	1:0,191 ± 0,08882****	1:1,931 ± 0,4855	1,931:0,191 ± 0,4948**

Tabla 2. Los genes cuya expresión más varía respecto al control w^{1118} tienen una implicación directa en la regulación del metabolismo lipídico. Se comparan las diferencias de expresión significativas de los genes analizados (Tabla 1) indicando la relación entre medias y el error estándar de la diferencia de medias en animales de 2 semanas de edad de los genotipos w^{1118} , $TINc\Delta4$ y $TINc\Delta4>NDUFS2_i$. N≥4. T-Student ****p-valor<0,0001, ***p-valor<0,001, **p-valor<0,01 y *p-valor<0,05.

Foxo es un factor de transcripción presente en multitud de tejidos, eje principal en la regulación y homeostasis energética del animal junto con el complejo *dTORC1* [148]. El aumento de expresión de *Foxo* en las moscas interferidas para *NDUFS2* (Tabla 2 - *Foxo*) podría ser la causa principal de la movilización de los lípidos de los cuerpos grasos.

Foxo fomenta la inhibición de rutas anabólicas en condiciones de estrés mediado por la vía de la insulina [149] a través de intermediarios como *4E-BP* [150], lo que podría explicar su cambio de expresión (Tabla 2 - *4E-BP*).

El receptor de la hormona adipokinética, *AkhR*, es un receptor de membrana muy abundante en los cuerpos grasos cuya deficiencia está ligada a una sobreacumulación de gotas lipídicas en los cuerpos grasos [145].

El fenotipo observado en las moscas afectadas por la interferencia de *NDUFS2* es la reducción del volumen de tejido graso aún con la expresión de *AkhR* disminuida (Tabla 2- *AkhR*), lo que descarta a *AkhR* como responsable directo de la degeneración de los cuerpos grasos.

Uno de los coordinadores principales de la ruta de la insulina, en *Drosophila melanogaster*, es la proteína *ImpL2* cuya función principal en el adulto es secuestrar los péptidos de insulina (*Ilp*) e inhibir su actividad [125]. De ese modo,

ImpL2 es capaz de modular el crecimiento y la absorción de nutrientes en multitud de tejidos. Es una molécula que se secreta desde varios puntos en el cuerpo de la mosca [151]. Uno de esos puntos de expresión es el sistema circulatorio [FBgn0001257-126,127], que comprende corazón, aorta y otros tipos celulares.

El regulador de los péptidos de insulina, *ImpL2*, tiene una expresión muy reducida (la abundancia de ARN mensajero es un 80% menor) en los cuerpos grasos de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* respecto al control. No se ha descrito en la bibliografía su expresión en adipocitos, estas observaciones podrían implicar que *ImpL2* esté actuando sobre los cuerpos grasos desde el corazón u otros órganos, bloqueando la señalización de los péptidos de insulina y promoviendo la movilización de reservas de triglicéridos y trehalosa.

3. Caracterización de *ImpL2* como causante de la lipodistrofia consecuencia de la interferencia cardio-específica de *NDUFS2* en *Drosophila melanogaster*

Para verificar si *ImpL2*, secretado desde el corazón, fuera el responsable de la degeneración del tejido graso abdominal, se procede a caracterizar los efectos provocados por su supresión, interferencia y sobreexpresión en el corazón.

Para ello, se emplean las construcciones *UAS-ImpL2* y *UAS-ImpL2_i*, las cuales constituyen el ARN mensajero y ARN interferente del gen *ImpL2*, respectivamente. Además, se emplea el mutante nulo de *ImpL2* Def20 [FBal0249379-125–127], *ImpL2^{-/-}* a partir de ahora, una deleción de gran parte de la región codificante de *ImpL2*, que no parece afectar negativamente en el crecimiento de las moscas [131].

Las líneas *UAS-ImpL2*, *UAS-ImpL2_i* y *ImpL2^{-/-}* se cruzan con el controlador *TINcΔ4* (Figura 13), obteniendo líneas estables que permiten analizar el fenotipo de los cuerpos grasos en un contexto de interferencia de *NDUFS2* en el corazón.

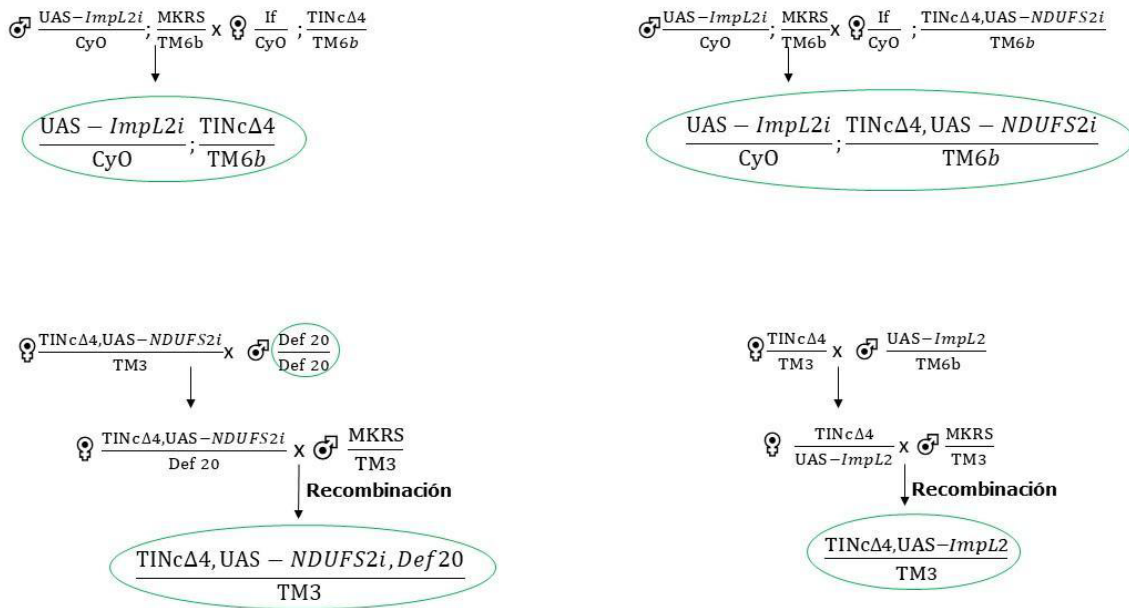


Figura 13. Resumen de los cruces empleados de las líneas *NDUFS2i*, *TINcΔ4* e *Impl2*. Se fuerzan eventos de recombinación con los que se obtienen (en verde) las líneas que portan la interferencia en el corazón de *Impl2* (*TINcΔ4>Impl2i*), la mutación nula para *Impl2* (*Def20/Def20- Impl2^{-/-}*), la sobreexpresión de *Impl2* (*TINcΔ4>Impl2*), la interferencia conjunta *Impl2* y *NDUFS2* (*TINcΔ4>Impl2i, NDUFS2i*) y la interferencia de *NDUFS2* junto con la mutación en *Impl2* (*TINcΔ4>NDUFS2, Impl2^{-/-}*).

3.1 Análisis morfológico de los cuerpos grasos en *Drosophila melanogaster* en un contexto de expresión de *Impl2* alterada

Se diseccionan abdómenes de moscas adultas de dos semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *Impl2^{-/-}*, *TINcΔ4>Impl2*, *TINcΔ4>NDUFS2i*, *Impl2i* y *TINcΔ4>NDUFS2i, Impl2^{-/-}*. Se adquieren las fotografías en microscopio de campo claro (Figura 14A-14D), y en microscopio confocal de fluorescencia tras teñir los cuerpos grasos con Rojo Nilo N1142® y Hoechst® (Figura 14A'-D').

El tejido graso abdominal de las moscas *w¹¹¹⁸* (Figura 14A) es abundante, con cuerpos grasos voluminosos apenas distinguibles entre sí, cúmulos de adipocitos bien visibles (círculo amarillo Figura 14A) y gotas lipídicas numerosas sin huecos entre sí (Figura 14A'). El mutante nulo para *Impl2* (Figura 14B) luce el tejido graso abdominal muy similar a los animales *w¹¹¹⁸* (Figura 14A y 14B), con cuerpos grasos voluminosos y abundantes, apenas indistinguibles entre sí (cuadrado amarillo Figura 14B) y gotas de lípidos indiferenciables de las de las moscas *w¹¹¹⁸* (Figura 14A' y 14B').

Las moscas *TINcΔ4>ImpL2_i*, con *ImpL2* interferido en el corazón, presentan un fenotipo idéntico a las moscas *ImpL2^{-/-}* (datos no mostrados), demostrando que la pérdida de *ImpL2* en sí misma no tiene un efecto aparente en los cuerpos grasos.

Al contrario que la interferencia, la sobreexpresión de *ImpL2* en el corazón de la mosca provoca una reducción en tamaño de los cuerpos grasos, siendo estos más pequeños que los de las moscas *w¹¹¹⁸* (Figura 14C y 14A), y presentando gotas lipídicas ínfimas con muchos huecos entre ellas (Figura 14C').

Cuando se comparan la morfología y contenido graso de los cuerpos grasos de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 8D y 8D') y *TINcΔ4>ImpL2* (Figura 14C y 14C'), estos son casi idénticos en tamaño y apariencia. El aumento de la expresión de *ImpL2* en el corazón causa una degeneración similar a la causada por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón y apoya fuertemente la hipótesis de que la interferencia de *NDUFS2* en el corazón promueve la sobreexpresión de *ImpL2*, lo que induce la degeneración de los cuerpos grasos.

Para corroborar que es la sobreexpresión de *ImpL2* en el corazón la verdadera responsable de la reducción del tejido graso abdominal, se analiza la morfología y contenido graso del tejido graso abdominal de moscas con expresión de *ImpL2* suprimida o interferida en un fondo genético *NDUFS2_i; TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}*.

Los cuerpos grasos de las moscas con *ImpL2* interferido (Figura 14D) son similares en morfología a aquellos de moscas *w¹¹¹⁸* (Figura 14A), aunque no llegan a alcanzar el mismo tamaño. Las moscas con interferencia de *NDUFS2* sobre un fondo mutante para *ImpL2* (Figura 14E) tienen cuerpos grasos casi iguales a los de las moscas sanas, y ligeramente mayores en tamaño que en los animales *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2_i*. En ambas líneas de moscas, *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}* hay gran abundancia de gotas lipídicas en los adipocitos (Figura 14D' y 14E').

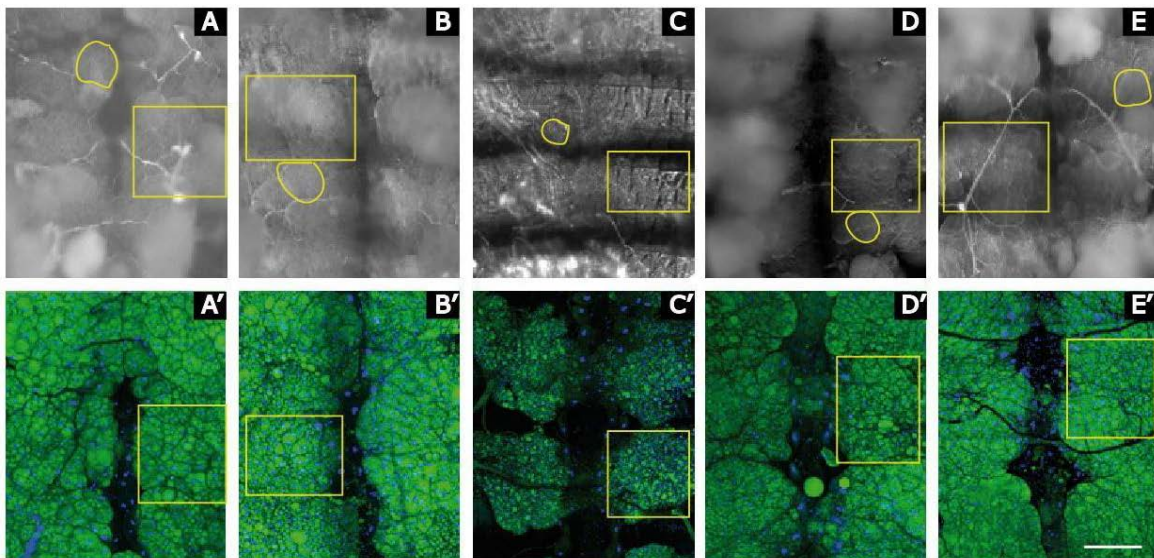


Figura 14. La sobreexpresión de *ImpL2* en el corazón induce la degeneración de los cuerpos grasos mientras que la supresión de *ImpL2* rescata a los cuerpos grasos de la degeneración originada por la interferencia de *NDUFS2*. Abdomenes de moscas de 2 semanas de los genotipos w^{1118} . (A) *ImpL2*^{-/-} (B), *TINcΔ4>ImpL2* (C), *TINcΔ4>NDUFS2i, ImpL2i* (D) y *TINcΔ4>NDUFS2i, ImpL2*^{-/-} (E) fotografiados con microscopía de campo claro. Abdomenes teñidos con rojo Nilo® y Hoechst® de idénticos genotipos fotografiados con microscopía confocal (A'-E'). Cuadrados amarillos indican la ubicación de un cuerpo graso, y las líneas amarillas un cúmulo de adipocitos. Escala 100 μ m. N=6.

Estos datos demuestran que el fenotipo de degeneración de los cuerpos grasos, originado inicialmente por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón, se debe a la sobreexpresión de *ImpL2* desde el corazón. Suprimiendo la expresión de *ImpL2* en el corazón el fenotipo de los cuerpos grasos revierte a una situación similar a la de los cuerpos grasos de moscas w^{1118} , aunque en diferente medida si *ImpL2* está mutado o solamente interferido.

Esta diferencia en el fenotipo de los cuerpos grasos podría deberse a que en las moscas mutantes *ImpL2* la delección afecta a todos los tejidos, mientras que la interferencia solamente funciona en el corazón. Además, este sistema de interferencia basado en el tándem GAL4-UAS reduce la expresión del gen sin eliminarlo completamente [147], mientras que la delección *Def20* da lugar a un mutante sin función del gen *ImpL2* [131].

Para determinar cómo de eficaz es la reversión de los cuerpos grasos a un fenotipo similar al silvestre causada por el mutante de *ImpL2* frente a la interferencia, siempre en un fondo interferente para *NDUFS2* en el corazón, se procede a cuantificar las diferencias en tamaño de los adipocitos de cuerpos grasos de moscas adultas de 2 semanas de edad (Figura 15).

3.2 Medición área adipocitos *Drosophila melanogaster* en un contexto modificado para *ImpL2*

La cuantificación del área se hace de grupos de 12 adipocitos por mosca, cuyo contorno celular se tiñe con faloidina Alexa Fluor® 647, Hoechst® y rojo Nilo N1142®. Las líneas de moscas corresponden a los genotipos w^{1118} , $ImpL2^{-/-}$, $TINc\Delta4>ImpL2$, $TINc\Delta4>NDUFS2_i$, $ImpL2_i$ y $TINc\Delta4>NUDFS2_i$, $ImpL2^{-/-}$ (Figura 15A-D').

Las moscas w^{1118} tienen adipocitos de formas poligonales y grandes (Figura 15A), con gotas lipídicas de gran tamaño sin huecos entre sí (Figura 15A'). El tamaño de los adipocitos en las moscas w^{1118} es altamente variable, entre 500 y 2000 μm^2 (Figura 15F).

En las moscas mutantes $ImpL2^{-/-}$ (Figura 15B) se observa que los adipocitos tienen una morfología menos regular (Figura 15A y 15B), con gotas lipídicas igual de abundantes que el control w^{1118} (Figura 15A' y 15B'). El área celular de estos adipocitos oscila entre 400 y 1000 μm^2 (Figura 15F), siendo la media de tamaño inferior a las moscas w^{1118} (Figura 15F').

Al comparar los adipocitos de las moscas que sobreexpresan *ImpL2* (Figura 15C) frente a las moscas w^{1118} (Figura 15A y 15B), estos son minúsculos, pero conservan la forma poligonal, además de contener gotas de lípidos minúsculas (Figura 15C'). El valor de las áreas celulares de estos adipocitos oscila entre 140 y 600 μm^2 (Figura 15F), siendo 0.27 veces el tamaño de los adipocitos de la línea w^{1118} (Figura 15F').

La diferencia de tamaño de los adipocitos de las moscas $TINc\Delta4>NDUFS2_i$ (Figura 9E'), frente a la línea $TINc\Delta4>ImpL2$ (Figura 15F'), es inexistente lo que demuestra la similitud en el fenotipo del tejido graso abdominal y apoya aún más la hipótesis de *ImpL2* como causante de la atrofia de los adipocitos originada por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón.

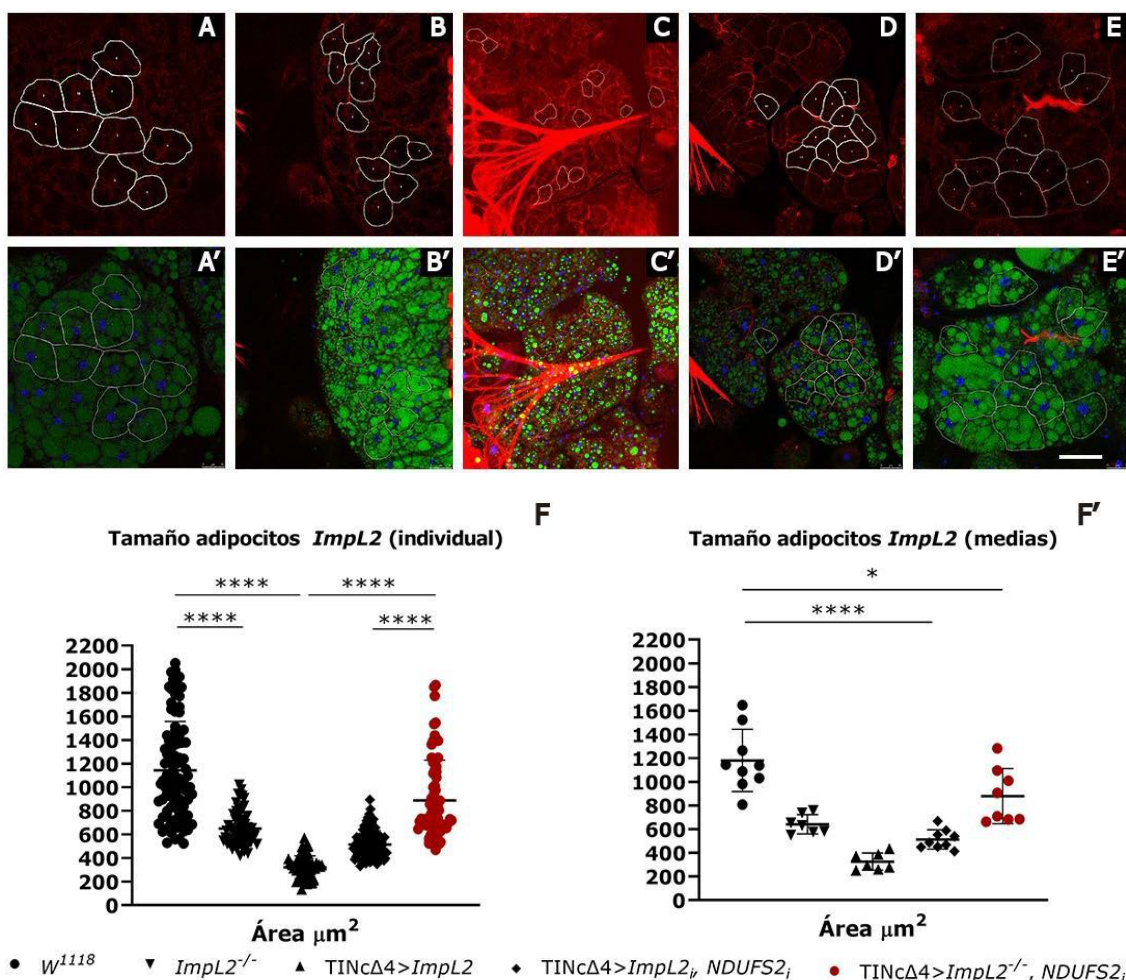


Figura 15. La interferencia de *ImpL2* en el corazón rescata parcialmente el fenotipo de degeneración del tejido graso abdominal, la supresión total de *ImpL2* rescata el fenotipo con mayor eficacia. Fotografías en microscopía confocal de un cuerpo graso de 14 días de edad de los genotipos w^{1118} , $ImpL2^{-/-}$, $TINc\Delta4 > ImpL2$, $TINc\Delta4 > NDUF52_i$, $ImpL2_i$ y $TINc\Delta4 > NDUF52_i$, $ImpL2^{-/-}$ teñidos con faloidina Alexa Fluor® 647 (rojo) (A, B, C, D y E). Idéntico plano de microscopía confocal incluyendo Hoechst® (azul) y rojo Nilo N1142® (verde) de los genotipos w^{1118} , $TINc\Delta4$, $UAS-NDUF52_i$ y $TINc\Delta4 > NDUF52_i$ (A', B', C', D' y E'). Se muestran las mediciones del área celular en micras cuadradas (μm^2) de adipocitos de cada genotipo de forma individual (E) y la media de mediciones de área de cada mosca individual (E'). Escala 50 μm . N adipocitos individuales (E) ≥ 12 por mosca. N moscas (E') ≥ 6 . T-Student con ****p-valor $< 0,0001$, *p-valor $< 0,05$.

En las moscas con *ImpL2* y *NDUF52* interferidos, los adipocitos, de formas regulares, son más pequeños que los de las moscas w^{1118} y similares a los observados en la línea $ImpL2^{-/-}$ (Figura 15A, 15B y 15D). Las gotas lipídicas de las moscas interferidas para *NDUF52* e *ImpL2* son similares tanto a las moscas w^{1118} como a las mutantes $ImpL2^{-/-}$ (Figura 15A', 15B' y 15D'). El área celular de los adipocitos en moscas $TINc\Delta4 > NDUF52_i$, $ImpL2_i$ oscila entre 300 y 900 μm^2 (Figura 15F'), casi iguales a los adipocitos de animales $ImpL2^{-/-}$. Este aumento de tamaño medio de los adipocitos frente al de animales $TINc\Delta4 > NDUF52_i$

(Figura 9E') se debe a la interferencia de *ImpL2* en el corazón, rescatando al animal de la degeneración de los cuerpos grasos.

