

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Bases fisiopatológicas de la deficiencia del factor inductor de apoptosis en corazón y músculo esquelético del ratón *Harlequin*; ejercicio físico como terapia.

TESIS DOCTORAL

Sara Laine Menéndez

Madrid, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Bases fisiopatológicas de la deficiencia del factor inductor de apoptosis en corazón y músculo esquelético del ratón *Harlequin*; ejercicio físico como terapia.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Sara Laine Menéndez

Graduada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directora:

Dra. María Jesús Morán Bermejo

Investigadora Titular del IIS Hospital 12 de Octubre

Laboratorio de Enfermedades Raras, Mitocondriales y Neuromusculares
Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre “imas12”, Madrid.

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12) para la incorporación de becarios a proyectos de investigación, concedido a la Dra. María Jesús Morán Bermejo y asignado a Doña Sara Laine Menéndez, con cargo al proyecto de investigación FIS PI17/00093; así como a la prestación contributiva por desempleo ofrecida por el Servicio Público de Empleo Estatal.

A mis padres

La vida es un proceso físico que cabalga sobre la materia como una ola extraña y lenta. Es un caos controlado y artístico, un conjunto de reacciones químicas tan abrumadoramente complejo que hace más de ochenta millones de años produjo el cerebro mamífero que ahora, en forma humana, escribe cartas de amor y emplea ordenadores para calcular la temperatura de la materia en el origen del universo.

(“¿Qué es la vida?”, Lynn Margulis y Dorion Sagan)

AGRADECIMIENTOS

He realizado esta tesis con ilusión, paciencia, esfuerzo y perseverancia. También algunos momentos de frustración y desesperanza; y no menos de sorpresa y emoción. Con todo, al final, un aprendizaje que me llevo para siempre. Cada uno de vosotros me habéis acompañado, guiado y animado a lo largo de este camino. Habéis sido el cimiento, el plano y la herramienta para construir y construirme. Habéis formado esa red invisible, constante y necesaria que sostiene el mundo. Por todo y a todos, quiero daros las gracias:

A mi directora, **María**.

Por darme la oportunidad y la confianza.
Por todas tus enseñanzas.
Por transmitirme el esfuerzo y el rigor como pilares.
Por capitanear este barco
con paciencia, comprensión, atención y dulzura
y no permitir nunca que se hunda.
Por luchar cada día para dignificar este oficio.
Hacen falta más jefes como tú en el mundo.

A **Joaquín y Miguel Ángel**,

por dejarme un lugar en vuestro gran equipo.
A **Paco y Cristina**,
por la ayuda, los ánimos y la ciencia compartida.

A **Miguel**.

Por estar, día a día, paso a paso.
Por enseñarme, ayudarme, aconsejarme, sosejarme
y salvarme cuando las cosas parecían perdidas.
Y por todo lo demás,
que lo es absolutamente todo:
las conversaciones, las risas,
el café de media mañana, las cañitas de después,
las carreras, los planes, los viajes.
Tanto, tanto, tanto...

A **Javi**.

Por pintar cada día de un tono ligero y divertido
(con esa manera en la que haces
que me ría y me enfade al mismo tiempo).
Por todo lo vivido:
memorable, innumerable, inigualable
(incluidas nuestras apariciones estelares
por los karaokes de Madrid).
Por lograr la confianza y la complicidad
(un secreto: lo de Estocolmo era mentira).

A **Vero**.

Por esa conexión mutua, instantánea y especial
que nos atravesó desde el principio,
que nos trajo tantos momentos
de alegría, drama, ansiedad y calma
(ya sabes, así como nosotras somos).
Por seguir siempre a mi lado
siendo amiga, cómplice y confidente.

A **Ana**.

Por habernos (re)conocido.
Por tu risa contagiosa,
la fortaleza y la positividad que emanabas.
Confío en que la vida nos vuelva a juntar de nuevo.

A **Rafa**

—un andaluz de Espejoh con musho arte—.
Por traer la alegría
con tus refranes al revés,
con tus dietas y tus recetas locas.
También por animarme a correr y a subir cuestras
(aunque me quedase abajo preocupada
por mis pulsaciones desorbitadas).
Por aquellos debates sobre tantas cuestiones
físicas y metafísicas.

A **Elena**,

por tu ayuda cada día.

A **Patri**,

por hacerme reír con tu risa explosiva.

A **Laura**,

por generar armonía.

A **Gabriela**,

por tu energía arrolladora y reivindicativa.
Siempre fue un placer compartir espacio-y-tiempo
con vosotras.