El incremento de tamaño de los adipocitos es más acusado en las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}* frente a las *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2_i* (Figura 15D y 15E), casi equiparables a los adipocitos de los animales *w¹¹¹⁸* (Figura 15A) con una distribución de gotas de lípidos idénticas (Figura 15A' y 15E'). En la medición del área celular de los adipocitos de moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}*, éstos varían entre los 400 y los 1900 μm^2 (Figura 15F). Los adipocitos de la línea *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}* son un 1,73 veces más grandes que en moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2_i* (Figura 15F').

Sorprendentemente, esta oscilación de tamaño en la línea *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}* es más parecida a la observada en animales *w¹¹¹⁸* que en animales *ImpL2^{-/-}* (Figura 15F), con los que comparten la misma delección en *ImpL2*. Por un lado, esta diferencia de tamaño confirma que el rescate del fenotipo de los cuerpos grasos, causado por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón, es más eficaz al suprimir *ImpL2* por completo de todos los tejidos. Por otro lado, que el tamaño de los adipocitos de animales mutantes para *ImpL2* sea inferior al de las moscas *w¹¹¹⁸* parece implicar que eliminar este elemento de la regulación de la vía de la insulina en *Drosophila* podría ser negativo para la acumulación de lípidos en los cuerpos grasos. Sin embargo, es precisamente esa pérdida de función de *ImpL2* la que permite evitar una posible lipodistrofia en un contexto de enfermedad cardiovascular por deficiencia mitocondrial, como la observada en la interferencia de *NDUFS2* en el corazón de la mosca.

Las moscas con pérdida de función parcial o total para *NDUFS2* e *ImpL2* simultáneamente poseen un tejido graso más abundante que el de moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i*. En aquellos animales en los que la secreción de *ImpL2* del corazón solamente está reducida, el rescate del tejido graso abdominal es menos efectivo, mientras que en aquellos animales *ImpL2^{-/-}* el rescate es más eficaz, siendo equiparable la abundancia de los cuerpos grasos a aquellos de los animales *w¹¹¹⁸*. Esto apoya fuertemente la hipótesis de que *ImpL2* secretado desde el corazón es responsable de forzar la movilización de lípidos sanos en moscas afectadas por la interferencia de *NDUFS2*.

Trabajos previos demuestran que el aumento de expresión ubicua de *ImpL2* aumenta la esperanza de vida de *Drosophila melanogaster* [152].

Cabe la posibilidad de que el aumento de expresión de *ImpL2* desde el corazón provocado por la interferencia de *NDUFS2* sea un mecanismo de respuesta que consiga prolongar la esperanza de vida de los animales, aunque suponga perder las reservas de lípidos almacenadas en los cuerpos grasos.

Para verificar si la sobreexpresión de *ImpL2* tiene un efecto beneficioso sobre la esperanza de vida y la supervivencia de las moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón, se procede a estudiar su viabilidad (Figura 16).

3.3 Análisis supervivencia en *Drosophila melanogaster* en un contexto modificado para *ImpL2*

Para analizar la viabilidad de las moscas cuya expresión de *NDUFS2* e *ImpL2* en el corazón está alterada, se realizan curvas de supervivencia de 100 machos para cada una de las líneas w^{1118} , *ImpL2*^{-/-}, *TINcΔ4>ImpL2*, *TINcΔ4>NDUFS2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2*^{-/-} (Figura 16).

Como se puede observar las curvas de Kaplan-Meier, tras realizar el análisis estadístico *logrank* Mantel-Cox [140], la esperanza de vida de las moscas que sobreexpresan *ImpL2* en el corazón (línea punteada- Figura 16) o mutantes nulos para este gen (línea discontinua- Figura 16) es inferior a las moscas w^{1118} (línea negra- Figura 16).

El T50 es de 36 días en ambas líneas de moscas, frente a los 52 días en los animales w^{1118} (línea 50%-Figura 16). Además, las moscas que sobreexpresan *ImpL2* alcanzan los 68 días de edad mientras que las mutantes llegan a los 72 días, inferior en todo caso a los 92 días de longevidad de los animales w^{1118} .

La diferencia es aún mayor en los animales interferidos para *NDUFS2* y mutantes para *ImpL2*. La mortalidad de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2*^{-/-} (Línea roja discontinua- Figura 16) es muy superior a la de las moscas w^{1118} (Línea negra- Figura 16) e incluso a las moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón (Línea roja- Figura 16).

El T50 de los animales interferentes para *NDUFS2* y mutantes para *ImpL2* es de 24 días, mientras que es de 28 días para las moscas con la interferencia de *NDUFS2* en el corazón (línea horizontal 50%- Figura 16) y de 52 días para las moscas *w¹¹¹⁸* (50%- Figura 16). Las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* alcanzan a vivir 76 días, frente a los 68 de los animales *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}*.

Cabe destacar que en la primera semana de vida de los animales que expresan el interferente contra *NDUFS2* y mutantes para *ImpL2*, muere más de un 25% de la población, mientras que solamente muere el 10% de los animales *TINcΔ4>NDUFS2_i* y el 4% de las moscas *w¹¹¹⁸* (línea vertical 1 semana- Figura 16).

Para poder inferir la diferencia de la letalidad que supone suprimir *ImpL2* en los animales con la expresión de *NDUFS2* *interferida* en el corazón, se calcula el *Hazard Ratio* de las líneas *w¹¹¹⁸*, *ImpL2^{-/-}*, *TINcΔ4>ImpL2*, *TINcΔ4>NDUFS2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}*.

Siendo el *Hazard Ratio* para la línea *w¹¹¹⁸* un 100%, el de las moscas de las líneas *ImpL2^{-/-}* y *TINcΔ4>ImpL2* es un 210% y 230%, respectivamente. Es decir, sobreexpresar *ImpL2* en el corazón, o eliminarlo completamente en el organismo de *Drosophila melanogaster* parece tener un impacto negativo en la supervivencia.

Esta diferencia se vuelve más drástica en un fondo genético de interferencia de *NDUFS2*. El *Hazard Ratio* de los animales *TINcΔ4>NDUFS2_i* es del 316%, mientras que el de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}* es del 459%. Esto implica que, por cada mosca *w¹¹¹⁸* muerta, mueren 5 moscas por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón en un fondo genético mutante para *ImpL2*.

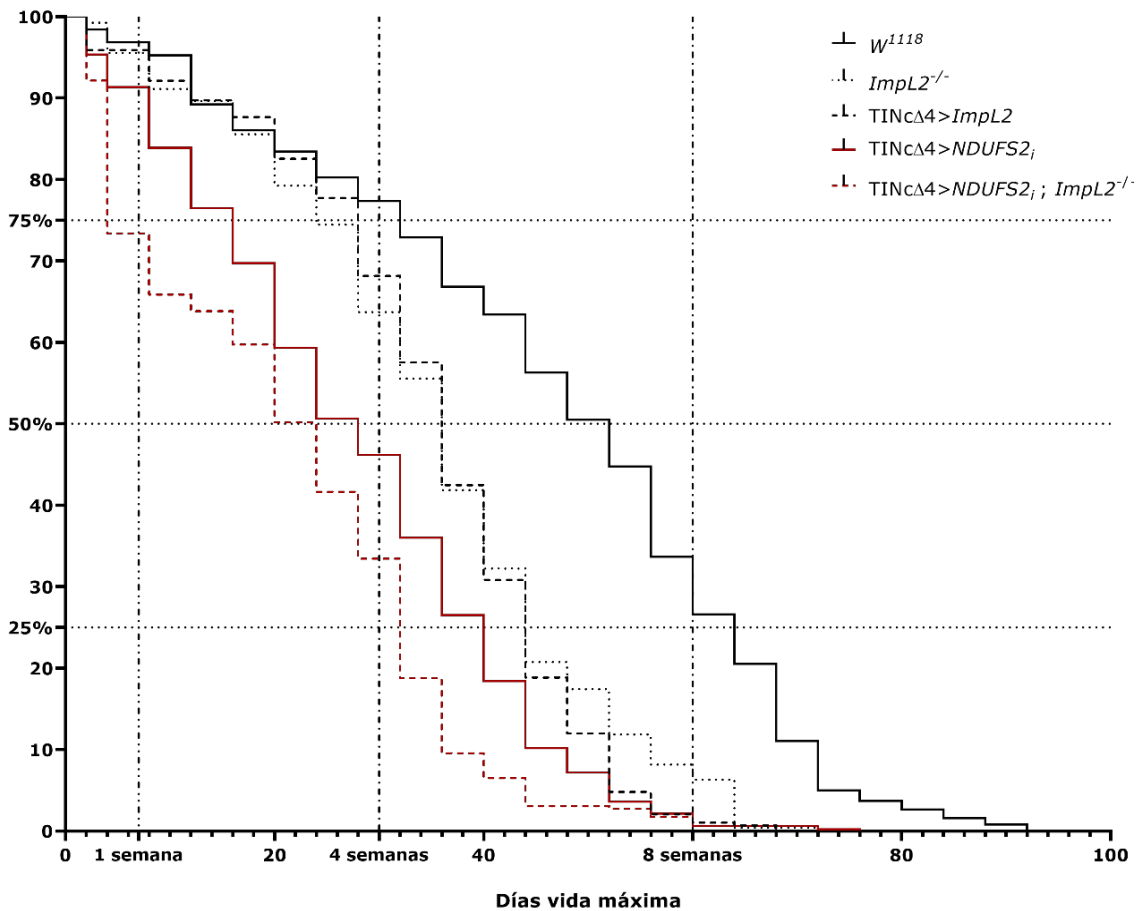


Figura 16. La secreción de *ImpL2* en el corazón mejora la esperanza de vida en moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón. En la gráfica se muestra el porcentaje de supervivencia relativo de cada genotipo. Se añaden 3 líneas punteadas horizontales que marcan en qué día cada genotipo alcanza el 75%, 50% y 25% de supervivencia. Las líneas semi-punteadas verticales marcan la proporción de moscas vivas a 1, 4 y 8 semanas. La diferencia entre curvas es estadísticamente significativa; prueba de Mantel-Cox (*logrank*) con ****p-valor<0,0001.

Estas observaciones permiten concluir que la secreción de *ImpL2* desde el corazón juega un papel protector necesario en la supervivencia de los animales interferidos para *NDUFS2* en el corazón, ralentizando la ratio de muerte de los animales (Figura 16) a costa de la movilización de reservas de lípidos y glúcidos (Figura 10) de los cuerpos grasos y la reducción drástica de tamaño y contenido lipídicos de los cuerpos grasos (Figura 9).

Trabajos de investigación previos han demostrado que la expresión de *ImpL2* en el tubo digestivo de *Drosophila* es causa de degeneración muscular, debido a la menor señalización de la vía de la insulina [131]. Si la sobreexpresión de *ImpL2* generada por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón está actuando del mismo modo en este modelo, cabe la posibilidad de una señalización autocrina en el corazón que agrave el fenotipo cardíaco.

Para comprobar si los cambios de expresión de *ImpL2* son responsables de los cambios en el corazón causados por la deficiencia de *NDUFS2*, se analiza la estructura del corazón con tinción de faloidina Fluor® Ph546 en moscas de 2 semanas de edad de los genotipos w^{1118} , *ImpL2*^{-/-}, *TINcΔ4>ImpL2*, *TINcΔ4>NDUFS2_i*, *ImpL2_i* y *TINcΔ4>NDUFS2_i*, *ImpL2*^{-/-} (Figura 17).

3.4 Estructura de los cardiomiocitos de *Drosophila melanogaster* en un contexto modificado para *ImpL2*

Los corazones de las moscas w^{1118} (Figura 17A) son rectos y presentan las fibras alineadas. Los corazones de las moscas *TINcΔ4>ImpL2_i* (Figura 17B) son similares en tamaño y organización de las fibras musculares comparados con los animales w^{1118} (Figura 17A); al aumentar la magnificación sobre los cardiomiocitos no se aprecian diferencias (Figura 17A' y 17B').

Las moscas cuyo corazón sobreexpresa *ImpL2* (Figura 17C) presentan corazones muy similares a las moscas w^{1118} y a la interferencia de *ImpL2* (Figura 17A y 17B), sin diferencias observables en la organización y tamaño de las fibras en los cardiomiocitos (Figura 17A', 17B' y 17C').

El corazón de las moscas interferido para *NDUFS2* e *ImpL2* simultáneamente (Figura 17D) no es muy distinto al observado en moscas w^{1118} e interferidas para *ImpL2* (Figura 17A y 17B), aunque sí se aprecia mayor anchura al aumentar la magnificación sobre los cardiomiocitos (Figura 17D'). Es un fenotipo intermedio al de los corazones de moscas w^{1118} y aquellos interferidos para *NDUFS2* únicamente (Figura 3C y 3C').

El corazón de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i*, *ImpL2*^{-/-} (Figura 17E) se observa notablemente más ancho que los corazones de animales w^{1118} (Figura 17A), siendo más similar al de animales *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 3C y 3C'), sobre todo en las fotografías de cardiomiocitos a mayor aumento (Figura 17E').

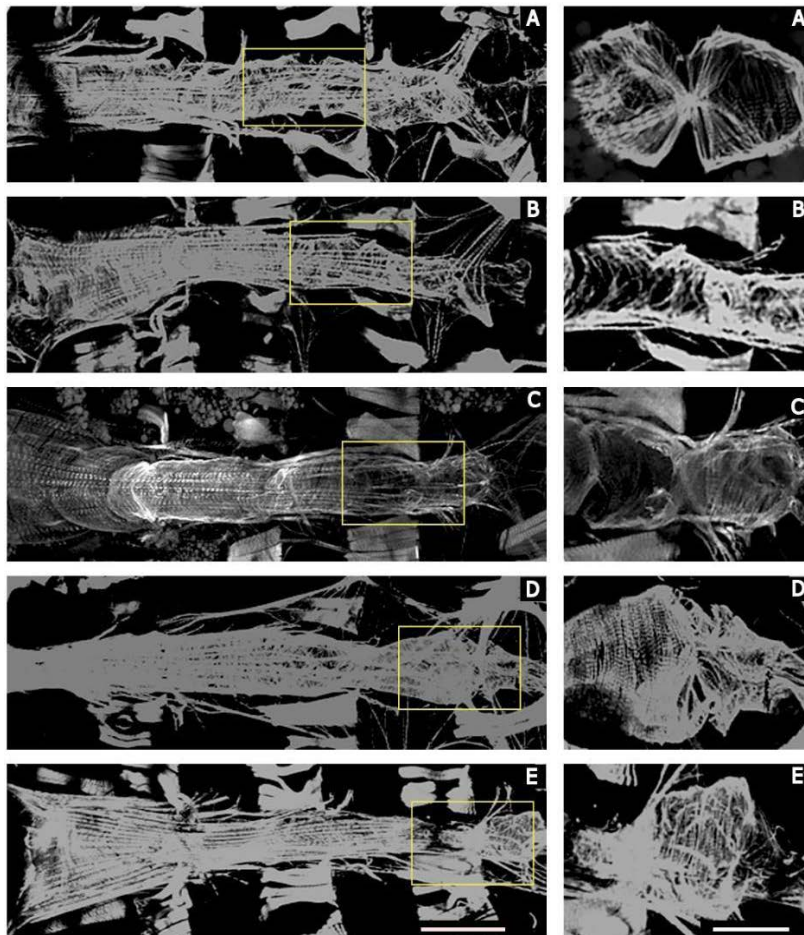


Figura 17. La alteración de la expresión de *ImpL2* no afecta a la morfología y estructura del corazón. En los paneles (A), (B), (C), (D) y (E) se muestra la tinción inmunohistoquímica con AlexaFluor® Ph546 de las líneas w^{1118} , $TINc\Delta4>ImpL2_i$, $TINc\Delta4>ImpL2$, $TINc\Delta4>NDUFS2_i$, $ImpL2_i$ y $TINc\Delta4>NDUFS2_i$, $ImpL2^{-/-}$, respectivamente. En las imágenes (A'), (B'), (C'), (D') y (E') se muestra una mayor magnificación de los últimos cardiomiocitos del corazón, enmarcado en amarillo en los corazones de la izquierda, en el mismo orden. Escala primera 125 μ m. Escala segunda 50 μ m. N=6.

Estas observaciones parecen implicar que alterar *ImpL2* no afecta a la estructura del corazón, la cual se ve únicamente modificada por la interferencia cardio-específica de *NDUFS2*. La aparente diferencia de tamaño observada entre las moscas con *NDUFS2* e *ImpL2* interferido y aquellas con *NDUFS2* interferido e *ImpL2* mutado podría deberse a la presencia de dos elementos UAS en el primero de ellos. Las moléculas de GAL4 disponibles tendrían que distribuirse entre los dos elementos y, en consecuencia, la expresión de ambos interferentes podría ser menor.

Para confirmar que la interferencia o sobreexpresión de *ImpL2* no provoca cambios sustanciales en el tamaño del corazón se mide el área que ocupa el corazón en el segmento A4 del abdomen (rectángulos blancos Figura 18) en moscas de 3 y 14 días de los genotipos w^{1118} , $ImpL2^{-/-}$, $TINc\Delta4>ImpL2$, $TINc\Delta4>ImpL2_i$ y $TINc\Delta4>NDUFS2_i$, $ImpL2^{-/-}$.

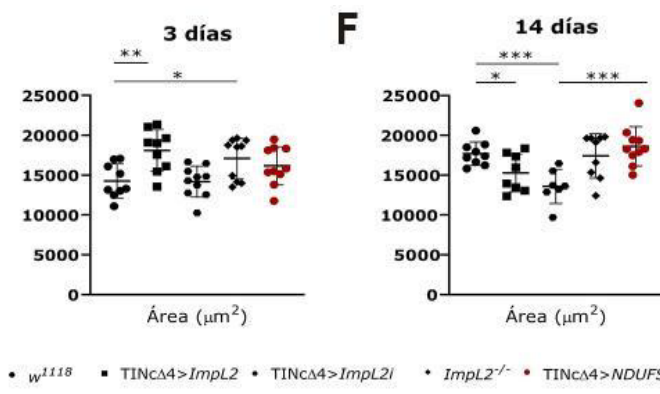
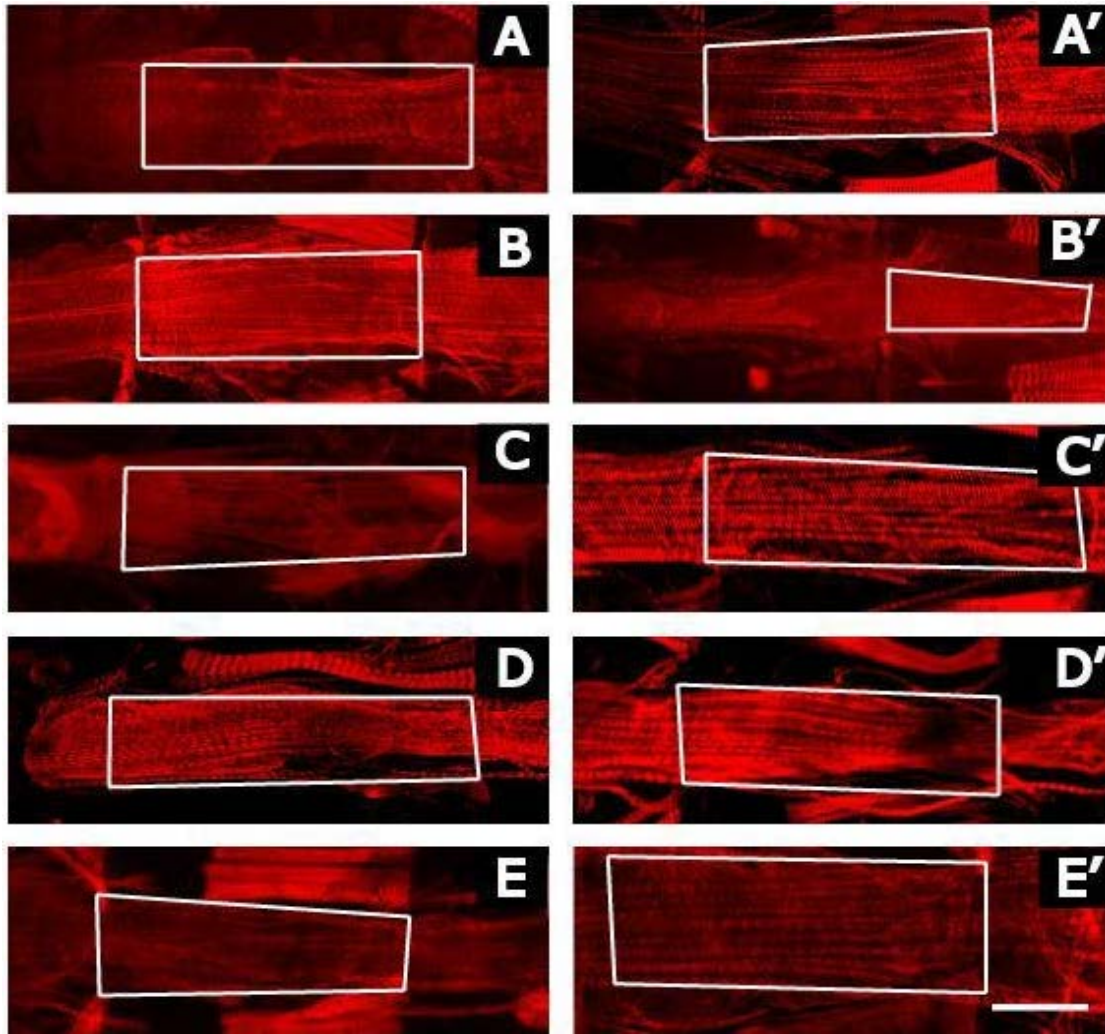
3.5 Medición de las dimensiones del corazón de *Drosophila melanogaster* en un contexto modificado para *ImpL2*

El área del segmento A4 de los corazones que sobreexpresan *ImpL2* (Figura 18B y 18B') es similar a la de los w^{1118} (Figura 18A y 18A') en anchura y longitud, aunque a los 3 días el área es un 27% más grande en los animales que sobreexpresan *ImpL2* que en las moscas w^{1118} (Figura 18F). Sorprendentemente, los corazones sanos son más anchos y un 16% más grandes a los 14 días que en las moscas *TINcΔ4>ImpL2* (Figura 18F').