A las nuevas
“las pavas”.

Un soplo de viento fresco
tan necesario en el final.

A **María**,

por ser pura diversión.

A **Sandra**,

por tu alegría y tu ternura.

A **Ana**,

por tu voluntad y tesón.

Por vuestros bailes.

A todas las personas del “laboratorio de al lado”.

Por vuestra inestimable ayuda.

Por prestarme tantas cosas.

Por vuestros ricos desayunos.

A **Guille**,

por tener siempre palabras de ánimo
y una sonrisa.

A **Pablo**,

por ser todo amabilidad.

A **Rocío**,

por tu compromiso, entrega y vitalidad.

A **Rodrigo**.

Por aparecer de repente en la sala de revelar
y convertirte en fuente *infinita*
de apoyo e inspiración.

A toda la gente del laboratorio de Cardiorrenal
y de los servicios del imas12.

A **Gema**,

por hacer posible la colaboración
y por tus enseñanzas.

A **Alberto**,

por echar siempre una mano.

A **Laura**,

por esperarme cada día de experimento
con esa luz y motivación que derrochas a raudales.

A **Inés**,

por tu ayuda con los *blue native*.

A **Sarita**,

por tu ayuda dulcificada.

A **Aitor**,

por tu disposición continuada.

A **Montse** y las demás personas del animalario,
por el cuidado de los ratones.

A los ratones.

Al resto de personas del hospital
que en algún momento me tendisteis
una mano,
una sonrisa
o unas palabras.
Os guardo en mi mente.

A aquellos con los que coincidí
en la Facultad de Medicina.

A **Juan y Marga**,

porque con vosotros empecé a entender
qué era la ciencia.

A **Miguel**,

por tener siempre buenas palabras para mí.
Y por tutorizar esta tesis.

A **Esther**,

por tu energía y buen humor.

A “los probeta” y al “true B20”,

porque del tiempo compartido
surgió una amistad que se expande cada día.

A **Chema** —hermanito y compi de mil batallas—, por todo.

A **Sara**, por lo vivido y por existir.

A **Belén**, por animarme siempre.

A **Irene**, por tu optimismo.

A **Leti**, por los consejos.

A **Lourdes** —miss simpatía—.

A **Roberto**, siempre es un placer estar contigo.

A **Yolanda**: eres especial.

A **Rodri**.

Por ser lo mejor que me llevé del máster.

Por estar siempre ahí

incluso cuando nos separa un océano.

A mis amigas de la universidad.

Porque con vosotras comenzó
mi andadura en la Biología.

Con vosotras descubrí
innumerables cosas de la vida

(en todas sus acepciones).

Por ser las supervivientes

de ese “equipo gamba”.

Sois, desde luego, las mejores.

A **Marta**: compañera inestimable.

A **Ana**, por permanecer cerca desde lejos.

A **Celia**, por tu honestidad.

A **Alba**, por tu valor y energía.

A mis amigos del cole, barrio y vida.

Por vuestra amistad sincera

que resiste estoicamente el paso del tiempo.

A **Andrea**,

por toda una vida aguantándome.

A **Pablo**,

por tu autenticidad.

A **Cris** —sister—,

siempre te tengo presente.

A **Carlos**,

por encontrarme huecos en tu apretada agenda.

A **Alberto**.

Ningún párrafo

te agradecerá nunca lo suficiente,

mostrará nunca el significado,

reflejará nunca el valor de los hechos.

Por estar a mi lado y permanecer.

Por enseñarme, ayudarme y comprenderme.

Por procurar mi bienestar y felicidad.

Por celebrar conmigo las victorias

y ser consuelo en las derrotas.

Por ser la luz en el camino cuando andaba perdida.

Por ser aliento, recreo, mimo, goce,

refugio, remanso, equilibrio, hogar.

Por ser mi referente; te admiro muchísimo.

A toda tu familia.

A tus padres, por cuidarme tanto.

A **Juan Luis**, por tenderme tu mano.

A **Ana**, por brillar por encima de cualquier tormenta.

A tus amigos:

Luis, Mar, Ale, Hugo, Carlo

Negro, George, Chechu...

Por convertiros también en los míos.

Por darme tanta confianza

(que hasta hizo que os confesase

cierto sueño inconfesable).

A mi familia.
Por suerte, enorme
en número y en corazón.
No sé cómo mostraros todo lo que sois para mí.
A los de Asturias y a los de Madrid.
A mi tía **Luz**,
por ser el mejor ejemplo de fortaleza y superación.
A mis abuelas,
por todo lo que habéis luchado
para que hoy todos estemos y seamos.