En los corazones en los que *ImpL2* está interferido (Figura 18C y 18C') la anchura y longitud en el segmento A4 es similar a los corazones de moscas w^{1118} , tanto a los 3 como a los 14 días de edad. El área ocupada por el corazón en este segmento en la línea *TINcΔ4>ImpL2_i* es un 23% menor comparado con el control w^{1118} a los 14 días de edad (Figura 18F'), mientras que a los 3 días el área es idéntica (Figura 18F).

Al igual que la interferencia y la sobreexpresión, las moscas mutantes para *ImpL2* (Figura 18D y 18D'), *ImpL2^{-/-}*, tienen un corazón cuya anchura y longitud es similar a los de la línea w^{1118} tanto a los 3 como a los 14 días (Figura 18A y 18A'). El área del segmento A4 de los corazones *ImpL2^{-/-}* a los 3 días de edad es un 19,7% mayor que en las moscas w^{1118} (Figura 18F); a los 14 días, esta área es idéntica (Figura 18F').

El corazón en el segmento A4 de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}* (Figura 18E y 18E') es muy similar en anchura y longitud al corazón de las moscas w^{1118} (Figura 18A) a los 3 días. En animales de 14 días, los corazones son más anchos, recordando al fenotipo de moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 4A y 4A'), aunque las diferencias de tamaño de este segmento del corazón entre w^{1118} y *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}* no son significativas (Figura 18F y Figura 18F').



F' Figura 18. Eliminar la expresión de *ImpL2* completamente en moscas *TINcΔ4>NDUFS2i* mitiga levemente el fenotipo de cardiopatía dilatada. Imágenes del segmento A4 del corazón de moscas adultas teñido con con tinción Alexa Fluor® 546. (A), (B), (C), (D) y (E) corresponden a las líneas *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4>ImpL2*, *TINcΔ4>ImpL2i*, *ImpL2^{-/-}* y *TINcΔ4>NDUFS2i, ImpL2^{-/-}* de 3 días de edad. Las fotografías (A'), (B'), (C'), (D') y (E') corresponden a la misma secuencia de líneas de *Drosophila* envejecidas hasta los 14 días. En (F y F') se muestra el área de la región ocupada por el corazón en el segmento A4, recuadrada en blanco, en micras cuadradas (μm^2) en cada ejemplar a los 3 (F) y 14 (F') días de edad. T-Student con *** p-valor<0,001, **p-valor<0,01 y *p-valor<0,05. N≥7. Escala 75 μm .

Estas observaciones parecen implicar que la expresión de *ImpL2* en el corazón tiene un impacto en el tamaño del corazón. En aquellas moscas con *ImpL2* sobreexpresado o interferido en el corazón, este ve su tamaño reducido conforme las moscas envejecen, lo que podría apuntar a un posible efecto autocrino de *ImpL2*.

En los animales *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}*, los corazones tampoco alcanzan el mismo tamaño que en moscas de la línea *TINcΔ4>NDUFS2_i*. Esta diferencia es evidencia que el fenotipo de cardiopatía dilatada está causado principalmente por la interferencia de *NDUFS2*, con una pequeña contribución de *ImpL2*.

Con los resultados mostrados hasta ahora, hay evidencias suficientes como para afirmar que *ImpL2* ejerce un papel protector en los animales con *NDUFS2* interferido en el corazón, facilitando su supervivencia mediante movilización de reservas de lípidos.

Sin embargo, no hay evidencias de cómo *ImpL2* actúa de mediador en la movilización de las reservas de lípidos. Para hallar el gen o genes responsables, se analiza la expresión de genes relacionados con el metabolismo y su regulación (Tabla 1), en moscas cuyo *ImpL2* ha sido suprimido o sobreexpresado.

3.6 Análisis de la expresión de genes causantes de lipodistrofia por cardiopatía regulados por *ImpL2* en *Drosophila melanogaster*

El análisis de expresión génica se realiza por RT-qPCR a partir de ARN extraído 50 abdómenes de moscas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4>ImpL2* y *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2_i*. Como se puede observar en la figura 19, los cambios de expresión son casi nulos (*dSREBP*, *Mondo*), incrementos leves (*Ilp6* o *Spargel* en las *TINcΔ4>ImpL2* y *TINcΔ4>NDUFS2_i, ImpL2^{-/-}*) o bajadas de expresión reducidas (*ACoAOx* y *Glut1*).

Análisis de expresión global

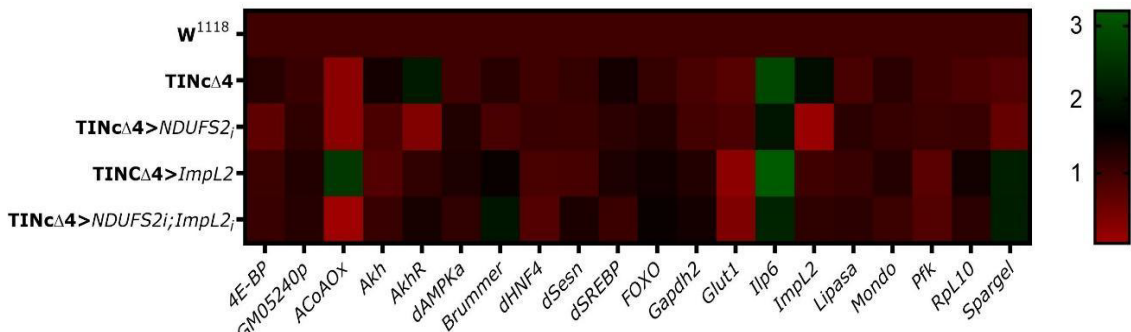


Figura 19. La interferencia de *NDUFS2* y/o *ImpL2* en el corazón de *Drosophila melanogaster* provoca cambios de expresión moderados en genes con distintas funciones en el metabolismo. Mapa de calor del perfil de expresión génica de las líneas *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4*, *TINcΔ4>NDUFS2_i*, *TINcΔ4>ImpL2* y *TINcΔ4>NDUFS2_i; ImpL2_i*, de los genes *4E-BP*, *GM05240p*, *ACoAOx*, *Akh*, *AkhR*, *dAMPKα*, *Brummer*, *dHNF4*, *dSesn*, *dSREBP*, *FOXO*, *Gapdh2*, *Glut1*, *Ilp6*, *ImpL2*, *Lipasa*, *Mondo*, *Pfk* y *Spargel*. Expresión relativa de los ARN mensajeros 0=rojo, 1=rojo oscuro, 2=negro y 3=verde.

Las únicas diferencias de expresión halladas entre los animales *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4>ImpL2* y *TINcΔ4>NDUFS2_i; ImpL2_i* implican a los genes *AkhR*, *Foxo*, *Glut1*, *dSesn* y *Spargel* (Tabla 3). En las moscas con sobreexpresión de *ImpL2*, los genes *AkhR*, *Foxo* y *Spargel* tienen su expresión aumentada, mientras que *Glut1* está disminuido. En los animales interferidos para *NDUFS2* e *ImpL2* en el corazón, *AkhR*, *Foxo*, *Gapdh2*, y *Spargel* están aumentados. En la línea *TINcΔ4>NDUFS2_i; ImpL2_i* el gen *Glut1* está disminuido.

Gen	<i>w¹¹¹⁸</i> vs. <i>TINcΔ4>ImpL2</i>	<i>w¹¹¹⁸</i> vs. <i>TINcΔ4>NDUFS2_i; ImpL2_i</i>	<i>TINcΔ4>ImpL2</i> vs. <i>TINcΔ4>NDUFS2_i; ImpL2_i</i>
AkhR	1:1,208 ± 0,076*	1:1,389 ± 0,0809***	1,208:1,389 ± 0,1194
Foxo	1:1,384 ± 0,12**	1:1,509 ± 0,132***	1,384:1,509 ± 0,1780
Gapdh2	1:1,199 ± 0,114	1:1,335 ± 0,111**	1,199:1,1355 ± 0,1595
Glut1	1:0,31 ± 0,059****	1:0,378 ± 0,0578****	0,31:0,378 ± 0,08256
ImpL2	1:1,038 ± 0,115	1:1,1395 ± 0,0889	1,038:1,1395 ± 0,1453
dSesn	1:0,984 ± 0,0758	1:1,293 ± 0,102*	0,984:1,293 ± 0,1653
Spargel	1:2,288 ± 0,394*	1:2,194 ± 0,367*	2,288:2,194 ± 0,5383

Tabla 3. La interferencia de *NDUFS2* en el corazón de *Drosophila* parece afectar la expresión de genes reguladores del metabolismo como *Foxo* y receptores de membrana como *AkhR* y *Glut1* en los adipocitos. Se comparan las diferencias de expresión entre animales de 2 semanas de edad de los genotipos con la diferencia entre medias y el error estándar entre *w¹¹¹⁸*, *TINcΔ4>ImpL2* y *TINcΔ4>NDUFS2_i; ImpL2_i*. N≥4. T-Student ****p-valor<0,0001, ***p-valor<0,001, **p-valor<0,01 y *p-valor<0,05.

Estas pequeñas variaciones en la expresión génica sugieren que el mediador pueda ser una proteína cuya expresión es constante, pero sus cambios de localización o modificaciones postraduccionales tienen un impacto en la regulación del metabolismo.

El factor de transcripción Foxo regula la expresión génica y coordina el metabolismo general cuando migra al núcleo [148]. En *Drosophila*, Foxo modula la señalización por insulina en los cuerpos grasos [153], además de controlar la esperanza de vida [154]. Esto lo convierte en el principal candidato como mediador responsable de la degeneración de los cuerpos grasos cuya señalización comienza con la expresión de *ImpL2* desde el corazón.

Para contrastar que Foxo migra al núcleo donde actúa como factor de transcripción, se emplea la línea de moscas transgénica *FOXO_{GFP}*. Esta línea de *Drosophila melanogaster* porta una copia adicional del gen *Foxo* fusionado a una GFP bajo el control de su propio promotor. Para compensar el incremento de dosis génica, se cruza esta línea con la línea mutante $\Delta 94$, nulo para *Foxo*.

3.7 Evaluación histoquímica de la actividad de Foxo en los cuerpos grasos

Para determinar la ubicación de Foxo en los adipocitos, se realizan fotografías en microscopía de fluorescencia de disecciones abdominales teñidas con Hoechst de moscas de las líneas *FOXO_{GFP}*, *FOXO_{GFP} ($\Delta 94$)*, *TINc $\Delta 4$ >NDUFS2i*, *FOXO_{GFP}* y *TINc $\Delta 4$ >NDUFS2i*, *FOXO_{GFP} ($\Delta 94$)* de 3 y 21 días de edad (Figura 20)

En las líneas de moscas *FOXO_{GFP}* y *TINc $\Delta 4$ >NDUFS2i*, *FOXO_{GFP}* (Figura 20A y 20C) la fluorescencia emitida por la GFP en los núcleos (flechas blancas Figura 20) es similar cuando las moscas tienen 3 días de edad. En las líneas de moscas de 3 días que incluyen la mutación $\Delta 94$ (Figura 20B y 20D), la fluorescencia emitida por la GFP dentro de los núcleos es más difusa en los adipocitos de los animales *FOXO_{GFP}* también apareciendo en el citoplasma de las células (Figura 20B), indicando que *Foxo* no es muy abundante dentro del núcleo. Cuando las moscas *FOXO_{GFP}* y *FOXO_{GFP} ($\Delta 94$)* alcanzan los 21 días de edad, apenas se ve una leve fluorescencia de la GFP fusionado a *Foxo* en los adipocitos (Figura 20E y 20F), mientras que en los animales *TINc $\Delta 4$ >NDUFS2i*, *FOXO_{GFP}* y

TINcΔ4>NDUFS2i, *FOXO_{GFP}* ($\Delta 94$) la fluorescencia de la GFP en núcleos y el citoplasma es similar a la de moscas de 3 días.

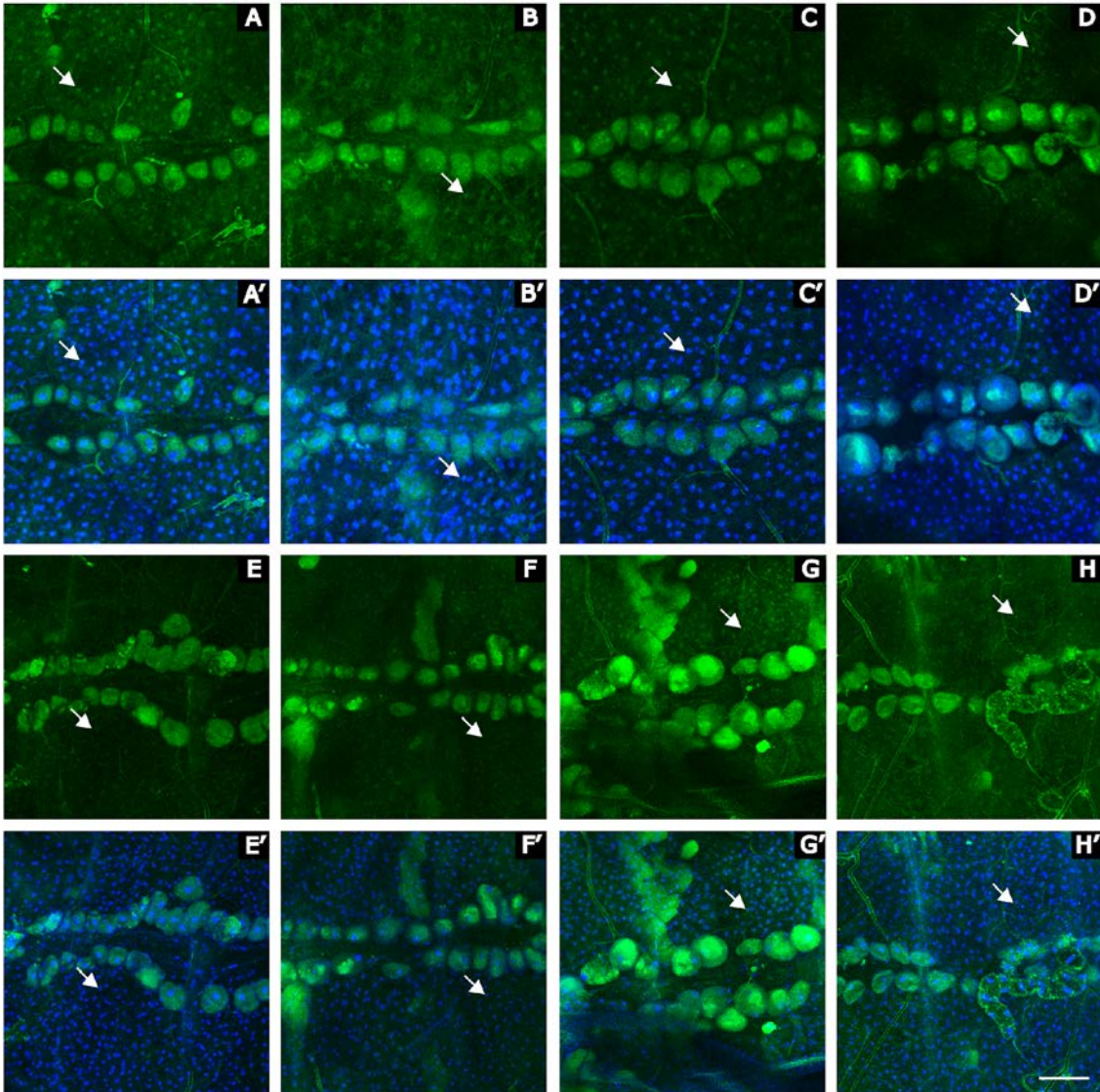


Figura 20. *Foxo* se localiza en el núcleo de los adipocitos más tiempo en los animales interferidos para *NDUFS2* en el corazón. Abdomen de moscas expresando GFP fusionado a *Foxo* teñidos con Hoechst®. *FOXO_{GFP}*, *FOXO_{GFP}* ($\Delta 94$), *TINcΔ4>NDUFS2i*, *FOXO_{GFP}* y *TINcΔ4>NDUFS2i*, *FOXO_{GFP}* ($\Delta 94$) (A-D para moscas de 3 días y E- H para moscas de 21 días de edad. A'-G' corresponde a las tinciones de Hoechst®). Escala 75 μ m. N=6.

En moscas con *NDUFS2* interferido, *Foxo* está presente dentro del núcleo de los adipocitos aun cuando la mosca ha envejecido, mientras que en moscas sin la interferencia casi no se detecta la fluorescencia de la construcción *FOXO_{GFP}*. Estas observaciones apoyan fuertemente la hipótesis de que *Foxo* es el responsable directo de la movilización de las reservas de lípidos de cuerpos grasos.

El eje *ImpL2-Foxo* tiene un papel central en la homeostasis y supervivencia del animal al interferirse la expresión de un gen mitocondrial en el tejido cardíaco en *Drosophila melanogaster*. Se ha demostrado en otros trabajos previos que diferentes tejidos musculares pueden tener una respuesta a estrés mitocondrial muy diferente [155]. Por ello, se llevaron a cabo experimentos que permitieran comparar si la interferencia de *NDUFS2* en otro tejido causaba los mismos efectos en el animal.

Drosophila melanogaster, como la mayoría de los artrópodos voladores del infraorden Neoptera [156] emplea un complejo sistema de músculos anclados al tórax que, al contraer este, permite el movimiento de las alas y al animal emprender el vuelo [157]. Este complejo sistema de músculos posee una organización de sarcómeros y funcionamiento bastante similar al músculo esquelético estriado de los vertebrados [158], lo que permite realizar comparaciones entre ambos sistemas.

Para determinar si la respuesta metabólica de estos músculos de vuelo a la interferencia de *NDUFS2* es la misma, se emplea una línea que expresa GAL4 bajo la actuación del promotor de un gen exclusivo de estos músculos. La línea de moscas *Act88F-GAL4* expresa el gen GAL4 bajo el control del promotor del gen *Act88F*, específico de los músculos longitudinales de vuelo [159]. Para obtener animales con *NDUFS2* interferido e *ImpL2* interferido o sobreexpresado en el músculo de vuelo, se realizan los cruces mostrados en la Figura 21.

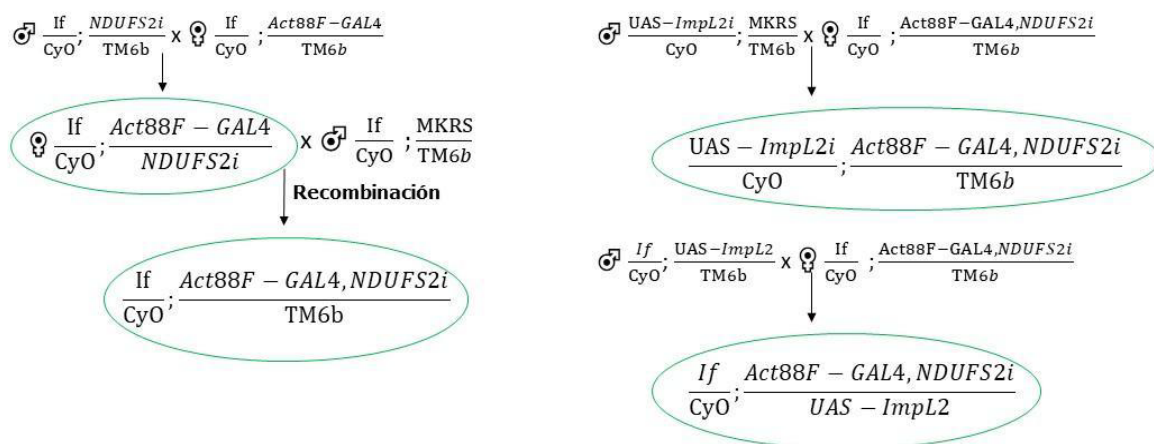


Figura 21. Resumen de los cruces empleados para interferir la expresión de *NDUFS2* e *ImpL2* en el músculo de vuelo. Se fuerzan eventos de recombinación (en verde) con los que se obtienen las líneas que portan la interferencia en el músculo de vuelo de *NDUFS2i* (*Act88F-GAL4>NDUFS2i*), la interferencia conjunta *ImpL2* y *NDUFS2* (*Act88F-GAL4>ImpL2i, NDUFS2i*) y la interferencia de *NDUFS2* junto con la sobreexpresión de *ImpL2* (*Act88F-GAL4>NDUFS2, ImpL2^{-/-}*).

4. Respuestas compensatorias similares en un modelo paralelo de interferencia de *NDUFS2* en músculo no cardíaco

Para confirmar que la interferencia de *NDUFS2* afecta al músculo de vuelo, se procedió a evaluar el funcionamiento del complejo I de la cadena respiratoria, ya que *NDUFS2* es un componente estructural del mismo [41]. Se midió la actividad de los complejos I y IV de las mitocondrias del músculo de vuelo de moscas adultas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *UAS-NDUFS2_i* y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i* (Figura 22).

Las moscas que tienen *NDUFS2* interferido en sus músculos de vuelo tienen la actividad enzimática del complejo I significativamente inferior al de moscas *w¹¹¹⁸* o portadoras de la secuencia *UAS-NDUFS2_i* (Figura 22- Complejo I), concretamente, un 40% de la actividad relativa de las moscas *w¹¹¹⁸*. Sorprendentemente, la actividad enzimática del complejo IV es casi 4 veces mayor al comparar con la actividad relativa de animales *w¹¹¹⁸* y *UAS-NDUFS2_i* (Figura 22-Complejo IV).

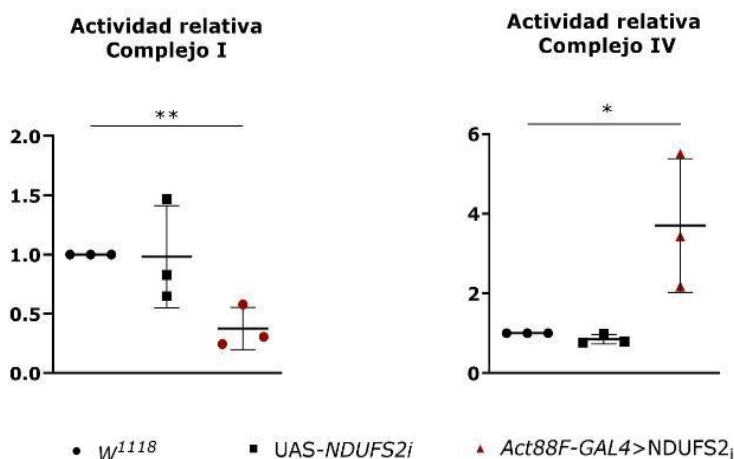


Figura 22. La interferencia de *NDUFS2* en el músculo de vuelo reduce la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones en este músculo, disparando la actividad del complejo IV. Medición espectrofotométrica de la actividad enzimática de los complejos I (A) y IV (B) en moscas adultas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *UAS-NDUFS2_i* y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i*. La actividad del complejo I y IV se

relativizan frente a la actividad base a la observada en *w¹¹¹⁸*. Cada punto corresponde a la actividad relativa de la purificación de mitocondrias de 100 adultos. T-Student p-valor**<0,01 y p-valor*<0,05.

Una bajada significativa en los niveles de actividad del complejo I de la cadena transporte de electrones, causado por la interferencia de *NDUFS2*, es un fenotipo similar al observado en la mutación Asp446Asn en pacientes, en el cual existe una pérdida de actividad catalítica [48] confirmando que el músculo de vuelo está afectado por la interferencia de *NDUFS2*.

La actividad del complejo IV en el músculo de vuelo en moscas interferidas para *NDUFS2* parece ser mayor, aunque muestra una gran variabilidad entre ensayos. Para verificar que en la interferencia de *NDUFS2* en el músculo de vuelo de *Drosophila melanogaster* pueda existir un fenotipo asociado a los cuerpos grasos como sí existe en el modelo de interferencia en el corazón, se procede a analizar la morfología de los cuerpos grasos de moscas adultas.

4.1 Análisis morfológico de cuerpos grasos en *Drosophila melanogaster* en un contexto *NDUFS2* interferido en músculo no cardíaco

El análisis de la morfología de los cuerpos grasos se realiza en una tinción histoquímica con rojo Nilo N1142® y Hoechst® en abdomen de moscas adultas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸* y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i*; (Figura 23).

Los cuerpos grasos de los animales *w¹¹¹⁸* son voluminosos, ocupando gran parte del abdomen, con grandes gotas de lípidos (cuadrado amarillo Figura 23A). El fenotipo del tejido graso abdominal en las moscas interferidas para *NDUFS2* en el músculo de vuelo guarda un gran parecido con el de las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 8C y 8C'), los cuerpos grasos están retraídos y ocupan un menor volumen, con gotas de lípidos más pequeñas, con más huecos entre sí (cuadrado amarillo- Figura 23B). Esto implica que interferir *NDUFS2* en *Drosophila* en el músculo de vuelo causa una degeneración en los cuerpos grasos similar a la observada previamente en el corazón (Figura 8).

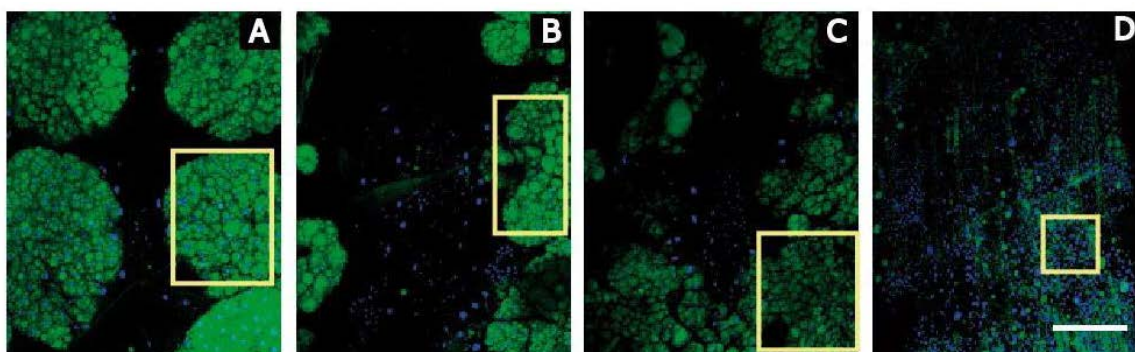


Figura 23. *ImpL2* regula los niveles de reservas lipídicas de los cuerpos grasos de *Drosophila melanogaster* con *NDUFS2* interferido en músculo de vuelo. Abdomenes de moscas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸*, (A) *Act88F-GAL4>NDUFS2_i* (B), *Act88F-GAL4>NDUFS2_i, ImpL2_i* (C) y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i, ImpL2* (D) fotografiados tras tinción histoquímica con rojo Nilo® y Hoechst® en microscopía confocal de fluorescencia. Cuadrados amarillos indican la ubicación de un cuerpo graso. Escala 100 µm. N=3.

Para contrastar si *ImpL2* puede estar involucrado en este cambio metabólico como se ha demostrado en el modelo de interferencia del corazón, se compara la morfología de los cuerpos grasos en las líneas *Act88F-GAL4>NDUFS2_i*, *ImpL2_i* y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i*, *ImpL2* con animales *w¹¹¹⁸* y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i* (Figura 23).

El abdomen de animales *Act88F-GAL4>NDUFS2_i*, *ImpL2_i* guardan un gran parecido con el de moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i*, *ImpL2_i* (Figura 13D y 13D'), con cuerpos grasos similares a las moscas *w¹¹¹⁸*, aunque con gotas lipídicas algo más reducidas (Figura 23C). Este rescate del fenotipo confirma que es *ImpL2* el responsable de la degeneración de los cuerpos grasos en respuesta a la interferencia de *NDUFS2* en el músculo de vuelo, al igual que es el intermediario responsable en la lipodistrofia asociada a la interferencia cardiaca de este gen (Figura 13).

En las moscas *Act88F-GAL4>NDUFS2_i*, *ImpL2*, sobreexpresar *ImpL2* en músculo de vuelo implica una fuerte degeneración de los cuerpos grasos, los cuales son casi inapreciables con una cantidad ínfima de gotas de lípidos (Figura 23D). Se trata de un fenotipo aún más fuerte de degeneración de cuerpos grasos que el de los animales *TINcΔ4>ImpL2* (Figura 13C y 13C').

El fenotipo observado en estas moscas permite concluir que la interferencia de *NDUFS2* en el músculo de vuelo está ligada a una degeneración del tejido graso abdominal, al igual que en el modelo de interferencia en el corazón (Figura 8). En ambos órganos, *ImpL2* es el efector que media la degeneración observada de los cuerpos grasos.

Tanto la interferencia de *NDUFS2* como la sobreexpresión de *ImpL2* en músculo de vuelo inducen una reducción de tamaño en los cuerpos grasos mayor que cuando se hace desde el corazón. Esta observación correlaciona con el mayor tamaño del tejido que tendría como consecuencia un mayor incremento de los niveles secretados de *ImpL2* y por tanto una lipodistrofia más acusada.

En diferentes tejidos musculares, con diferente desarrollo embrionario [160], *ImpL2* se posiciona como el intermediario principal en la respuesta metabólica entre la deficiencia mitocondrial del complejo I y la degeneración de los cuerpos grasos. Esta degeneración de los cuerpos grasos implica, en la interferencia de

NDUFS2 en el corazón, una movilización de triglicéridos y trehalosa almacenada en los adipocitos. Para confirmar que, en la interferencia de *NDUFS2* en el músculo de vuelo también existe dicha movilización, se cuantifican los niveles de triglicéridos y trehalosa en moscas enteras y en hemolinfa (Figura 24).

4.2 Valoración de los niveles glúcidos y lípidos en *Drosophila melanogaster* en la interferencia de *NDUFS2* en músculo no cardíaco

La cuantificación de triglicéridos y trehalosa se hace sobre la hemolinfa extraída de grupos de 120 moscas de 2 semanas (Figura 24A y 24A'), y en grupos de 6 moscas enteras de 14 días de edad (Figura 24B y 24B') de los genotipos *w¹¹¹⁸* y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i*.

Los triglicéridos circulantes son un 42% superiores en las moscas afectadas por la interferencia de *NDUFS2* en músculo de vuelo respecto al control (Figura 24A). Este incremento de triglicéridos en hemolinfa es casi idéntico al observado en animales *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 10A'), lo que confirma de nuevo que la interferencia de *NDUFS2* fuerza la movilización de reservas a través de un aumento en la secreción de *ImpL2*. Por otro lado, los niveles de trehalosa circulante son un 37% mayores en los ejemplares *Act88F-GAL4>NDUFS2_i* (Figura 24A'). Dicho incremento es el mismo que se observa en las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 10B'). Esta diferencia implica que en la interferencia de *NDUFS2*, tanto en corazón como en músculo de vuelo, *ImpL2* actúa en el adulto de *Drosophila* movilizando triglicéridos y trehalosa en paralelo como mecanismo compensatorio.

Sorprendentemente, los niveles de triglicéridos totales son un 30% menores en los animales interferidos para *NDUFS2* en el músculo de vuelo (Figura 24B), mientras que en la interferencia de *NDUFS2* para el corazón esta diferencia es inferior al 10%. Al igual que ocurre con las moscas *TINcΔ4>NDUFS2_i* (Figura 10B), los niveles de trehalosa totales no muestran diferencias significativas entre ambos genotipos (Figura 24B'). Esta diferencia en los niveles de triglicéridos

totales podría estar relacionada con que los requerimientos energéticos del músculo de vuelo sean más elevados.

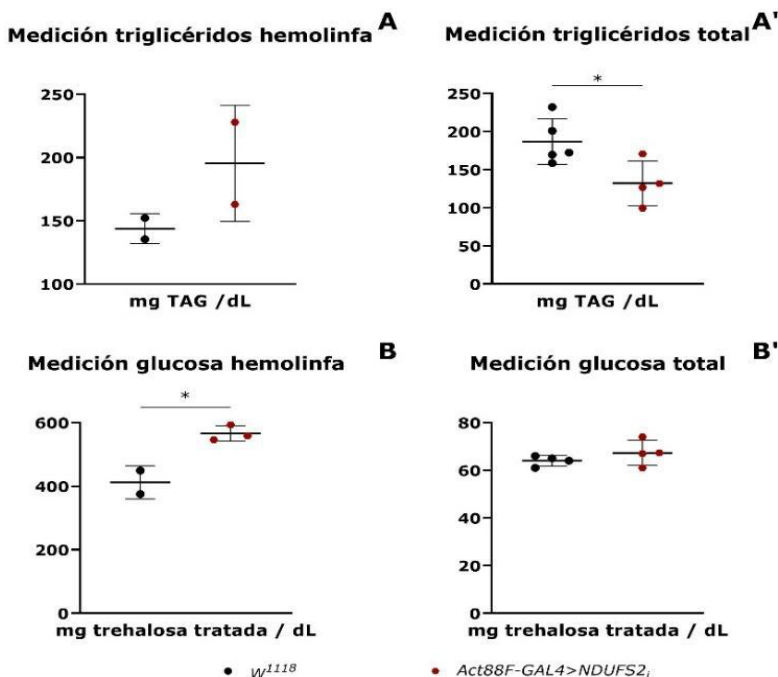
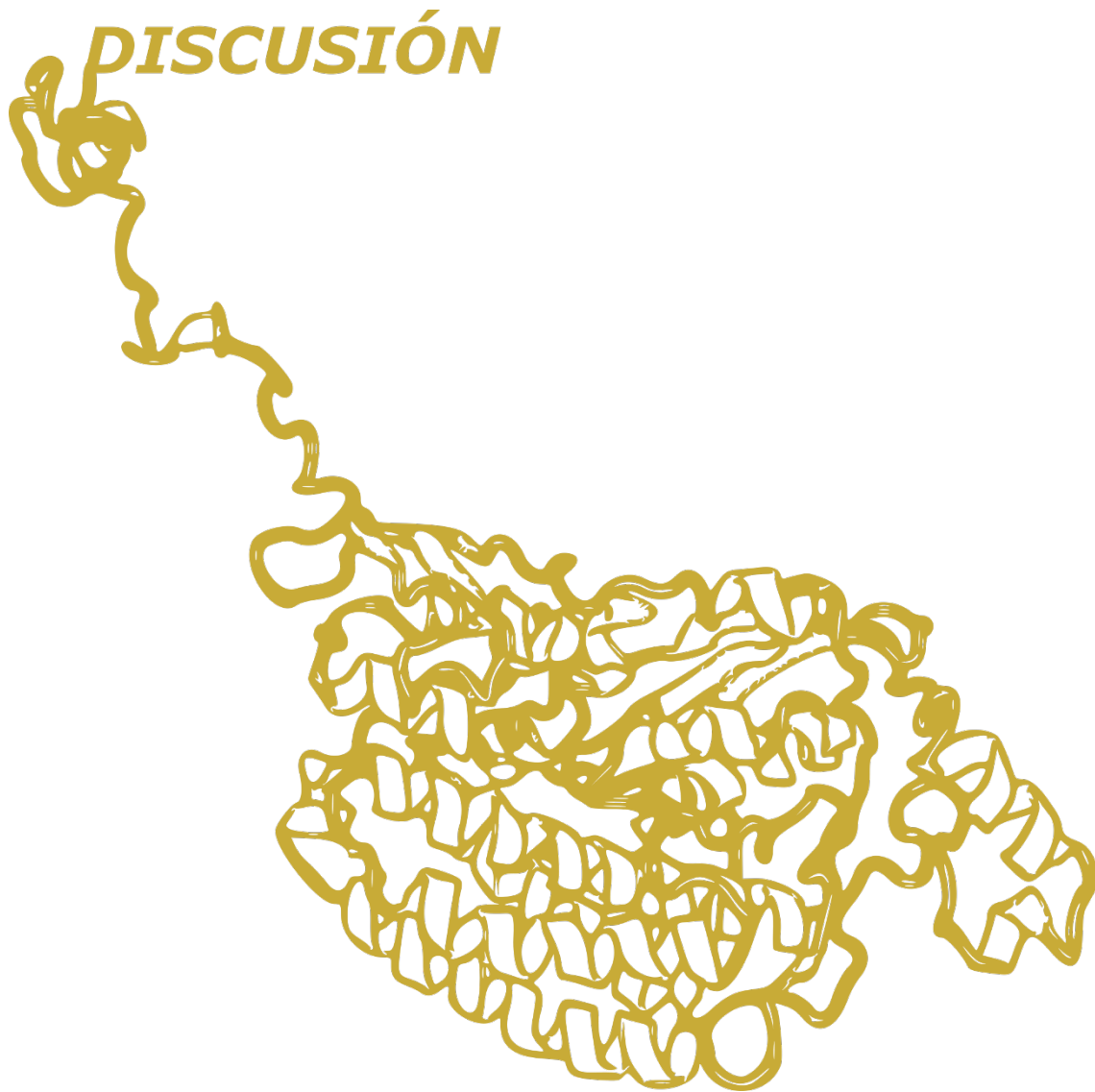


Figura 24. La interferencia de *NDUFS2* en el músculo de vuelo de la mosca aumenta los niveles circulantes de trehalosa y triglicéridos. Se muestran los niveles de triglicéridos y trehalosa en miligramos por decilitro de hemolinfa en moscas de 2 semanas de los genotipos *w¹¹¹⁸* (A) y *Act88F-GAL4>NDUFS2_i* (B). En (A', B') se muestran los niveles totales de triglicéridos y trehalosa. N (grupos 120 moscas para medición en hemolinfa) ≥ 2 . N (grupos de 6 moscas para medición niveles totales) ≥ 5 . T-Student **p-valor<0,01 y *p-valor<0,05.

Las diferencias observadas en los niveles de moléculas energéticas circulantes (Figura 24) permite concluir que una mayor secreción de ImpL2 en el organismo de *Drosophila* induce la movilización de reservas de lípidos y glúcidos como compensación a una deficiencia mitocondrial en el músculo de vuelo, fenotipo previamente observado en el modelo de la interferencia en el corazón (Figura 11). Aunque la actuación de ImpL2 parezca perjudicial para el animal debido a la degeneración de los cuerpos grasos, el aumento de su secreción mejora la esperanza de vida y capacidad de supervivencia en aquellas moscas afectadas por la cardiopatía derivada de la interferencia de *NDUFS2* en el corazón. Foxo actúa como factor de transcripción en los núcleos de los adipocitos (Figura 20), activando la expresión de genes implicados en la regulación del metabolismo. Esta activación es similar a la señal que generaría un episodio de hambruna en *Drosophila* [161], lo cual implica que la pérdida de función de *NDUFS2* es sentida por el organismo de *Drosophila* como falta de energía.

Es por tanto relevante destacar el proceso de comunicación cruzada que existe entre distintos órganos en *Drosophila melanogaster* que evidencian la importancia de estudiar las interacciones entre sistemas que puedan existir en enfermedades mitocondriales humanas en general y las cardiovasculares en particular.



Las enfermedades cardiovasculares causadas por defectos en genes mitocondriales son de gran importancia por tener un pronóstico complejo, sin una posibilidad de curación real y una mortalidad elevada [162]. Dentro de las múltiples causas de las enfermedades mitocondriales, las más frecuentes, con una incidencia de 1.6 afectados cada 5000 nacidos vivos [3,60], son los defectos monogénicos de genes mitocondriales ubicados en el núcleo, de los cuales se han descrito más de 1000 [20].

El gen nuclear *NDUFS2* (*NADH dehydrogenase ubiquinone iron-sulfur protein 2*) da lugar a una subunidad estructural del complejo I de la cadena de transporte de electrones y mutaciones en su secuencia dan lugar a graves enfermedades congénitas [41,42]. Entre las enfermedades que causan las mutaciones se hallan neuropatías degenerativas, asociadas al síndrome de Leigh, y, ocasionalmente, hepatopatía, oftalmopatía y acidosis láctica [47].

Uno de los defectos más comunes asociados a las enfermedades mitocondriales causadas por defectos genéticos de *NDUFS2* es la cardiomiopatía hipertrófica [56]. Estas cardiomiopatías se caracterizan por tener un alto índice de mortalidad en neonatos, momento en el cual se produce el cambio metabólico del corazón de anaeróbico a fosforilación oxidativa, lo que da lugar a la hipertrofia del corazón que puede derivar a acidosis láctica, letal en la gran mayoría de pacientes [55].

Los procesos fisiopatológicos causantes de los síntomas de las cardiomiopatías por mutaciones de *NDUFS2* en pacientes son poco conocidos [46] dificultando la comprensión de la enfermedad e impidiendo dar un pronóstico certero para los pacientes. En trabajos recientes se ha demostrado que la señalización por interleucinas liberadas por el corazón a otros órganos periféricos en pacientes con enfermedad cardiovascular repercute en el ritmo de degeneración del primero, llegando a causar remodelaciones en hígado o tejido adiposo [78]. Este hallazgo demuestra, por un lado, la complejidad de las enfermedades cardiovasculares, y por otro, la importancia de la interacción entre órganos como causa del agravamiento en enfermedades cardiovasculares.

Con el objetivo de tener una mejor comprensión de la señalización entre el corazón y los órganos periféricos en enfermedades cardiovasculares de origen mitocondrial se desarrolla un modelo de deficiencia del gen ortólogo de *NDUFS2*

de *Drosophila melanogaster*, CG1970 o ND-49 [163], el cual codifica una subunidad estructural del complejo I, y presenta un elevado grado de conservación con su ortólogo humano [46].

En trabajos previos del laboratorio se observó que la interferencia ubicua de *NDUFS2* en *Drosophila melanogaster* impedía el crecimiento normal de los animales, los cuales mueren en el primer estadio larvario (datos no mostrados).

Para generar un modelo de pérdida parcial de función de *NDUFS2* en *Drosophila melanogaster* que permitiese analizar la interacción entre órganos en un contexto de enfermedad cardiovascular, se empleó el sistema de construcciones transgénicas GAL4-UAS [107]. En trabajos recientes se ha demostrado que la interferencia cardio-específica de *NDUFS2* mediante controlador *HandGS*, funcional en fases larvarias y el adulto en *Drosophila melanogaster* [164], causa una cardiopatía dilatada [124].

Utilizando un controlador basado en el gen *tinman* [134], se consigue restringir la deficiencia de CG1970 al corazón del adulto de *Drosophila*, el cual posee características electrofisiológicas comparables con corazones de mamíferos [112], además de un metabolismo más dependiente de ácidos grasos que en las fases larvarias [165].

1. La deficiencia de *NDUFS2* (CG1970) en *Drosophila melanogaster* causa cardiopatía dilatada

En las enfermedades cardiovasculares mitocondriales humanas con frecuencia tiene lugar un proceso de remodelación cardíaca como respuesta a la falta de ATP dando lugar a hipertrofia de las paredes del corazón [73]. Esta hipertrofia busca mejorar la eficiencia en el proceso de latido, pero aumenta el riesgo de fallo cardíaco o arritmia ventricular con pronóstico grave [166].

En el modelo de interferencia cardio-específica de *NDUFS2* en el adulto de *Drosophila melanogaster*, la estructura del corazón experimenta una remodelación en sus paredes, similar a la observada en humanos.

En esta remodelación cardíaca causada por la deficiencia de *NDUFS2* en *Drosophila*, tiene lugar un aumento de tamaño del corazón completo, ya observable en el tercer día de vida del adulto (Figuras 3, 4 y 5 de Resultados).

Los cardiomiocitos que componen las paredes del corazón, desde la cámara cónica hasta el último segmento, aumentan en longitud, aunque no en anchura, lo cual provoca un aumento de la circunferencia del lumen del corazón en moscas adultas jóvenes, cambio que se mantiene conforme el animal envejece (Figura 4 de Resultados).