A **Pedro y Maite**,
por darme siempre vuestro cariño y apoyo.

A mi hermano, **Álvaro**.
Por ser la persona más especial y maravillosa.
El mayor regalo que me ha dado la vida
es poder compartirla contigo.
No importa lo lejos que te vayas;
siempre querré seguir tus pasos.
Siempre te siento a mi lado.

Por último,
también primero y fundamental,
a mis padres.
Por vuestro cariño, sacrificio y enseñanzas.
A **Chema** —mi padre—.
Por despertar en mí la curiosidad por el mundo.
Por haberme enseñado a cuestionarlo todo
y haber respondido
infatigable
a todas mis preguntas.
Si me gusta la ciencia es gracias a ti.
Por ser la persona más tolerante y paciente que conozco.
Si tan solo una pequeña parte de cómo eres
queda en mí
ya es el mejor legado que me dejas.
A **Charo** —mi madre—.
Por demostrarme el apoyo, la confianza y el amor
genuino e incondicional.
Por darme la vida
y vivir la tuya procurando siempre lo mejor para mí.
Por ser el sustento sobre el que se afirma mi existencia.

Esta tesis es de todos vosotros.

Eternamente,

GRACIAS.

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de desórdenes genéticos caracterizados por la presencia de mitocondrias cuyo sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) se encuentra alterado, afectando principalmente a los órganos con mayores requerimientos energéticos, como el corazón y el músculo esquelético. El factor inductor de apoptosis (AIF) es una proteína mitocondrial con funciones relevantes tanto en la fisiología celular —entre las cuales se encuentra el mantenimiento de la función OXPHOS— como en la inducción de la muerte celular tras migrar al núcleo. Actualmente se desconocen muchos de los efectos que, a nivel molecular, la deficiencia de AIF produce en el corazón y el músculo esquelético. Por otro lado, el ejercicio físico moderado ha demostrado numerosos beneficios en los pacientes con enfermedad mitocondrial. Sin embargo, todavía se desconocen gran parte de los mecanismos moleculares que explican dichas mejoras en los músculos estriados.

Los objetivos principales de la presente tesis doctoral fueron: estudiar las bases fisiopatológicas que subyacen al fenotipo causado por la deficiencia de AIF a distintas edades (2, 3 y 6 meses de edad); y estudiar los efectos de un programa de entrenamiento combinado de resistencia y fuerza de una duración de 8 semanas. Ambos objetivos se llevaron a cabo en corazón y en músculo esquelético del ratón *Harlequin* (Hq), caracterizado por presentar un déficit ubicuo de los niveles de AIF.

Los resultados mostraron alteraciones en numerosos procesos celulares en el corazón y el músculo esquelético de los ratones Hq. Concretamente, se observó un fallo en ensamblaje de algunos complejos del sistema OXPHOS, que únicamente se tradujo en un descenso de actividad del complejo I en músculo esquelético. Además, la ultraestructura mitocondrial resultó alterada en ambos tejidos, con unas mitocondrias de mayor área y más alargadas, posiblemente debido a un aumento en la fusión mitocondrial. Tanto el corazón como el músculo esquelético mostraron un aumento del estrés oxidativo; una distribución alterada de los lípidos, con una mayor cantidad de gotas lipídicas; y un mayor contenido de aminoácidos libres. También se detectaron cambios en el proceso de autofagia, con una acumulación de distintas proteínas de la ruta, así como una mayor activación de mTOR. Además, se observó un posible fallo en la biosíntesis del grupo hemo, disminuyendo los niveles de hemoglobina y mioglobina en corazón. Además, se detectaron alteraciones en el mecanismo de excitación-contracción de los cardiomiocitos, consistentes en una mayor fuga de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) mediada por *sparks*, y una menor capacidad de recaptación del Ca^{2+} hacia el RS durante la diástole. Por último, pese a que el programa de entrenamiento produjo mejoras en la capacidad aeróbica y la fuerza muscular de los ratones Hq, no fue capaz atenuar las alteraciones observadas a nivel molecular.

La presente tesis ha permitido descubrir importantes alteraciones moleculares en los músculos estriados del ratón Hq, que abren la puerta a futuros estudios, así como a la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, en el contexto de las enfermedades mitocondriales y de las patologías asociadas a una deficiencia de AIF.