Acorde con las modelizaciones de las cardiopatías estudiadas en *Drosophila* [119], esta remodelación anatómica corresponde a una hipertrofia excéntrica, en la cual las fibras musculares que contienen los cardiomiocitos son de mayor longitud que en animales sanos, sin aumentar la abundancia de fibras. Esta hipertrofia da lugar al aumento del área de la sección del lumen del corazón sin incremento de grosor de paredes, causando una cardiopatía dilatada (Figura 1).

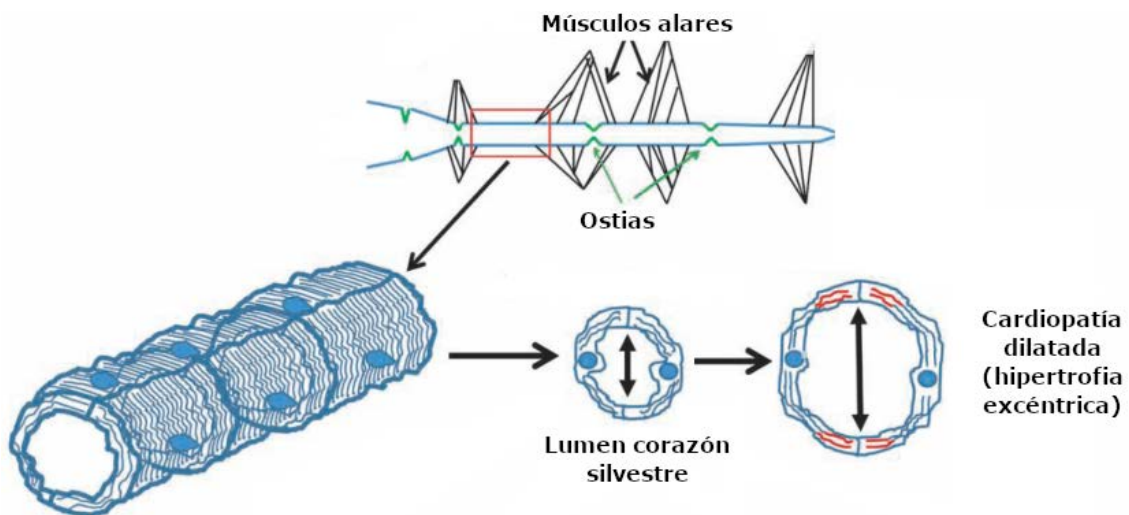


Figura 1. El aumento de tamaño del corazón en moscas *TINcΔ4>NDUFS2* es característico de cardiopatía dilatada. El aumento en el tamaño del corazón está causado por un aumento del tamaño de los cardiomiocitos que componen sus paredes. En las hipertrofias excéntricas del corazón de *Drosophila*, se añaden fibras contráctiles en serie (fibras rojas Cardiopatía dilatada) a las preexistentes, aumentando el tamaño y conservando el grosor de las paredes, fenotipo idéntico al observado en el aumento del volumen del corazón por la deficiencia de *NDUFS2*. Modificado de Matthew J. Wolf 2012 [119].

Esta remodelación cardíaca se extiende a las fibras longitudinales (Figura 4 de los Resultados), de distinto origen embrionario y cuya función es coordinar el ritmo de latidos [120] y que tienen una estructura similar al músculo esquelético de mamífero [167].

Estos cambios en tejidos periféricos ligados al funcionamiento del corazón en *Drosophila* son equiparables a la remodelación que puede experimentar el pericardio en humanos frente a situaciones de estrés crónicas [168], aunque este

último es un tejido que no existe como tal en el sistema circulatorio de los artrópodos [115].

En los corazones interferidos para *NDUFS2* existe una alteración del ritmo cardíaco en la cual el número de latidos por minuto es superior al observado en los animales *w¹¹¹⁸* (Figura 6 de los Resultados) además de presentar asincronía en los latidos (Anexo 4).

Este incremento de la frecuencia cardíaca en los corazones interferidos para *NDUFS2*, junto con la desincronización en contracción y relajación, es un fenotipo muy similar al observado en moscas *w¹¹¹⁸* de más de 5 semanas de edad [169], lo que podría señalar que la deficiencia de *NDUFS2* genera un fenotipo similar a un envejecimiento prematuro del corazón. Por otro lado, este fenotipo recuerda a arritmias del corazón en pacientes, en las cuales los latidos por minuto son inusualmente altos o bajos [170].

En algunos casos de pacientes las arritmias pueden derivar en cardiomiopatía, la cual es reversible en ciertas condiciones bajo un tratamiento farmacológico como betabloqueantes o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina [139]. Sería interesante determinar si es la alteración del ritmo cardíaco la causa de la remodelación del corazón, o viceversa, ya que eso demostraría que el corazón de *Drosophila* posee una plasticidad similar a la del corazón humano en el cual participan más de 1400 genes para modificar el corazón, sano o con fallo crónico [70].

La remodelación cardíaca en pacientes de enfermedades cardiovasculares crónicas, como se ha explicado previamente, permite mejorar la eficiencia del funcionamiento del miocardio sin aumentar la capacidad de carga y bombeo de la sangre [171], lo cual afecta negativamente al funcionamiento del corazón repercutiendo en el índice de mortalidad [172].

En el modelo de pérdida parcial de función de *NDUFS2* en *Drosophila*, la hipertrofia del corazón afecta negativamente a la supervivencia de las poblaciones, como atestigua un *Hazard Ratio* es casi 4 veces mayor en estos animales frente al control. Por cada mosca *w¹¹¹⁸* mueren 4 con deficiencia mitocondrial (Figura 6 de los Resultados).

Además, las moscas que padecen disfunción mitocondrial tienen la misma longevidad, siendo esta casi 20 días inferior (Figura 6 de los Resultados). Esta disminución de la longevidad es muy característica de las enfermedades mitocondriales humanas en las que la esperanza de vida de los pacientes puede no llegar al año de vida en las más graves; en las más leves los síntomas se manifiestan a partir de una edad avanzada (>55 años) [173].

2. La cardiopatía por interferencia de *NDUFS2* causa lipodistrofia en *Drosophila melanogaster*

La interferencia de *NDUFS2* en el corazón del adulto de *Drosophila melanogaster* da lugar a fenotipos similares a los principales síntomas de enfermedades cardiovasculares humanas como remodelación cardíaca, alteración del ritmo cardíaco y una elevada mortalidad. Durante el estudio de este modelo de deficiencia mitocondrial, se halló un fenotipo de degeneración del tejido adiposo abdominal.

Los cuerpos grasos, las unidades funcionales del tejido adiposo, están compuestos por acumulaciones de adipocitos que almacenan glucógeno y lípidos, metabolizados para actividades de gran gasto energético como vuelo, ecdisis o periodos de hambruna [174].

En la deficiencia mitocondrial cardio-específica de *NDUFS2*, los adipocitos de las moscas adultas poseen un tamaño 3,3 veces menor que los adipocitos de animales *w¹¹¹⁸*, con un menor número de cúmulos de triglicéridos (Figura 9 de los Resultados), lo cual se refleja en la pérdida de abundancia y volumen de los cuerpos grasos (Figura 8 de los Resultados).

Los adipocitos en *Drosophila melanogaster* actúan, además de como reservorio lipídico y glucídico, como coordinadores del metabolismo general, al igual que el hígado y páncreas de vertebrados [122], detectando pérdidas de energía en el organismo y remodelándose a la par que liberan lípidos y glucógeno [144]. En la pérdida parcial de función de *NDUFS2*, la cardiomiopatía dilatada está asociada a una movilización de contenido lipídico que indica que el corazón está exigiendo una mayor demanda de energía desde los cuerpos grasos.

La movilización del contenido lipídico de los adipocitos se detecta en la hemolinfa, líquido circulante de artrópodos encargado de la inmunidad y porte de nutrientes en forma de diacilglicerol, triglicéridos y trehalosa, entre otros lípidos y glúcidos [175,176]. La cantidad de triglicéridos y trehalosa circulantes en hemolinfa de animales afectados por la interferencia cardio-específica de *NDUFS2* es un 55% y 34% mayor respectivamente que en los animales *w¹¹¹⁸*, mientras que los niveles totales de ambas moléculas en el adulto de *Drosophila* son similares entre moscas sanas y afectadas por la cardiopatía dilatada (Figura 10 de los Resultados).

En trabajos recientes se ha demostrado que una dieta abundante en lípidos para moscas sanas altera la función cardíaca [176], al igual que un aumento excesivo del metabolismo de carbohidratos puede inducir cardiopatía [177]. Esta sensibilidad del corazón frente a un aporte excesivo de lípidos o carbohidratos podría explicar por qué su incremento en hemolinfa conserva una proporción constante (1:2,65 triglicéridos: trehalosa en animales control frente a 1:2,3 en moscas con interferencia de *NDUFS2* cardíaca (Figura 10 de los Resultados)) en un contexto de cardiopatía dilatada puesto que un incremento excesivo de esas moléculas podía agravar aún más el fenotipo cardíaco.

El corazón en mamíferos consume ácidos grasos y glúcidos en una proporción 70:30 [178]. Esta proporción cambia favoreciendo el consumo de carbohidratos, transformado en piruvato, en casos de daño o fallo cardíaco [69]. Este cambio metabólico, junto con la remodelación cardíaca, devuelve al corazón del mamífero a un metabolismo parecido al fetal, incrementando la eficiencia en su funcionamiento, aunque sin mejorar la capacidad de carga y bombeo de sangre [171].

Acorde con lo observado en la deficiencia cardíaca de *NDUFS2*, el corazón de *Drosophila* es remodelado anatómicamente de forma similar a los casos de pacientes. Además, se movilizan reservas energéticas en forma de carbohidratos y lípidos desde cuerpos grasos cuya expresión de *NDUFS2* es normal (Figura 11 de los Resultados). Dado que no hay interferencia de *NDUFS2* en los cuerpos grasos (Figura 12 de los Resultados), éstos tienen mitocondrias sanas, esta movilización ha de ser consecuencia de la señalización procedente del corazón,

aunque es posible que el tubo digestivo participe en el proceso, ya que se ha descrito su papel como regulador del contenido lipídico en *Drosophila* [179].

La reducción de tamaño de los adipocitos, junto con la pérdida de contenido lipídico y glucógeno, liberados a la hemolinfa, permiten concluir que la disfunción mitocondrial consecuencia de la interferencia de la expresión de *NDUFS2* causa lipodistrofia en el animal (Figura 2).

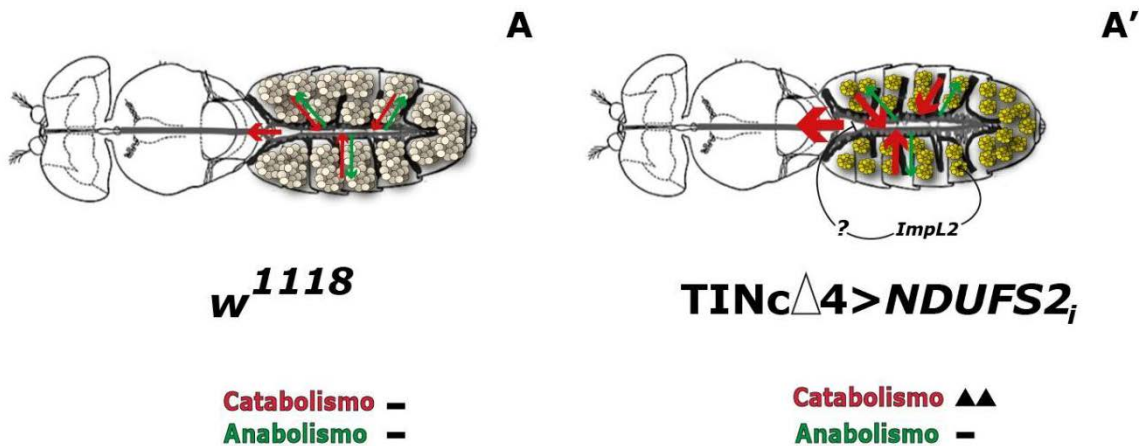


Figura 2. La pérdida de función parcial de *NDUFS2* en el corazón genera un desbalance energético que promueve el catabolismo. La caída de actividad de complejo I por la interferencia de *NDUFS2* causa un déficit de energía en el corazón de *Drosophila*, el cual induce la secreción del efector metabólico *ImpL2* desde los cardiomiocitos, movilizandotriglicéridos y trehalosa desde los cuerpos grasos, fomentando el catabolismo, lo cual causa lipodistrofia conforme el animal envejece, ya que la capacidad anabólica permanece invariable. Modificado de Matthew.J J Wolf y Rockman 2011 [116].

3. *ImpL2* coordina el metabolismo corazón-cuerpos grasos a través de la vía *IIS-Foxo* en el adulto de *Drosophila melanogaster*

La comunicación de músculo y tejido adiposo en *Drosophila* la llevan a cabo factores de la familia de los TGFβ, tanto en adulto [180] como en larva [181]. En humanos, TGFβ2 se detecta en niveles más elevados en enfermedades relacionadas con músculo esquelético [182]. Sin embargo, la señalización del corazón a otros órganos suele estar mediada por inflamación; en pacientes se ha observado que interleucinas como IL18, secretadas por el corazón, inducen la remodelación del tejido adiposo, el cual libera factores proinflamatorios que perjudican la función cardíaca [78].

Sin embargo, en la interferencia cardíaca de *NDUFS2* en *Drosophila melanogaster* es la secreción del factor ImpL2 desde los tejidos afectados por la pérdida de función parcial de *NDUFS2* (Figuras 9 y 10, 23 de los Resultados) el desencadenante de la respuesta metabólica que causa la degeneración de los cuerpos grasos.

ImpL2 en *Drosophila melanogaster*, un factor no emparentado con las proteínas de la familia TFG β [183], se secreta desde el corazón, músculo estriado, tubo digestivo, sistema nervioso central, aparato reproductor de las hembras y multitud de tejidos del ectodermo embrionario y larvario [FBgn0001257 - 126,127]. ImpL2 actúa bloqueando los péptidos dilp (*Drosophila insulin-like peptides*), homólogos en función y estructura a la insulina de mamíferos [184]. Existen 8 tipos de péptidos *insulin-like*, cuya función principal es controlar los niveles de glúcidos en hemolinfa, el tamaño corporal, el tamaño de los cuerpos grasos y la fertilidad, conformando el eje coordinador principal de la vía IIS (*Insulin/IGF1 signaling*)[185].

En *Drosophila melanogaster* con deficiencia cardíaca por interferencia de *NDUFS2*, la pérdida de función de *ImpL2* previene una fuerte reducción de tamaño de los adipocitos, y por tanto de los cuerpos grasos (Figura 13 de los Resultados), que conservan gran parte de su contenido lipídico (Figura 14 de los Resultados). Por otro lado, la sobreexpresión cardio-específica de *ImpL2* causa justo el efecto contrario, reduciendo el tamaño de los adipocitos y su contenido graso (Figuras 13 y 14 de los Resultados).

Estas observaciones indican que es el incremento de secreción de *ImpL2* desde el corazón, y el consecuente bloqueo de la función de los péptidos “*insulin-like*”, la razón de la movilización de los lípidos desde los cuerpos grasos [186]. Este bloqueo de la función de los dilp modifica el metabolismo de los adipocitos activando el catabolismo y aumenta la supervivencia de las moscas con cardiopatía dilatada. Esta mayor supervivencia se puede observar al comparar el *Hazard Ratio* de los animales con interferencia de *NDUFS2* y mutantes para *ImpL2*, que es 1,5 veces mayor que en animales interferidos en el corazón para *NDUFS2* (Figura 15 de los Resultados).

Sin embargo, el bloqueo de función de los péptidos “*insulin-like*” no es el único rol descrito de *ImpL2* en *Drosophila*.

La sobreexpresión ectópica de *ImpL2* en adipocitos mejora la esperanza de vida en los animales, aunque el mecanismo exacto no ha sido descrito [187]. Este fenotipo es idéntico al observado en este modelo de cardiomiopatía dilatada, aunque *ImpL2* se secreta desde el corazón en lugar de hacerlo en los propios adipocitos. Por otro lado, la *ImpL2* sobreexpresión desde el tubo digestivo da lugar a degeneración muscular en el adulto de *Drosophila* [131,188]. Este rol de *ImpL2* en crecimiento y homeostasis de los órganos parece no tener efecto en el tamaño del corazón cuando *NDUFS2* está interferido, aunque sí repercute en el tamaño del corazón cuando se sobreexpresa *ImpL2* únicamente (Figura 18 de los Resultados).

La importancia de detallar las funciones de *ImpL2* en este modelo de disfunción cardíaca radica en la existencia de un gen ortólogo en humanos, IGFBP7 [189]. IGFBP7 forma parte de la superfamilia de las IGFBP (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein*), proteínas secretadas que se unen a IGF (*Insulin-like Growth Factor*) o a receptores de IGFBP, regulando el crecimiento y división celulares además de bloquear la apoptosis [190,191]. IGFBP7 se secreta desde cerebro, hígado, músculo y páncreas para favorecer el crecimiento y supervivencia celular en humanos, aunque cambios en su expresión están asociados a cáncer gástrico, pulmonar o hepático [192]. Existen evidencias de que IGFBP7 aumenta sus niveles en sangre en pacientes con diabetes de tipo II [193], y que es capaz de unirse a insulina con alta afinidad en humanos [80] bloqueando su unión a receptores de insulina IRS1 e IRS2, generando resistencia a insulina y dando lugar a lipodistrofia [194]. Este fenotipo de diabetes tipo II es muy similar al observado en la interferencia de *ImpL2* en moscas adultas (Figura 15) y envejecidas (Anexo 3). Esta similitud entre *ImpL2* e IGFBP7 permite recalcar el elevado grado de similitud funcional entre estas proteínas, revelando el potencial de emplear IGFBP7 como biomarcador o sensor en enfermedades mitocondriales cardiovasculares y lipodistrofia.

ImpL2 actúa a través de la vía de la insulina (*IIS*) regulando en los adipocitos el eje conformado por *Foxo*, *Akt* y *TORC1* [149]. El gen *Foxo* (*Forkhead box protein O*) codifica un factor de transcripción que se activa tras ser fosforilado por *Akt*,

migrando al núcleo. En el núcleo, a través de la activación de genes como *4E-BP*, *InR*, *dLip4* o *dSREBP* [195–198], regula crecimiento y homeostasis metabólica en tejido adiposo, digestivo y nervioso [161].

En las moscas con interferencia cardio-específica de *NDUFS2*, *Foxo* se mantiene durante más tiempo dentro del núcleo de los adipocitos (Figura 20), lo que terminaría por modificar el patrón de expresión de genes mencionados como *4E-BP* o *dSREBP*. En último término, esta sobreactivación de *Foxo* desencadena una respuesta catabólica en los adipocitos, causante de la lipodistrofia (Figura 9 y 14 de los Resultados), mejorando la esperanza de vida y supervivencia de los animales (Figura 16 de los Resultados).

Este fenotipo es idéntico al observado por la acción del gen ortólogo *FOXO3* en humanos, el cual tiene un importante papel en longevidad coordinando procesos metabólicos a través de *mTORC1* entre otros genes [199]. En condiciones normales (Figura 3A), los escasos niveles de *ImpL2* permiten que los péptidos *ilp* se unan al receptor de insulina *InR* activando la proteína *IRS*, lo cual desencadena que *Akt* fosforile *Foxo* inhibiendo su translocación al núcleo [200]. En animales con pérdida de función parcial de *NDUFS2* cardio-específica (Figura 3B), el aumento de secreción de *ImpL2* bloquearía los *dilp*, haciendo que *Akt* esté disminuido lo que tiene repercusión en el complejo *dTORC1* y ralentiza el anabolismo; la disminución de actividad quinasa de *Akt* podría ser el motivo de la translocación de *Foxo* al núcleo, activando *4E-BP*, *IRS* o *dSesn/Sestrin*.

En las moscas adultas deficientes para *ImpL2* (Figura 4A) es muy probable que los *dilp2* y *dilp6* (debido a su rol en la regulación de los cuerpos grasos [201]) no están siendo bloqueados, pudiendo unirse al *InR*. Esta unión de los péptidos “*insulin-like*” a *InR* mantiene los niveles de glúcidos y reservas lipídicas en niveles similares a los normales [202], conservando la integridad de los adipocitos, pero resintiendo la esperanza de vida de los animales. Por otro lado, en las moscas que sobreexpresan *ImpL2* desde el corazón el bloqueo de los *dilp* es mucho más fuerte, lo que mantiene a *Foxo* más tiempo dentro del núcleo que en las moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón, causando una degeneración más acusada de los adipocitos (Figura 4B).

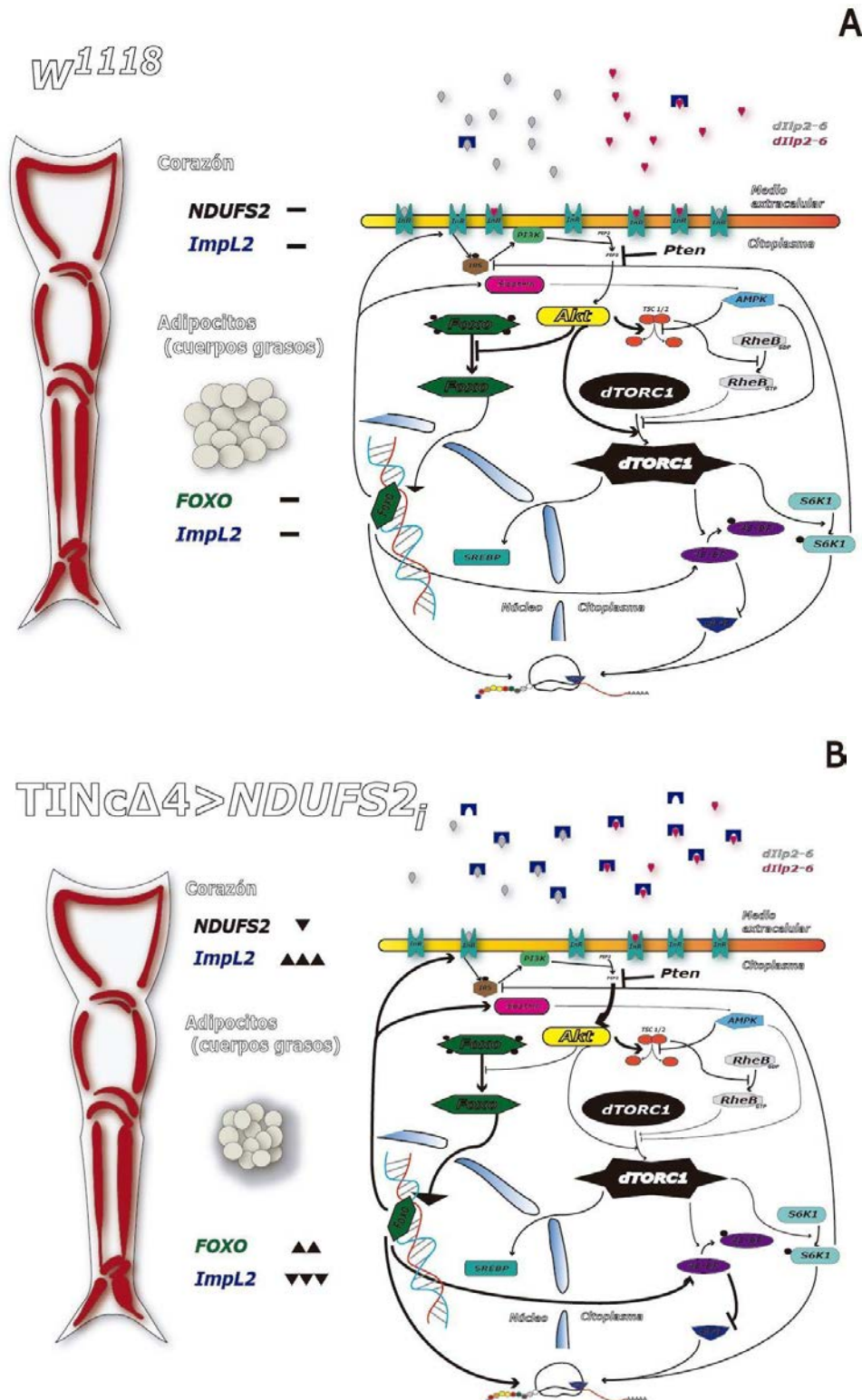


Figura 3. En la interferencia cardíaca de *NDUF52*, *Impl2* y *Foxo* son los principales responsables del cambio metabólico en un eje de comunicación entre órganos. Modelo representativo de la actuación de *Impl2* en condiciones normales (A) bloqueando la actuación de los dilp, uno de los principales elementos de la vía de la insulina. Tras la sobreexpresión de *Impl2*, se dispara *Foxo* (B), lo cual dispara la movilización y catabolismo de las reservas de lípidos tras la activación de genes objetivo como *eIF4e*, *Sestrin (dSesn)*, *4E-BP* o *InR*, otros efectores de la vía de la insulina lo cual ralentiza el anabolismo permitiendo aportar la energía demandada por el corazón con cardiopatía dilatada. Las flechas indican la activación a la vez las rayas la inhibición de la ruta, mientras que el grosor indica si éstas son en mayor o menor medida.

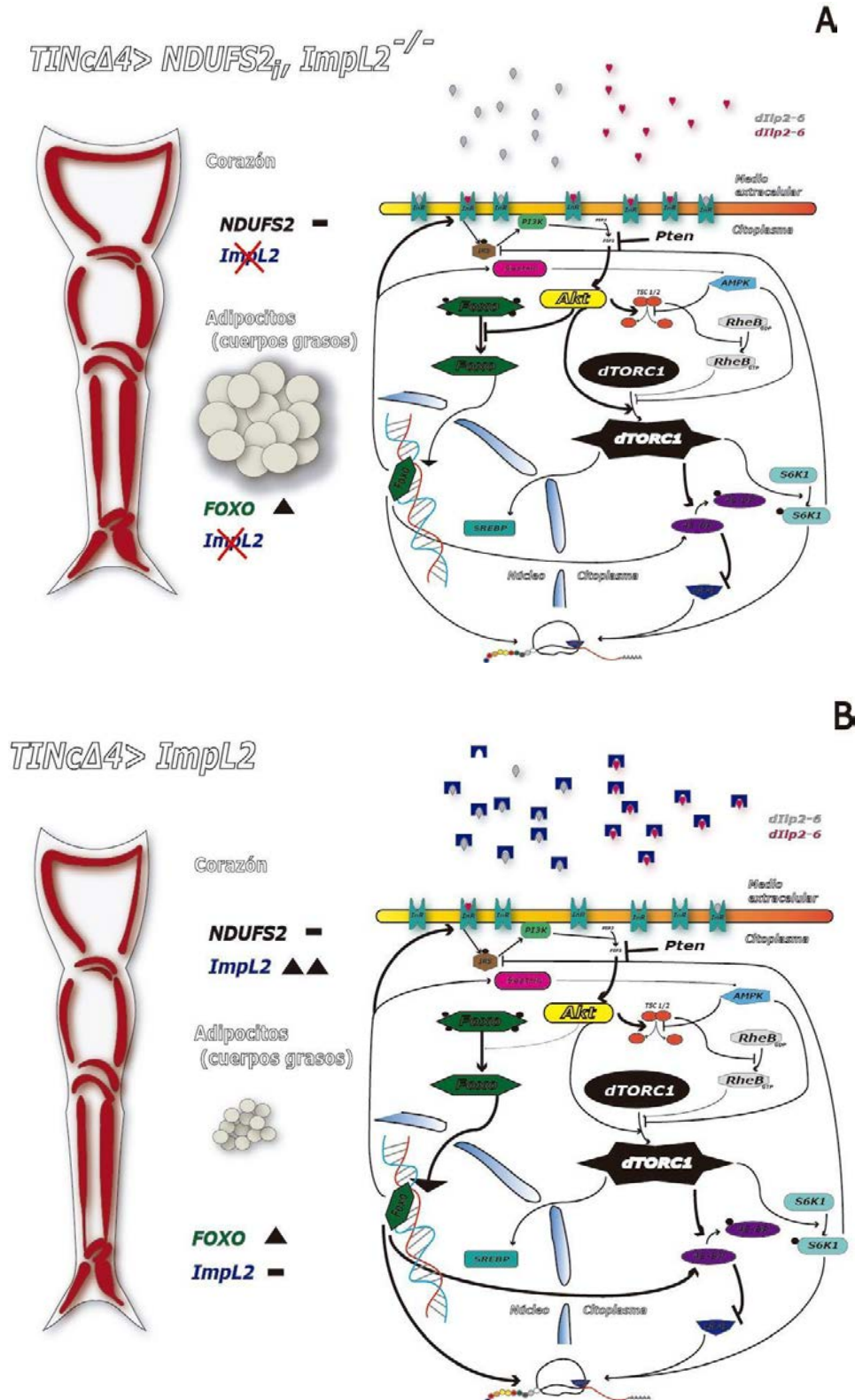


Figura 4. El eje *Impl2-dilp-Foxo* es de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis en *Drosophila* por disfunción cardíaca mitocondrial. En esta modelización, *Impl2* suprimido completamente (A) del organismo la situación revierte al fenotipo silvestre, los dilp están activos más tiempo, lo cual reduce la movilización de lípidos y conserva las rutas anabólicas. Por el contrario, en un contexto no patológico, la sobreexpresión de *Impl2* (B) es una fenocopia de la lipodistrofia observada, derivada de una todavía más exagerada transducción de Foxo cortando también la activación del complejo *dTORC1*.

4. Paralelismo del modelo de interferencia de *NDUSF2* *Drosophila* frente a humano

En este modelo de disfunción cardíaca por interferencia de *NDUSF2* se ha mostrado la existencia de un eje de comunicación entre distintos órganos en *Drosophila melanogaster*. Esta comunicación, mediada por un intermediario de la ruta de la insulina, estimula la movilización de reservas del tejido graso abdominal del animal, un fenotipo equiparable al de una paciente con diabetes de tipo II asociada a cardiomiopatía causada por una mutación en el gen *ND1* [203].

Por otro lado, se ha observado que en *Drosophila melanogaster* deficientes para *ImpL2* y envejecidas (>50 días de edad), esta pérdida de función de (Anexo 3) puede dar lugar a un fenotipo de lipodistrofia similar al del síndrome metabólico. En los pacientes con síndrome metabólico, la absorción de nutrientes y la ganancia de peso se resienten por la resistencia a insulina; este síndrome es causante de cardiomiopatía en humanos y en *Drosophila melanogaster* [176]. En humanos, se ha observado que una bajada consistente de IGF puede estar asociada a síndrome metabólico [204], el cual también está asociado a resistencia de insulina causante de cardiomiopatía [92,205].

En la ruta *Insulin/ Insulin-like Signaling* al comparar *Drosophila* con humanos existen algunas diferencias. En la mosca existen 8 péptidos ortólogos a la insulina [184] frente a un único gen que codifica la proteína de la insulina [206]. Los factores IGF1 e IGF2 tienen un rol similar en el crecimiento y control celular y metabólico [207] pero no tienen ortólogo en *Drosophila melanogaster*. Además, existe solamente un factor bloqueante, *ImpL2*, [208] mientras que en humanos se han descrito 7 proteínas IGFBP distintas con capacidad de unirse a insulina e IGF [190].

Entre las IGFBP descritas en humanos, IGFBP2 destaca porque su expresión en pacientes con lipodistrofia y síndrome metabólico es superior a la de personas sanas [209], al igual que la expresión de IGFBP7 aumenta al existir daño cardíaco por infarto de miocardio en los pacientes [210]. Estas similitudes entre *ImpL2*, IGFBP2 y IGFBP7 apuntan que sería de gran interés comprobar si

IGFPB7 o IGFBP2 están siendo secretados específicamente en sangre de pacientes con cardiomiopatía mitocondrial, como se ha descrito en este modelo de *Drosophila melanogaster*.

Por otro lado, se ha observado que Foxo en *Drosophila* permanece más tiempo en el núcleo en los animales con la disfunción cardíaca causada por la interferencia de *NDUFS2*. Esto parece implicar que es uno de los responsables de activar el catabolismo. Por otro lado, Foxo en *Drosophila* mejora la función cardíaca alterada por la edad, promoviendo un mejor control de calidad de las proteínas mal plegadas [211]. Sería interesante comprobar si Foxo también actúa así en el modelo de interferencia de *NDUFS2*.

En humanos no existe un gen único de *Foxo*, sino 4 isoformas: FOXO1, FOXO3, FOXO4 y FOXO6. Estas 4 isoformas de la familia FOXO están evolutivamente conservadas, aunque algunas funciones son exclusivas de cada isoforma [212]. FOXO6 tiene un importante rol en la regulación de la hiperglicemia e hiperlipidemia en diabetes [153], mientras que FOXO1 es el puente molecular entre el aumento del metabolismo catabólico y periodos de escasez de nutrientes que fomenta la longevidad [213]. Algunas variantes de FOXO3 mitigan la mortalidad causada por las enfermedades cardiovasculares [214] mientras que FOXO4, sin embargo, es capaz de empeorar la función de corazones con fallo cardíaco tras activar la apoptosis celular [215]. Por ello, sería de gran interés analizar qué rol puede tener la familia de genes FOXO en cardiopatías humanas, integrando la señalización conocida de Akt, mTORC1 o SIRT1 [216], en comparación al rol protector que ejerce Foxo en la interferencia cardio-específica de *NDUFS2* en *Drosophila melanogaster*.

Para cerrar este capítulo hay que recalcar que la pérdida de función parcial de *NDUFS2* causa una cardiomiopatía que afecta a la supervivencia en *Drosophila melanogaster* paralela a la que se describió en pacientes hace más de 20 años [45]. Sin embargo, *NDUFS2* no es únicamente una proteína estructural del complejo I cuyos defectos están asociados a cardiomiopatías [54]. Mientras que en esta tesis doctoral se ha mostrado que la interferencia de *NDUFS2* en el corazón bloquea la señalización de *IIS* activando el catabolismo para garantizar la supervivencia, en otras investigaciones se ha demostrado que la deficiencia de *NDUFS2* en disco imaginal de *Drosophila* activa el gen *TOR* fomentando

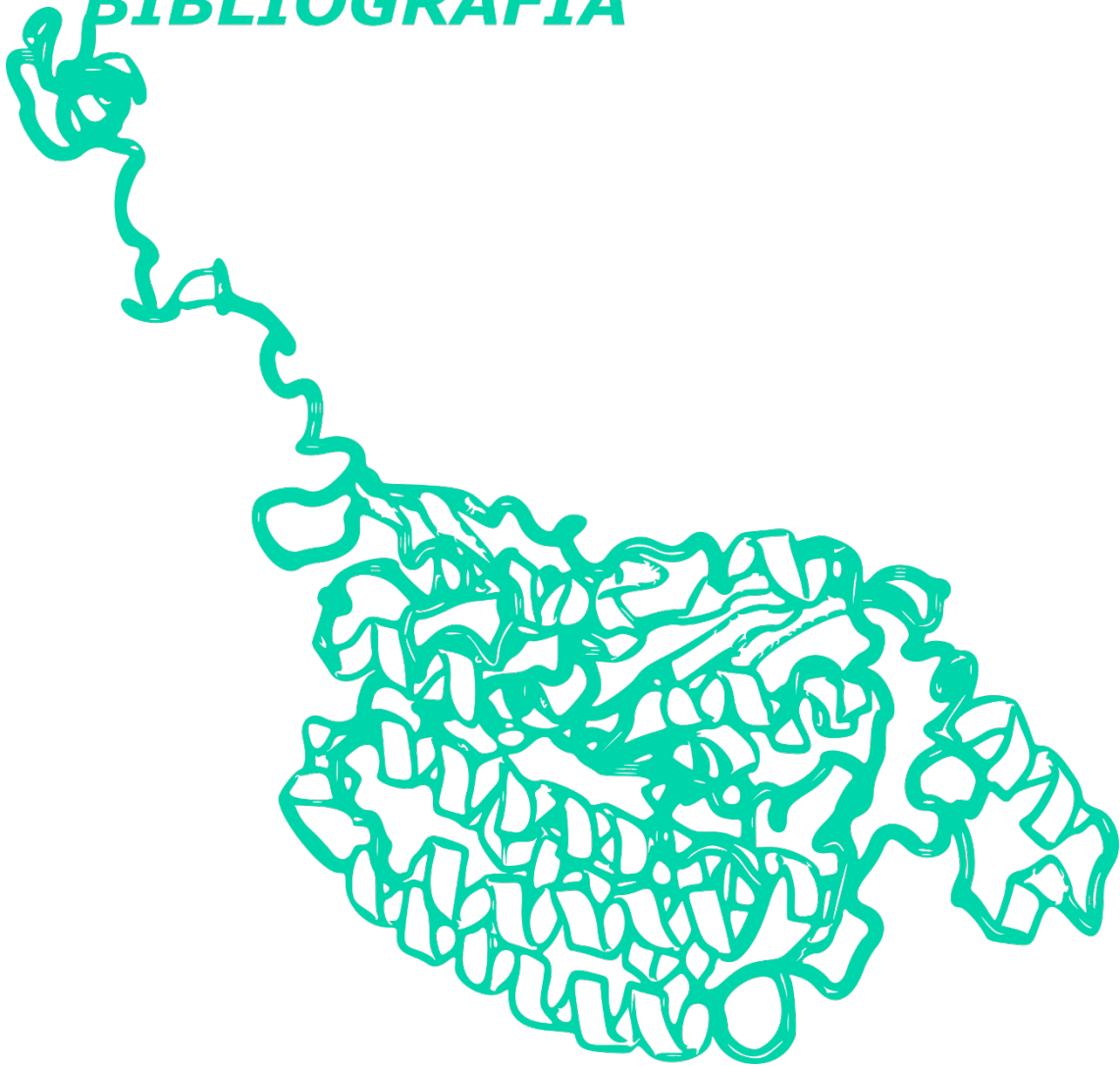
apoptosis y glicólisis y perjudicando el tejido [217]. Además, en mamífero, NDUFS2 también actúa como sensor de oxígeno, induciendo vasoconstricción en células pulmonares en condiciones hipóxicas [218].

Conociendo las implicaciones en el metabolismo de NDUFS2 en humano, y su ortólogo CG1970 en *Drosophila*, con esta tesis doctoral, por un lado, se arroja luz sobre las rutas de señalización que tienen lugar entre diferentes órganos y sistemas en las enfermedades mitocondriales cardiovasculares [76]. Por otro lado, se señala el potencial rol como marcador de componentes de la ruta de la insulina (ImpL2, IGF1, IGFBP7, etcétera) en enfermedades multisistémicas y cardiovasculares.

CONCLUSIONES

1. La interferencia cardio-específica de la expresión del gen *NDUFS2* causa cardiopatía dilatada no hipertrófica asociada a una aceleración del ritmo cardíaco en *Drosophila melanogaster*.
2. La cardiomiopatía dilatada causada por la interferencia de *NDUFS2* en el corazón aumenta la mortalidad en un 317% al comparar con *Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸*.
3. La reducción cardio-específica de la expresión de *NDUFS2* causa una disminución del tamaño de los adipocitos del 329%, así como un incremento de los niveles de triglicéridos y trehalosa circulantes.
4. La pérdida parcial de función de *NDUFS2* en el corazón induce un aumento de la secreción de ImpL2 desde el corazón, responsable directo de la disminución de tamaño y contenido lipídico de los adipocitos.
5. La deficiencia de ImpL2 junto con la interferencia cardio-específica de la expresión de *NDUFS2* aumenta la mortalidad en un 459% comparado con *Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸*.
6. El aumento de secreción de *ImpL2* por la pérdida de función de *NDUFS2* cardio-específica induce una translocación de Foxo a los núcleos de los adipocitos más prolongada en el tiempo que en *Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸*.
7. La interferencia del gen *NDUFS2* en el músculo indirecto de vuelo causa una reducción de actividad del complejo I del 60%, así como un aumento de la secreción de ImpL2 desde el músculo de vuelo que causa lipodistrofia.
8. ImpL2 es el intermediario preferente de la señalización desde tejido muscular con pérdida de función del complejo I al tejido adiposo abdominal.

BIBLIOGRAFÍA



1. Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet* 2006;**368**:70-82.
2. Schieppati A, Henter JI, Daina E *et al.* Why rare diseases are an important medical and social issue. *Lancet* 2008;**371**:2039-41.
3. Stenton SL, Prokisch H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine* 2020;**56**:102784.
4. Yen MY, Wang AG, Wei YH. Leber's hereditary optic neuropathy: A multifactorial disease. *Prog Retin Eye Res* 2006;**25**:381-96.
5. Schapira AHV. Mitochondrial diseases. *The Lancet*. Vol 379. Elsevier B.V., 2012, 1825-34.
6. Anand SK, Tikoo SK. Viruses as modulators of mitochondrial functions. *Adv Virol* 2013;**2013**:17.
7. Rath S, Sharma R, Gupta R *et al.* MitoCarta3.0: An updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res* 2021;**49**:D1541-7.
8. Al Khatib I, Shutt TE. Advances Towards Therapeutic Approaches for mtDNA Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1158. Springer New York LLC, 2019, 217-46.
9. Dard L, Blanchard W, Hubert C *et al.* Mitochondrial functions and rare diseases. *Mol Aspects Med* 2020;**71**:100842.
10. Miller FJ, Rosenfeldt FL, Zhang C *et al.* Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**:e61-e61.
11. Taanman JW. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1999;**1410**:103-23.
12. Blik AM Van Der, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. 2013:1-16.
13. Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* 2015;**4**:6-13.
14. Stewart JB, Chinnery PF. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet* 2015;**16**:530-42.
15. Gonçalves VF. Mitochondrial Genetics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 1158. Springer New York LLC, 2019, 247-55.
16. Christie JR, Schaerf TM, Beekman M. Selection against heteroplasmy explains the evolution of uniparental inheritance of mitochondria. *PLoS Genet* 2015;**11**:e1005112.
17. McWilliams TG, Suomalainen A. Mitochondrial DNA can be inherited from fathers, not just mothers. *Nature* 2019;**565**:296-7.
18. Timmis JN, Ayliff MA, Huang CY *et al.* Endosymbiotic gene transfer: Organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 2004;**5**:123-35.
19. Zachar I, Boza G. Endosymbiosis before eukaryotes: mitochondrial establishment in protoeukaryotes. *Cell Mol Life Sci* 2020;**77**:3503-23.
20. Berg OG, Kurland CG. Why mitochondrial genes are most often found in nuclei. *Mol Biol Evol* 2000;**17**:951-61.

21. Daubin V, Szo GJ. Horizontal Gene Transfer and the History of Life. 2016, DOI: 10.1101/cshperspect.a018036.
22. Dean R, Zimmer F, Mank JE. Deficit of mitonuclear genes on the human X chromosome predates sex chromosome formation. *Genome Biol Evol* 2015;**7**:636-41.
23. DiMauro S, Hirano M. Pathogenesis and treatment of mitochondrial disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 652. Springer, Dordrecht, 2009, 139-70.
24. Alston CL, Stenton SL, Hudson G *et al*. The genetics of mitochondrial disease: dissecting mitochondrial pathology using multi-omic pipelines. *J Pathol* 2021, DOI: 10.1002/path.5641.
25. Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science (80-)* 2015;**349**:1494-9.
26. Rusecka J, Kaliszewska M, Bartnik E *et al*. Nuclear genes involved in mitochondrial diseases caused by instability of mitochondrial DNA. *J Appl Genet* 2018;**59**:43-57.
27. Wollweber F, von der Malsburg K, van der Laan M. Mitochondrial contact site and cristae organizing system: A central player in membrane shaping and crosstalk. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2017;**1864**:1481-9.
28. Baker MJ, Tatsuta T, Langer T. Quality Control of Mitochondrial Proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;**3**:a007559-a007559.
29. Van Der Bliek AM, Sedensky MM, Morgan PG. Cell biology of the mitochondrion. *Genetics* 2017;**207**:843-71.
30. Zieliński ŁP, Smith AC, Smith AG *et al*. Metabolic flexibility of mitochondrial respiratory chain disorders predicted by computer modelling. *Mitochondrion* 2016;**31**:45-55.
31. Dudkina N V, Kudryashev M, Stahlberg H *et al*. Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. 2011;**108**, DOI: 10.1073/pnas.1107819108/-/DCSupplemental.
32. Chaban Y, Boekema EJ, Dudkina N V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2014;**1837**:418-26.
33. Torraco A, Peralta S, Iommarini L *et al*. Mitochondrial diseases part I: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion* 2015;**21**:76-91.
34. Zhu J, Vinothkumar KR, Hirst J. Structure of mammalian respiratory complex i. *Nature* 2016;**536**:354-8.
35. Baysal BE, Rubinstein WS, Taschner PE. Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorders. *J Mol Med* 2001;**79**:495-503.
36. Bénit P, Lebon S, Rustin P. Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2009;**1793**:181-5.
37. Lazarou M, Smith SM, Thorburn DR *et al*. Assembly of nuclear DNA-encoded subunits into mitochondrial complex IV, and their preferential integration into supercomplex forms in patient mitochondria. *FEBS J* 2009;**276**:6701-13.
38. Hong S, Pedersen PL. ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized To Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas. *Microbiol Mol*

Biol Rev 2008;**72**:590-641.