SUMMARY

Mitochondrial diseases are a group of genetic disorders characterised by the presence of mitochondria with an impaired oxidative phosphorylation system (OXPHOS), which mainly affect those organs with higher energy demand, such as heart and skeletal muscle. Apoptosis inducing factor (AIF) is a mitochondrial protein with relevant functions in cellular physiology —such as the maintenance of OXPHOS function— and the induction of apoptosis after migrating to the nucleus. Nowadays, most of the effects of AIF deficiency on the heart and the skeletal muscle remain elusive. On the other hand, moderate physical exercise has demonstrated numerous benefits in patients with mitochondrial disease. However, some of the molecular mechanisms behind those improvements in striated muscles are still unknown.

The main objectives of this doctoral thesis were to study the pathophysiological bases underlying the phenotype caused by AIF deficiency at different times (2, 3 and 6 months of age); and to study the effects of a combined endurance and resistance training program, with a duration of 8 weeks. Both objectives were assessed in the heart and the skeletal muscle of Harlequin mouse (Hq), characterised by presenting an ubiquitous AIF deficiency.

The results demonstrated alterations in numerous cellular processes in the heart and the skeletal muscle of Hq mice. Specifically, both organs showed a failure in the assembly of some OXPHOS complexes; however, this only caused a decrease in complex I activity in skeletal muscle. Moreover, the mitochondrial ultrastructure was altered in both tissues, with longer and larger mitochondria, possibly due to increased mitochondrial fusion. In addition, both organs showed an increased oxidative stress; a differential distribution of lipids, with a higher content of lipid droplets; and elevated levels of free amino acids. Alterations in autophagy were also detected, with an accumulation of several proteins involved in this pathway, as well as an overactivation of mTOR. Furthermore, an impairment in heme biosynthesis was observed, with lower haemoglobin and myoglobin levels in the heart. Additionally, alterations in the excitation-contraction mechanism were detected in the heart, comprising a higher flux of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum (SR) mediated by Ca^{2+} sparks, and a lower capacity of cytosolic Ca^{2+} uptake to the SR. Finally, despite the training program improved the aerobic capacity and the muscular strength of Hq mice, it was not able to induce significant mitigation of the disturbances detected at the molecular level.

This study has allowed to discover important molecular alterations in the striated muscles of Hq mice, which can pave the way to future studies, as well as to the search of new therapeutic targets, in the context of mitochondrial diseases and pathologies associated with AIF deficiency.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	35
---------------------------	----

INTRODUCCIÓN

1. La mitocondria.	41
1.1. Estructura.	41
1.2. Genética.....	41
1.3. Funciones.	42
1.3.1. Ciclo de Krebs y biosíntesis de macromoléculas.	42
1.3.2. Fosforilación oxidativa.....	44
1.3.2.1. Complejo I.....	45
1.3.3. Señalización mediante especies reactivas del oxígeno.....	45
1.3.4. Mantenimiento de la homeostasis del calcio.	46
1.3.5. Apoptosis.....	47
1.3.5.1. Vía extrínseca.....	47
1.3.5.2. Vía intrínseca	47
2. Factor inductor de apoptosis.	48
2.1. Funciones.	49
2.1.1. Inducción de la apoptosis.	49
2.1.2. Actividad oxidorreductasa.....	49
2.1.3. Mantenimiento de la respiración mitocondrial.....	50
2.1.4. Posible rol como antioxidante mitocondrial.....	51
3. Enfermedades mitocondriales.	51
3.1. Manifestaciones de las enfermedades mitocondriales.....	52
3.1.1. Miopatía mitocondrial.	52
3.1.2. Cardiomiopatía mitocondrial.....	53
3.1.3. Deficiencia del factor inductor de apoptosis en humanos.	53
3.2. Ratón <i>Harlequin</i> como modelo de enfermedad mitocondrial.	54
3.2.1. Fenotipo del ratón <i>Harlequin</i>	54
4. Autofagia.....	55
4.1. Regulación dependiente de mTOR.	56
4.2. Regulación independiente de mTOR.	56
4.3. Autofagia en las enfermedades mitocondriales.....	57
5. Entrenamiento físico como terapia.....	58
5.1. Beneficios del entrenamiento en la población general.....	58

5.2.	Efectos del entrenamiento en la autofagia.....	58
5.3.	Efectos del entrenamiento en las enfermedades mitocondriales.....	59