39. Rodenburg RJ. Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2016;**1857**:938-45.
40. Sharma L, Lu J, Bai Y. Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Curr Med Chem* 2009;**16**:1266-77.
41. Pagniez-Mammeri H, Rak M, Legrand A *et al.* *Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin. II. Non-structural genes.* Academic Press, 2012:173-9.
42. Stroud DA, Surgenor elliot, Formosa L *et al.* Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nat Publ Gr* 2016;**538**, DOI: 10.1038/nature19754.
43. Rhooms SK, Murari A, Goparaju NSV *et al.* Insights from *Drosophila* on mitochondrial complex I. *Cell Mol Life Sci* 2020;**77**:607-18.
44. Tuppen HAL, Hogan VE, He L *et al.* The p.M292T NDUFS2 mutation causes complex I-deficient Leigh syndrome in multiple families. *Brain* 2010;**133**:2952-63.
45. Procaccio V, De Sury R, Martinez P *et al.* *Mapping to 1q23 of the human gene (NDUFS2) encoding the 49-kDa subunit of the mitochondrial respiratory Complex I and immunodetection of the mature protein in mitochondria.* Springer New York LLC, 1998:482-4.
46. Pagniez-Mammeri H, Loublier S, Legrand A *et al.* Mitochondrial complex I deficiency of nuclear origin. I. Structural genes. *Mol Genet Metab* 2012;**105**:163-72.
47. Loeffen J, Elpeleg O, Smeitink J *et al.* Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Ann Neurol* 2001;**49**:195-201.
48. Ngu LH, Nijtmans LG, Distelmaier F *et al.* A catalytic defect in mitochondrial respiratory chain complex I due to a mutation in NDUFS2 in a patient with Leigh syndrome. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2012;**1822**:168-75.
49. Marin SE, Mesterman R, Robinson B *et al.* Leigh syndrome associated with mitochondrial complex I deficiency due to novel mutations In NDUFV1 and NDUFS2. *Gene* 2013;**516**:162-7.
50. Stenson PD, Mort M, Ball · Edward V *et al.* The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 2017;**136**:665-77.
51. Gerber S, Ding MG, Gérard X *et al.* Compound heterozygosity for severe and hypomorphic NDUFS2 mutations cause non-syndromic LHON-like optic neuropathy. *J Med Genet* 2017;**54**:346-56.
52. Rubrecht A, Clapp W, Shenoy A. Liver Pathology in Mitochondrial Complex I Deficiency from Bi-Allelic Mutations in NDUFS2: A Report of Findings at Autopsy. *Fetal Pediatr Pathol* 2020;**39**:259-62.
53. Yang Y, Yang XL, Lin Y *et al.* LASS2 regulates hepatocyte steatosis by interacting with NDUFS2/OXPHOS related proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2020;**526**:871-9.
54. Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S *et al.* Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.* Vol 1659. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 136-47.

55. Schiff M, Ogier de Baulny H, Lombès A. Neonatal cardiomyopathies and metabolic crises due to oxidative phosphorylation defects. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011;**16**:216-21.
56. El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial Cardiomyopathies. *Front Cardiovasc Med* 2016;**3**, DOI: 10.3389/fcvm.2016.00025.
57. Ritchie H, Roser M. Causes of Death, Our World in Data. *Our World Data* 2018.
58. Thomas H, Diamond J, Vieco A *et al.* Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control. *Glob Heart* 2018;**13**:143-63.
59. By Mayo Clinic Staff. Heart disease - Symptoms and causes - Mayo Clinic. © 1998-2019 *Mayo Found Med Educ Res (MFMER) All rights Reserv* 2018.
60. Tan J, Wagner M, Stenton SL *et al.* Lifetime risk of autosomal recessive mitochondrial disorders calculated from genetic databases. *EBioMedicine* 2020;**54**:102730.
61. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M *et al.* Mitochondria and cardiovascular diseases—from pathophysiology to treatment. *Ann Transl Med* 2018;**6**:256-256.
62. Hammerling BC, Gustafsson ÅB. Mitochondrial quality control in the myocardium: Cooperation between protein degradation and mitophagy. *J Mol Cell Cardiol* 2014;**75**:122-30.
63. Shires SE, Gustafsson ÅB. Mitophagy and heart failure. *J Mol Med* 2015;**93**:253-62.
64. Dorn GW. Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO Mol Med* 2015;**7**:865-77.
65. Kubli DA, Gustafsson ÅB. Mitochondria and mitophagy: The yin and yang of cell death control. *Circ Res* 2012;**111**:1208-21.
66. Svaguša T, Martinić M, Martinić M *et al.* Mitochondrial unfolded protein response, mitophagy and other mitochondrial quality control mechanisms in heart disease and aged heart. *Croat Med J* 2020;**61**:126-38.
67. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *J Clin Invest* 2018;**128**:3716-26.
68. Bisaccia G, Ricci F, Gallina S *et al.* Mitochondrial dysfunction and heart disease: Critical appraisal of an overlooked association. *Int J Mol Sci* 2021;**22**:1-19.
69. Van Bilsen M, Smeets PJH, Gilde AJ *et al.* Metabolic remodelling of the failing heart: The cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res* 2004;**61**:218-26.
70. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: Molecular mechanisms. *J Exp Biol* 2006;**209**:2320-7.
71. Holmgren D, Wåhlander H, Eriksson BO *et al.* Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease: Clinical course and cardiological findings. *Eur Heart J* 2003;**24**:280-8.
72. McKenna WJ, Maron BJ, Thiene G. Classification, epidemiology, and global burden of cardiomyopathies. *Circ Res* 2017;**121**:722-30.
73. Griffiths EJ. Mitochondria and heart disease. *Adv Exp Med Biol* 2012;**942**:249-67.
74. Meyers DE, Basha HI, Koenig MK. Mitochondrial cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnosis, and management. *Texas Hear Inst J* 2013;**40**:385-94.

75. Yu E, Mercer J, Bennett M. Mitochondria in vascular disease. *Cardiovasc Res* 2012;**95**:173-82.
76. Oishi Y, Manabe I. Organ System Crosstalk in Cardiometabolic Disease in the Age of Multimorbidity. *Front Cardiovasc Med* 2020;**7**:64.
77. Van Linthout S, Tschöpe C. Inflammation – Cause or Consequence of Heart Failure or Both? *Curr Heart Fail Rep* 2017;**14**:251-65.
78. Jahng JWS, Song E, Sweeney G. Crosstalk between the heart and peripheral organs in heart failure. *Exp Mol Med* 2016;**48**:e217.
79. Nishida K, Otsu K. Inflammation and metabolic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2017;**113**:389-98.
80. Yamanaka Y, Wilson EM, Rosenfeld RG *et al*. Inhibition of insulin receptor activation by insulin-like growth factor binding proteins. *J Biol Chem* 1997;**272**:30729-34.
81. van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging Dis* 2010;**1**:147-57.
82. Higashi Y, Gautam S, Delafontaine P *et al*. IGF-1 and cardiovascular disease. *Growth Horm IGF Res* 2019;**45**:6-16.
83. Kalayci A, Peacock WF, Nagurney JT *et al*. Echocardiographic assessment of insulin-like growth factor binding protein-7 and early identification of acute heart failure. *ESC Hear Fail* 2020;**7**:1664-75.
84. Lorenzo-Almorós A, Tuñón J, Orejas M *et al*. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol* 2017;**16**:28.
85. Waldman M, Cohen K, Yadin D *et al*. Regulation of diabetic cardiomyopathy by caloric restriction is mediated by intracellular signaling pathways involving «SIRT1 and PGC-1 α ». *Cardiovasc Diabetol* 2018;**17**:111.
86. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;**21**:183-203.
87. Sciarretta S, Forte M, Frati G *et al*. New insights into the role of mtor signaling in the cardiovascular system. *Circ Res* 2018;**122**:489-505.
88. Chaanine AH, Jeong D, Liang L *et al*. JNK modulates FOXO3a for the expression of the mitochondrial death and mitophagy marker BNIP3 in pathological hypertrophy and in heart failure. *Cell Death Dis* 2012;**3**:265.
89. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci* 2014;**39**:159-69.
90. Wende AR, O'Neill BT, Bugger H *et al*. Enhanced Cardiac Akt/Protein Kinase B Signaling Contributes to Pathological Cardiac Hypertrophy in Part by Impairing Mitochondrial Function via Transcriptional Repression of Mitochondrion-Targeted Nuclear Genes. *Mol Cell Biol* 2015;**35**:831-46.
91. Shan T, Zhang P, Jiang Q *et al*. Adipocyte-specific deletion of mTOR inhibits adipose tissue development and causes insulin resistance in mice. *Diabetologia* 2016;**59**:1995-2004.
92. Nakamura M, Sadoshima J. Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes. *J Physiol* 2020;**598**:2977-93.
93. Pogue RE, Cavalcanti DP, Shanker S *et al*. Rare genetic diseases: update on

- diagnosis, treatment and online resources. *Drug Discov Today* 2018;**23**:187-95.
94. Wangler MF, Yamamoto S, Chao HT *et al.* Model organisms facilitate rare disease diagnosis and therapeutic research. *Genetics* 2017;**207**:9-27.
95. Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. A brief history of animal modeling. *Mo Med* 2013;**110**:201-5.
96. Vaquer G, Rivière F, Mavris M *et al.* Animal models for metabolic, neuromuscular and ophthalmological rare diseases. 2013, DOI: 10.1038/nrd3831.
97. Yutzey KE, Robbins J. Principles of genetic murine models for cardiac disease. *Circulation* 2007;**115**:792-9.
98. Moon A. Chapter 4 Mouse Models of Congenital Cardiovascular Disease. *Curr Top Dev Biol* 2008;**84**:171-248.
99. Cesarovic N, Lipiski M, Falk V *et al.* Animals in cardiovascular research. *Eur Heart J* 2020;**41**:200-3.
100. Roberts DB. *Drosophila melanogaster*: The model organism. *Entomol Exp Appl* 2006;**121**:93-103.
101. Jennings BH. *Drosophila*-a versatile model in biology & medicine. *Mater Today* 2011;**14**:190-5.
102. Hales KG, Korey CA, Larracuenta AM *et al.* Genetics on the fly: A primer on the *Drosophila* model system. *Genetics* 2015;**201**:815-42.
103. Myers EW, Sutton GG, Delcher AL *et al.* A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science (80-)* 2000;**287**:2196-204.
104. Bosco G, Campbell P, Leiva-Neto JT *et al.* Analysis of *Drosophila* species genome size and satellite DNA content reveals significant differences among strains as well as between species. *Genetics* 2007;**177**:1277-90.
105. John A, Vinayan K, Varghese J. Achiasmy: Male fruit flies are not ready to mix. *Front Cell Dev Biol* 2016;**4**:75.
106. Greenspan RJ. *Fly pushing: the theory and practice of Drosophila genetics*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
107. Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 1993;**118**:401-15.
108. Dietzl G, Chen D, Schnorrer F *et al.* A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 2007;**448**:151-6.
109. Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:9-23.
110. Piazza N, Wessells RJ. *Drosophila* models of cardiac disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Vol 100. Elsevier B.V., 2011, 155-210.
111. Wirkner CS, Tögel M, Pass G *et al.* The arthropod circulatory system. *Arthropod Biology and Evolution: Molecules, Development, Morphology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, 343-91.
112. Sláma K. A new look at the comparative physiology of insect and human hearts. *J Insect Physiol* 2012;**58**:1072-81.
113. Taghli-Lamalle O, Plantié E, Jagla K. *Drosophila* in the Heart of Understanding

- Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly. *J Cardiovasc Dev Dis* 2016;**3**:7.
114. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Development and evolution of the metazoan heart. *Dev Dyn* 2019;**248**:634-56.
115. Göpel T, Wirkner CS. Morphological description, character conceptualization and the reconstruction of ancestral states exemplified by the evolution of arthropod hearts. *PLoS One* 2018;**13**, DOI: 10.1371/journal.pone.0201702.
116. Wolf M. J, Rockman H. A. Drosophila, Genetic Screens, and Cardiac Function. *Circ Res* 2011;**109**:794-806.
117. Vogler G, Ocorr K. Visualizing the beating heart in Drosophila. *J Vis Exp* 2009:6-8.
118. Wolf MJ, Rockman HA. Drosophila melanogaster as a model system for the genetics of postnatal cardiac function. *Drug Discov Today Dis Model* 2008;**5**:117-23.
119. Rotstein B, Paululat A. On the Morphology of the Drosophila Heart. *J Cardiovasc Dev Dis* 2016;**3**:15.
120. Alayari NN, Vogler G, Taghli-Lamalle O *et al*. Fluorescent labeling of drosophila heart structures. *J Vis Exp* 2009:32.
121. Wolf MJ. Modeling Dilated Cardiomyopathies in Drosophila. *Trends Cardiovasc Med* 2012;**22**:55-61.
122. Ugur B, Chen K, Bellen HJ. Drosophila tools and assays for the study of human diseases. *DMM Dis Model Mech* 2016;**9**:235-44.
123. Porcelli D, Barsanti P, Pesole G *et al*. The nuclear OXPHOS genes in insecta: A common evolutionary origin, a common cis-regulatory motif, a common destiny for gene duplicates. *BMC Evol Biol* 2007;**7**:215.
124. Tricoire H, Palandri A, Bourdais A *et al*. Methylene blue rescues heart defects in a drosophila model of friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet* 2014;**23**:968-79.
125. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E *et al*. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;**9**:676-82.
126. Larkin A, Marygold SJ, Antonazzo G *et al*. FlyBase: Updates to the Drosophila melanogaster knowledge base. *Nucleic Acids Res* 2021;**49**:D899-907.
127. Thurmond J, Goodman JL, Strelets VB *et al*. FlyBase 2.0: The next generation. *Nucleic Acids Res* 2019;**47**:D759-65.
128. Song W, Veenstra JA, Perrimon N. Control of lipid metabolism by tachykinin in Drosophila. *Cell Rep* 2014;**9**:40-7.
129. Williams MJ, Wiemerslage L, Gohel P *et al*. Dibutyl Phthalate Exposure Disrupts Evolutionarily Conserved Insulin and Glucagon-Like Signaling in *Drosophila* Males. *Endocrinology* 2016;**157**:2309-21.
130. Kwon Y, Song W, Droujinine IA *et al*. Systemic organ wasting induced by localized expression of the secreted Insulin/IGF antagonist ImpL2. *Dev Cell* 2015;**33**:36-46.
131. Ferguson M, Mockett RJ, Shen Y *et al*. Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* 2005;**390**:501-11.
132. Bodmer R. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. *Development* 1993;**118**:719 LP - 729.

133. Lo PCH, Frasch M. A role for the COUP-TF-related gene seven-up in the diversification of cardioblast identities in the dorsal vessel of *Drosophila*. *Mech Dev* 2001;**104**:49-60.
134. Miller DE, Cook KR, Arvanitakis A V. *et al*. Third Chromosome Balancer Inversions Disrupt Protein-Coding Genes and Influence Distal Recombination Events in *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 2016;**6**:1959-67.
135. Abstracts of the 41st European Muscle Conference. *J Muscle Res Cell Motil* 2012;**33**:235-89.
136. Pei H, Yang Y, Zhao H *et al*. The Role of Mitochondrial Functional Proteins in ROS Production in Ischemic Heart Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016;**2016**, DOI: 10.1155/2016/5470457.
137. Bénit P, Beugnot R, Chretien D *et al*. Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mutat* 2003;**21**:582-6.
138. Gopinathannair R, Etheridge SP, Marchlinski FE *et al*. Arrhythmia-Induced Cardiomyopathies Mechanisms, Recognition, and Management. *J Am Coll Cardiol* 2015;**66**:1714-28.
139. Spruance SL, Reid JE, Grace M *et al*. Hazard ratio in clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;**48**:2787-92.
140. 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**:528-41.
141. Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 2010;**55**:207-25.
142. Zheng H, Yang X, Xi Y. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sci* 2016;**167**:22-31.
143. Grönke S, Müller G, Hirsch J *et al*. Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biol* 2007;**5**:1248-56.
144. Becker A, Schlöder P, Steele JE *et al*. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* 1996;**52**:433-9.
145. Qiao HH, Wang F, Xu RG *et al*. An efficient and multiple target transgenic RNAi technique with low toxicity in *Drosophila*. *Nat Commun* 2018;**9**, DOI: 10.1038/s41467-018-06537-y.
146. Gross DN, Wan M, Birnbaum MJ. *The role of FOXO in the regulation of metabolism*. *Curr Diab Rep*, 2009:208-14.
147. Hay N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2011;**1813**:1965-70.
148. Zid BM, Rogers AN, Katewa SD *et al*. 4E-BP Extends Lifespan upon Dietary Restriction by Enhancing Mitochondrial Activity in *Drosophila*. *Cell* 2009;**139**:149-60.
149. Honegger B, Galic M, Köhler K *et al*. Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *J Biol* 2008;**7**:10.
150. Sarraf-Zadeh L, Christen S, Sauer U *et al*. Local requirement of the *Drosophila* insulin binding protein imp-L2 in coordinating developmental progression with

nutritional conditions. *Dev Biol* 2013;**381**:97-106.

151. Alic N, Hoddinott MP, Vinti G *et al.* Lifespan extension by increased expression of the *Drosophila* homologue of the IGF1R tumour suppressor. *Aging Cell* 2011;**10**:137-47.

152. Gabriela K, Adam B, Pavla N *et al.* Macrophage-derived insulin/IGF antagonist ImpL2 regulates systemic metabolism for mounting an effective acute immune response in *Drosophila*. *bioRxiv* 2020:2020.09.24.311670.

153. Hwangbo DS, Garsham B, Tu MP *et al.* *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 2004;**429**:562-6.

154. Dogan SA, Pujol C, Maiti P *et al.* Article Tissue-Specific Loss of DARS2 Activates Stress Responses Independently of Respiratory Chain Deficiency in the Heart. *Cell Metab* 2014;**19**:458-69.

155. Ishiwata K, Sasaki G, Ogawa J *et al.* Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2011;**58**:169-80.

156. Renato Pinto J, Mamidi R, Joan Grove T *et al.* Evolution of Flight Muscle Contractility and Energetic Efficiency. *Front Physiol* 2020;**11**:1038.

157. Iwamoto H. Structure, function and evolution of insect flight muscle. *Biophysics (Oxf)* 2011;**7**:21-8.

158. Nongthomba U, Pasalodos-Sanchez S, Clark S *et al.* Expression and function of the *Drosophila* ACT88F actin isoform is not restricted to the indirect flight muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 2001;**22**:111-9.

159. Shimada S, Oosaki M, Takahashi R *et al.* A unique respiratory adaptation in *Drosophila* independent of supercomplex formation. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2018;**1859**:154-63.

160. Sink H. An Introduction to Muscle Development in *Drosophila*. *Muscle Development in Drosophila*. Springer New York, 2007, 1-7.

161. Kramer JM, Davidge JT, Lockyer JM *et al.* Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. *BMC Dev Biol* 2003;**3**:1-14.

162. Hughes SE, McKenna WJ. New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy. *Heart* 2005;**91**:257-64.

163. Herrero J, Muffato M, Beal K *et al.* Ensembl comparative genomics resources. *Database* 2016;**2016**:bav096.

164. Hallier B, Hoffmann J, Roeder T *et al.* The bHLH transcription factor hand regulates the expression of genes critical to heart and muscle function in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2015;**10**, DOI: 10.1371/journal.pone.0134204.

165. Tennessen JM, Baker KD, Lam G *et al.* The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metab* 2011;**13**:139-48.

166. Hill JA, Olson EN, Biology M-L. *Mechanisms of Disease Cardiac Plasticity.*, 2008.

167. Shah AP, Nongthomba U, Kelly Tanaka KK *et al.* Cardiac remodeling in *Drosophila* arises from changes in actin gene expression and from a contribution of lymph gland-like cells to the heart musculature. *Mech Dev* 2011;**128**:222-33.