OBJETIVOS 63

MATERIALES Y MÉTODOS

1.	Materiales.....	67
1.1.	Reactivos, tampones, medios de cultivo, kits y <i>softwares</i>	67
1.2.	Anticuerpos.....	69
1.3.	Modelo animal.....	70
2.	Métodos.....	71
2.1.	Procedimientos con ratones.....	71
2.1.1.	Genotipado del gen <i>Aifm1</i>	71
2.1.2.	Evaluación del fenotipo.....	72
2.1.3.	Programa de entrenamiento.....	75
2.1.4.	Tratamiento con leupeptina.....	75
2.1.5.	Diseción y almacenamiento de los tejidos.....	75
2.1.6.	Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales.....	76
2.1.7.	Obtención de tejidos para microscopía electrónica.....	76
2.2.	Análisis de proteínas.....	77
2.2.1.	Obtención de homogeneizados proteicos totales.....	77
2.2.2.	Cuantificación de proteínas.....	77
2.2.3.	Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (<i>western blot</i>).....	77
2.2.4.	Electroforesis nativa azul (<i>blue native electrophoresis, BN-PAGE</i>).....	78
2.2.5.	Perfil proteómico mediante espectrometría de masas.....	79
2.2.6.	Identificación de las modificaciones oxidativas en proteínas.....	80
2.2.7.	Detección de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia.....	80
2.3.	Medidas de Actividad enzimática.....	81
2.3.1.	Actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones.....	81
2.3.2.	Actividad catalasa.....	83
2.3.3.	Actividad Ca ²⁺ -ATPasa cardiaca.....	83
2.4.	Respirometría de alta resolución.....	83
2.5.	Ensayo de expresión de genes mediante QuantiGene Plex.....	84
2.6.	Estudio del manejo del Ca ²⁺ intracelular en cardiomiocitos ventriculares adultos.....	85
2.7.	Determinación de los niveles de H ₂ O ₂ en cardiomiocitos.....	86
2.8.	Inmunofluorescencia.....	87
2.8.1.	Inmunofluorescencia en tejido.....	87

2.8.2.	Inmunofluorescencia en células	87
2.9.	Tinción de núcleos apoptóticos mediante el ensayo TUNEL	88
2.10.	Microscopía electrónica de transmisión	88
2.11.	Estadística	89

RESULTADOS

1.	Evolución temporal de la capacidad aeróbica y muscular en los ratones Hq.....	93
2.	Efectos del entrenamiento en la capacidad aeróbica y muscular de los ratones Hq.....	94
3.	Manifestaciones de la deficiencia de AIF en corazón y efectos del entrenamiento.....	95
3.1.	Análisis del perfil proteómico y de las modificaciones oxidativas postraduccionales.....	95
3.2.	AIF y su función como inductora de muerte celular.....	95
3.2.1.	Niveles de AIF.....	95
3.2.2.	Muerte celular.....	96
3.2.2.1.	Niveles de caspasa 3 y <i>parthanatos</i>	97
3.1.1.1.	Niveles de anexinas.....	98
3.1.2.	Efectos del entrenamiento sobre los niveles de AIF y la muerte celular.....	99
3.2.	Fenotipo mitocondrial.....	101
3.2.1.	Ultraestructura mitocondrial.....	101
3.2.2.	Dinámica y biogénesis mitocondrial.....	103
3.2.3.	Efectos del entrenamiento sobre la dinámica y el contenido mitocondrial.....	105
3.3.	Alteraciones en la distribución de lípidos.....	106
3.4.	Sistema OXPHOS.....	107
3.4.1.	Niveles de proteínas implicadas en el sistema OXPHOS.....	108
3.4.2.	Efectos del entrenamiento sobre los niveles de proteínas del sistema OXPHOS.....	108
3.4.3.	Ensamblaje de los supercomplejos OXPHOS.....	110
3.1.1.	Actividad enzimática de los complejos del sistema OXPHOS.....	111
3.1.2.	Consumo de O ₂ en cardiomiocitos neonatales.....	113
3.2.	Alteraciones en los niveles de aminoácidos y otros metabolitos.....	115
3.3.	Alteraciones del grupo hemo.....	116
3.4.	Estrés oxidativo.....	118
3.4.1.	Niveles de proteínas antioxidantes.....	118
3.1.1.	Actividad catalasa.....	118
3.1.2.	Detección de ROS en cardiomiocitos.....	121
3.1.3.	Estrés oxidativo en el ADN.....	121
3.1.4.	Efectos del entrenamiento sobre el estrés oxidativo.....	121
3.2.	Fenotipo de la maquinaria contráctil cardíaca.....	123
3.3.	Estudio de los flujos de Ca ²⁺ intracelular.....	125