168. Little WC, Freeman GL. Pericardial Disease. 2006, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561514.
169. Nishimura M, Ocorr K, Bodmer R *et al.* Drosophila as a model to study cardiac aging. *Exp Gerontol* 2011;**46**:326-30.
170. Fu D guan. Cardiac Arrhythmias: Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell Biochem Biophys* 2015;**73**:291-6.
171. Tuunanen H, Knuuti J. Metabolic remodelling in human heart failure. *Cardiovasc Res* 2011;**90**:251-7.
172. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF *et al.* Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* 2016;**106**:62-9.
173. Liang C, Ahmad K, Sue CM. The broadening spectrum of mitochondrial disease: Shifts in the diagnostic paradigm. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2014;**1840**:1360-7.
174. DiAngelo JR, Birnbaum MJ. Regulation of Fat Cell Mass by Insulin in Drosophila melanogaster. *Mol Cell Biol* 2009;**29**:6341-52.
175. Palm W, Sampaio JL, Brankatschk M *et al.* Lipoproteins in Drosophila melanogaster—Assembly, Function, and Influence on Tissue Lipid Composition. P. Kühnlein R (ed.). *PLoS Genet* 2012;**8**:e1002828.
176. Diop SB, Bodmer R. Gaining Insights into Diabetic Cardiomyopathy from Drosophila. *Trends Endocrinol Metab* 2015;**26**:618-27.
177. Na J, Musselman LP, Pendse J *et al.* A Drosophila Model of High Sugar Diet-Induced Cardiomyopathy. Rulifson E (ed.). *PLoS Genet* 2013;**9**:e1003175.
178. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL *et al.* Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ Res* 2017;**118**:1593-611.
179. Song W, Cheng D, Hong S *et al.* Midgut-Derived Activin Regulates Glucagon-like Action in the Fat Body and Glycemic Control. *Cell Metab* 2017;**25**:386-99.
180. Droujinine IA, Perrimon N. Interorgan Communication Pathways in Physiology: Focus on Drosophila. *Annu Rev Genet* 2016;**50**:539-70.
181. Song W, Owusu-Ansah E, Hu Y *et al.* Activin signaling mediates muscle-to-adipose communication in a mitochondria dysfunction-associated obesity model. *Proc Natl Acad Sci* 2017;**114**:8596-601.
182. Murakami N, McLennan IS, Nonaka I *et al.* Transforming growth factor- β 2 is elevated in skeletal muscle disorders. *Muscle and Nerve* 1999;**22**:889-98.
183. Upadhyay A, Moss-Taylor L, Kim MJ *et al.* TGF- β family signaling in drosophila. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;**9**, DOI: 10.1101/cshperspect.a022152.
184. Haselton AT, Fridell YWC. Adult Drosophila melanogaster as a model for the study of glucose homeostasis. *Aging (Albany NY)* 2010;**2**:523-6.
185. Nässel DR, Broeck J Vanden. Insulin/IGF signaling in Drosophila and other insects: Factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell Mol Life Sci* 2016;**73**:271-90.
186. Nässel DR, Liu Y, Luo J. Insulin/IGF signaling and its regulation in Drosophila. *Gen Comp Endocrinol* 2015;**221**:255-66.
187. Paik D, Gil Jang Y, Lee YEN *et al.* Misexpression screen delineates novel genes

controlling *Drosophila* lifespan. 2012;**133**:234-45.

188. Figueroa-Clarevega A, Bilder D. Malignant *drosophila* tumors interrupt insulin signaling to induce cachexia-like wasting. *Dev Cell* 2015;**33**:47-55.

189. Bader R, Sarraf-Zadeh L, Peters M *et al.* The IGFBP7 homolog Imp-L2 promotes insulin signaling in distinct neurons of the *Drosophila* brain. *J Cell Sci* 2013;**126**:2571-6.

190. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily*. *Endocr Rev* 1999;**20**:761-87.

191. Chen D, Siddiq A, Emdad L *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-7 (IGFBP7): A promising gene therapeutic for hepatocellular carcinoma (HCC). *Mol Ther* 2013;**21**:758-66.

192. Jin L, Shen F, Weinfeld M *et al.* Insulin Growth Factor Binding Protein 7 (IGFBP7)-Related Cancer and IGFBP3 and IGFBP7 Crosstalk. *Front Oncol* 2020;**10**:727.

193. Kutsukake M, Ishihara R, Momose K *et al.* Circulating IGF-binding protein 7 (IGFBP7) levels are elevated in patients with endometriosis or undergoing diabetic hemodialysis. *Reprod Biol Endocrinol* 2008;**6**:54.

194. Li T, Yan H, Geng Y *et al.* Target genes associated with lipid and glucose metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis* 2019;**18**:1-9.

195. Demontis F, Perrimon N. FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell* 2010;**143**:813-25.

196. Deng X, Zhang W, O-Sullivan IS *et al.* FoxO1 inhibits sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene expression via transcription factors Sp1 and SREBP-1c. *J Biol Chem* 2012;**287**:20132-43.

197. Dutriaux A, Godart A, Brachet A *et al.* The Insulin Receptor Is Required for the Development of the *Drosophila* Peripheral Nervous System. *PLoS One* 2013;**8**:71857.

198. Vihervaara T, Puig O. dFOXO Regulates Transcription of a *Drosophila* Acid Lipase. *J Mol Biol* 2008;**376**:1215-23.

199. Morris BJ, Willcox DC, Donlon TA *et al.* FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. *Gerontology* 2015;**61**:515-25.

200. Grönke S, Clarke D-F, Broughton S *et al.* Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. Rulifson E (ed.). *PLoS Genet* 2010;**6**:e1000857.

201. Bai H, Kang P, Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (*dilp6*) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell* 2012;**11**:978-85.

202. Chen J, Hattori Y, Nakajima K *et al.* Mitochondrial complex I activity is significantly decreased in a patient with maternally inherited type 2 diabetes mellitus and hypertrophic cardiomyopathy associated with mitochondrial DNA C3310T mutation: A cybrid study. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;**74**:148-53.

203. Pouriamehr S, Barmaki H, Rastegary M *et al.* Investigation of insulin-like growth factors/insulin-like growth factor binding proteins regulation in metabolic syndrome patients. *BMC Res Notes* 2019;**12**:653.

204. Zamora M, Villena JA. Contribution of impaired insulin signaling to the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Int J Mol Sci* 2019;**20**, DOI: 10.3390/ijms20112833.

205. Warren-Perry MG, Manley SE, Ostrega D *et al.* A Novel Point Mutation in the Insulin Gene Giving Rise to Hyperproinsulinemia*. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**:1629-31.
206. Haywood NJ, Slater TA, Matthews CJ *et al.* The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes. *Mol Metab* 2019;**19**:86-96.
207. Andersen AS, Hansen H, Kristensen C. A New Secreted Insect Protein Belonging to the Immunoglobulin Superfamily Binds Insulin and Related Peptides and Inhibits Their Activities*. 2000, DOI: 10.1074/jbc.M001578200.
208. Heald AH, Kaushal K, Siddals KW *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) is a marker for the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;**114**:371-6.
209. Lisowska A, Świącki P, Knapp M *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP 7) as a new biomarker in coronary heart disease. *Adv Med Sci* 2019;**64**:195-201.
210. Blice-Baum AC, Zambon AC, Kaushik G *et al.* Modest overexpression of FOXO maintains cardiac proteostasis and ameliorates age-associated functional decline. *Aging Cell* 2017;**16**:93-103.
211. Schmitt-Ney M. The FOXO's Advantages of Being a Family: Considerations on Function and Evolution. *Cells* 2020;**9**:787.
212. Lee S, Dong HH. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J Endocrinol* 2017;**233**:R67-79.
213. Lettieri Barbato D, Aquilano K, Ciriolo MR. FoxO1 at the nexus between fat catabolism and longevity pathways. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2014;**1841**:1555-60.
214. Chen R, Morris BJ, Donlon TA *et al.* FOXO3 longevity genotype mitigates the increased mortality risk in men with a cardiometabolic disease. *Aging (Albany NY)* 2020;**12**:23509-24.
215. Yu L, Zhang W, Huang C *et al.* FoxO4 promotes myocardial ischemia-reperfusion injury: The role of oxidative stress-induced apoptosis. *Am J Transl Res* 2018;**10**:2890-900.
216. Packer M. Longevity genes, cardiac ageing, and the pathogenesis of cardiomyopathy: Implications for understanding the effects of current and future treatments for heart failure. *Eur Heart J* 2020;**41**:3856-61.
217. Perez-Gomez R, Magnin V, Mihajlovic Z *et al.* Downregulation of respiratory complex I mediates major signalling changes triggered by TOR activation. *Sci Rep* 2020;**10**, DOI: 10.1038/s41598-020-61244-3.
218. Dunham-Snary KJ, Wu D, Potus F *et al.* Ndufs2, a Core Subunit of Mitochondrial Complex I, Is Essential for Acute Oxygen-Sensing and Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *Circ Res* 2019;**124**:1727-46.
219. Colinet H, Renault D. Metabolic effects of CO2 anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett* 2012, DOI: 10.1098/RSBL.2012.0601.
220. Jacob AN, Salinas K, Adams-Huet B *et al.* Weight gain in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obes Metab* 2007;**9**:386-93.

ANEXOS

Se resumen aquí una serie de experimentos realizados a lo largo del proyecto los cuales, aunque no esenciales para el mismo, ayudan a arrojar más información al conjunto de la tesis doctoral.

1. Detección e identificación transgenes

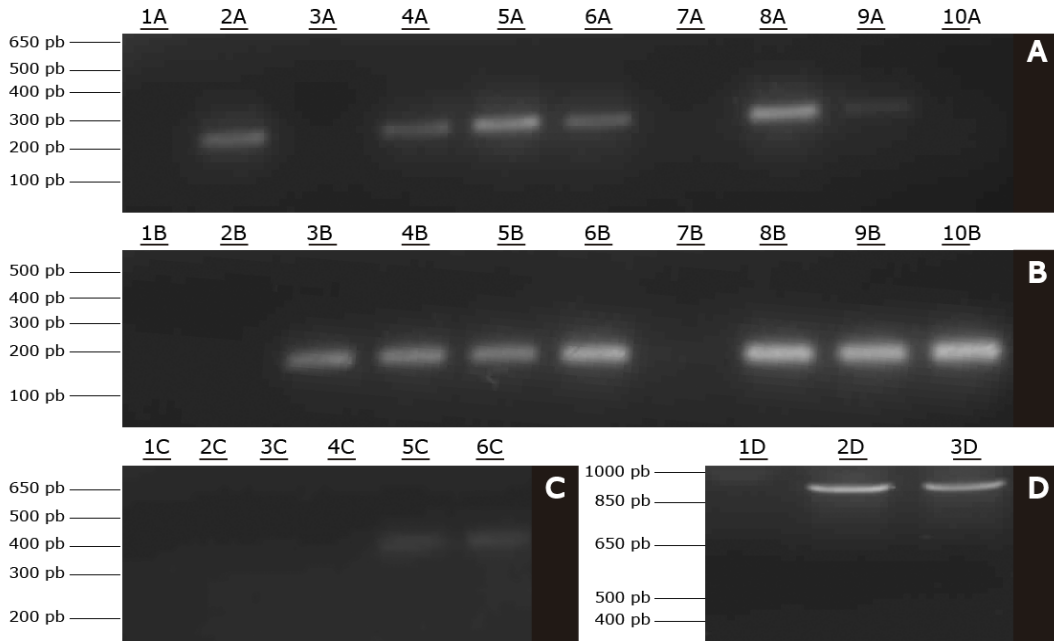


Figura 1. Geles electroforesis para identificación genómica. En la imagen se representa la información descrita previamente en la tabla. La presencia o ausencia del amplicón determina la presencia del transgén de interés. En el gel (A), los carriles corresponden a las líneas: *w¹¹¹⁸*; *TINcΔ4*; *UAS-NDUFS2i*; *TINcΔ4>NDUFS2i*; *TINcΔ4>ImpL2i*; *TINcΔ4>ImpL2i*, *NDUFS2i*; *ImpL2^{-/-}*; *TINcΔ4>NDUFS2i*, *ImpL2^{-/-}*; *TINcΔ4>ImpL2* e *UAS-ImpL2*. Corresponde la misma secuencia para el gel (B). Respecto al gel (C) las muestras analizadas son: *w¹¹¹⁸*; *TINcΔ4*; *NDUFS2i*; *TINcΔ4>NDUFS2i*; *TINcΔ4>ImpL2i*; *TINcΔ4>ImpL2i*; *NDUFS2i*. Por último, en el gel (D) las líneas que aparecen: *w¹¹¹⁸*; *ImpL2^{-/-}*, *TINcΔ4>NDUFS2i*, *ImpL2^{-/-}*.

En resumen, se confirma la identidad genómica esperada de las líneas de *Drosophila melanogaster* manipuladas, con lo que los fenotipos asociados se deben exclusivamente a la configuración transgénica y la manipulación de los animales.

2. Contabilización latidos en moscas tratadas con CO₂

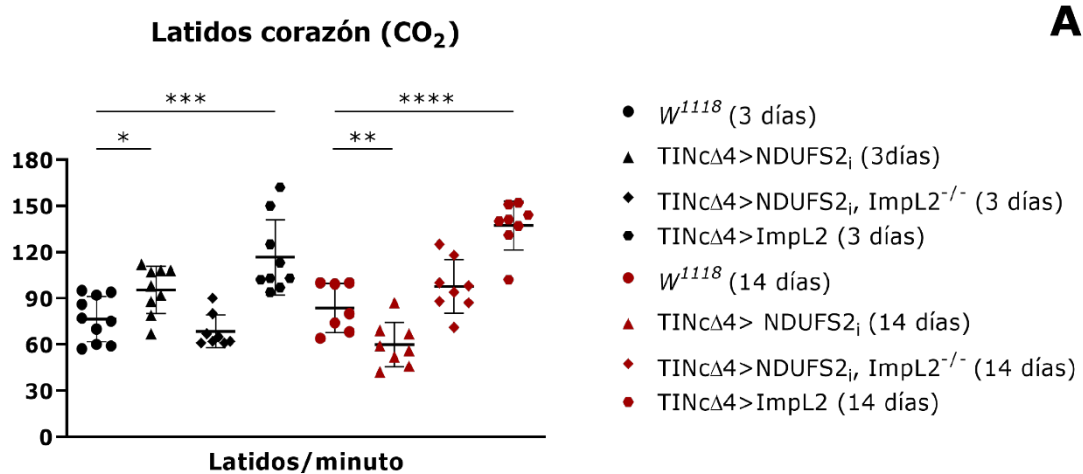
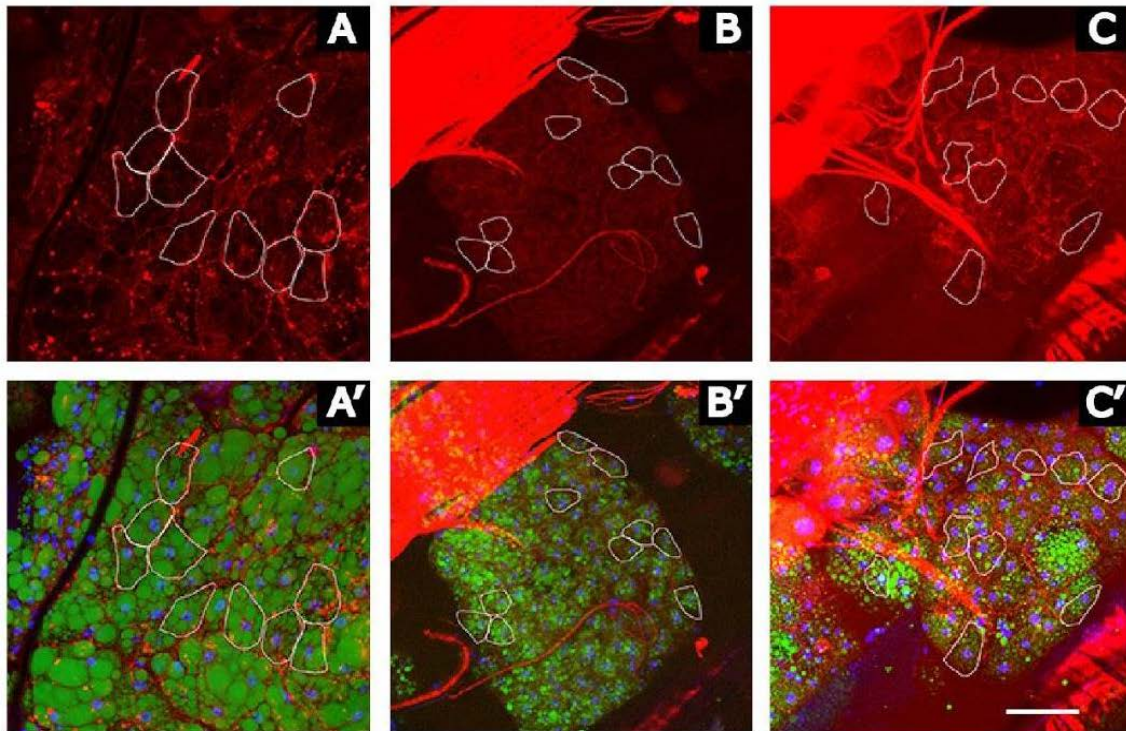


Figura 2. La anestesia de moscas interferidas para *NDUFS2* en el corazón con CO₂ afecta a la frecuencia cardíaca. En moscas adultas de 3 y 14 días, se compara el número de latidos cada minuto de diferentes genotipos (A). Para ello, se contabilizan de forma manual los latidos cada minuto en los abdómenes diseccionados bajo una lupa a 10 aumentos. N>7. T-Student **** p-valor<0,0001, ***p-valor<0,001 **p-valor<0,01 y *p-valor<0,05.

En investigaciones previas a esta tesis, se ha demostrado que la exposición de estos animales a suficientes cantidades de CO₂ altera la frecuencia y ritmo cardíacos de animales sanos [219]. Se quería comprobar qué efecto tenía la exposición de 3 minutos de CO₂ a las moscas cuyo *NDUFS2* está interferido, además si la supresión del gen *ImpL2* puede contribuir al mismo. Como se puede observar (A), la frecuencia cardíaca en las moscas con *NDUFS2* interferido a los 14 días de edad es menor lo cual implica una mayor sensibilidad ante una situación de estrés. La supresión de *ImpL2* no da lugar a diferencias significativas respecto del control, mientras que su sobreexpresión (lo que está ligado a una degeneración de los adipocitos) aumenta el número de latidos cada minuto de forma estadísticamente significativa. Estos resultados apuntan a que el nivel de degeneración de cuerpos grasos está estrechamente relacionado con la frecuencia de latidos. Sería crucial determinar si esta aceleración del ritmo cardíaco es un mecanismo de compensación del animal para paliar el cambio metabólico mediado por Foxo.

3. Supresión *ImpL2* en moscas envejecidas



Grasa moscas envejecidas (medias) E

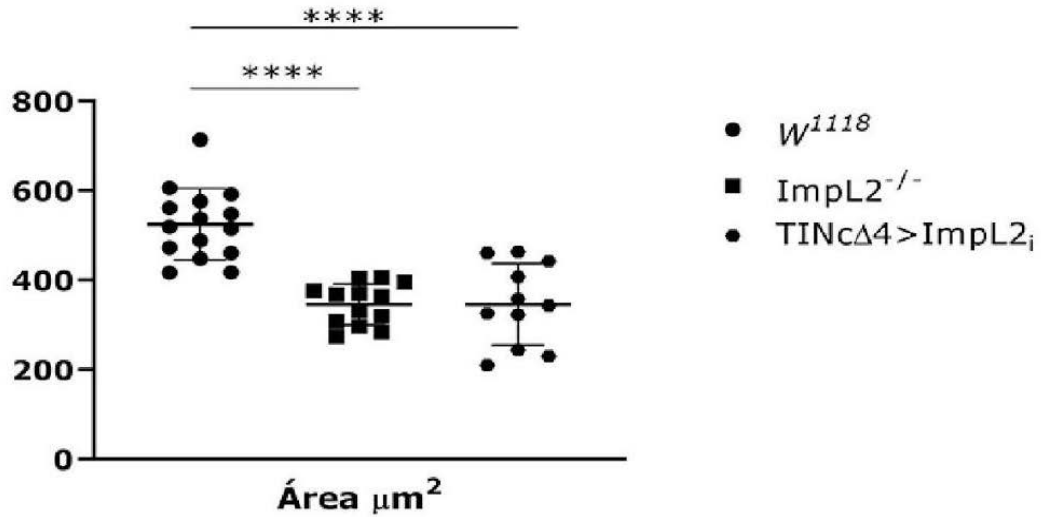


Figura 3. La pérdida de función de *ImpL2* en moscas envejecidas provoca una reducción del tamaño de los adipocitos, fenotipo que recuerda al del síndrome metabólico. Fotografías en microscopía confocal de un cuerpo graso de 50 días de edad de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *ImpL2^{-/-}* y *TINcΔ4>ImpL2_i* con la tinción de faloidina Alexa Fluor® 647 (rojo) (A, B, C y D). Idéntico plano de microscopía confocal incluyendo Hoechst® (azul) y rojo N1142® (verde) de los genotipos *w¹¹¹⁸*, *ImpL2^{-/-}* y *TINcΔ4>ImpL2_i* (A', B' y C'). Se muestran las mediciones del área media de los adipocitos por mosca (E) en micras cuadradas. Escala 50 µm. N moscas (E) ≥11. T-Student con ****p-valor<0,0001.

Se puede observar una reducción de hasta el 35% en el tamaño medio de los adipocitos, comparando los adipocitos de moscas control con *ImpL2*^{-/-}. Este resultado apunta a que la reducción total (*ImpL2*^{-/-}) o parcial (*TINcΔ4>ImpL2i*) del gen *ImpL2* hace que dichos péptidos estén activos más tiempo. Esto induce a los cuerpos grasos a desarrollar un mecanismo de resistencia a insulina. De ese modo, se evitaría una acumulación y/o transformación excesiva de glúcidos circulantes, aunque podría ralentizar la absorción de nutrientes, lo cual se refleja en el menor contenido de gotas de lípidos que tienen estos animales envejecidos. Este fenotipo es similar al hallado en pacientes de diabetes tipo 2, ya que la ganancia de peso se resiente [220] en condiciones de dieta normales. Sería de gran interés terminar de caracterizar este fenotipo en *Drosophila*, lo cual permita trasladarlo a un modelo mamífero sobre la actuación prolongada y eliminación de la insulina, siendo esto último un proceso menos conocido.

4. Vídeos de los cambios de fisiología cardíaca en *Drosophila melanogaster*

Los datos de latidos cada minuto de los corazones se obtuvieron de vídeos generados con FIJI de los fotogramas capturados con un Cell Observer ([Contabilización de latidos cada minuto de corazones de hembras adultas](#)). Además de la notable diferencia de tamaño, se observa la mayor irregularidad en la frecuencia cardíaca de los ejemplares *TINcΔ4>NDUFS2i* independientemente de la edad que tengan estos.

Se adjuntan las siguientes URL privadas que permiten la visualización de los vídeos.

[W¹¹⁸ 3 días – visualización latidos corazón](#)

[W¹¹⁸ 14 días – visualización latidos corazón](#)

[TINcΔ4>NDUFS2i 3 días – visualización latidos corazón](#)

[TINcΔ4>NDUFS2i 14 días – visualización latidos corazón](#)