Índice

3.3.1.	Manejo del Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos ventriculares adultos.....	125
3.3.2.	Niveles de proteínas implicadas en los flujos de Ca^{2+} intracelular.....	127
3.1.1.	Efectos del entrenamiento sobre el manejo de Ca^{2+}	128
3.2.	Autofagia.....	130
3.2.1.	Niveles de marcadores de autofagia.....	130
3.2.2.	Análisis del flujo autofágico.....	132
3.2.3.	Efectos del entrenamiento sobre la autofagia.....	134
4.	Manifestaciones de la deficiencia de AIF en músculo esquelético; efectos del programa de entrenamiento.....	136
4.1.	Análisis del perfil proteómico y las modificaciones oxidativas postraduccionales	136
4.2.	AIF y su función como inductora de muerte celular.....	137
4.2.1.	Niveles de AIF.....	137
4.2.2.	Muerte celular	138
4.3.	Fenotipo mitocondrial.....	139
4.3.1.	Ultraestructura mitocondrial.....	139
4.4.	Sistema OXPHOS	141
4.4.1.	Niveles de los complejos OXPHOS y efectos del entrenamiento.....	141
3.1.1.	Ensamblaje de los supercomplejos de la CTE.....	141
3.1.1.	Actividad enzimática de los complejos de la CTE.....	142
3.2.	Alteraciones en la distribución de lípidos.....	145
3.3.	Alteraciones en los niveles de aminoácidos y otros metabolitos.....	146
3.4.	Estrés oxidativo.....	148
3.4.1.	Niveles de proteínas antioxidantes.....	148
3.1.1.	Estrés oxidativo en el ADN.....	148
3.2.	Fenotipo de la maquinaria contráctil muscular.....	150
3.3.	Proteínas implicadas en el manejo de Ca^{2+} intracelular durante la contracción.....	153
3.4.	Autofagia.....	154

DISCUSIÓN

1.	AIF y su función como inductora de muerte celular.....	159
2.	Ultraestructura, dinámica y biogénesis mitocondrial.....	159
3.	Alteraciones del metabolismo lipídico.....	160
4.	Sistema OXPHOS.....	161
5.	Alteraciones en los niveles de aminoácidos y otros metabolitos.....	163
6.	Alteraciones del grupo hemo.....	165
7.	Estrés oxidativo.....	165

Índice

8. Fenotipo de la maquinaria contráctil.....	166
9. Manejo de Ca ²⁺ intracelular en el acoplamiento excitación-contracción.....	167
10. Autofagia.....	169
11. Alteraciones en los niveles de anexinas.....	170
12. Efectos del programa de entrenamiento en el músculo estriado del ratón Hq.	171
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXOS	205

ABREVIATURAS

Abreviaturas

1D-BN-PAGE: electroforesis en condiciones nativas en primera dimensión
2D-BN/SDS-PAGE: electroforesis en condiciones desnaturalizantes en segunda dimensión
2m: 2 meses
3m: 3 meses
6m: 6 meses
8-OHdG: 8-oxo-2'-desoxiguanosina (*8-Oxo-2'-deoxyguanosine*)
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP: adenosín difosfato
AIF: factor inductor de apoptosis (*apoptosis inducing factor*)
ALA: δ -aminolevulinato (*δ -aminolevulinate*)
AMP: adenosín monofosfato
AMPK: proteína quinasa activada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)
ANXA: anexina (*annexin*)
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATG: proteína relacionada con la autofagia (*autophagy-related protein*)
ATP: adenosín trifosfato
ATP5A: ATP sintasa subunidad alfa (*ATP synthase subunit alpha*)
BCA: ensayo del ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid*)
BN: electroforesis nativa azul (*blue native*)
BSA: albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)
CAMKK: *calcium/ calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*
CBMSO: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CHCHD4: *mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40*
CI-CV: complejos I-V
CoA: coenzima A
COQ: coenzima Q o ubiquinona
CORE2: *cytochrome b-c1 complex subunit 2*
COX: citocromo c oxidasa (*c oxidase cytochrome*)
CS: citrato sintasa (*citrate synthase*)
CTE: cadena transportadora de electrones
CYPA: ciclofilina A (*cyclophilin A*)
CYTC: citocromo C (*cytochrome c*)
DA-DCF: 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DTNB: ácido-5-5'ditio-bis-2-nitrobenzoico
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DRP1: *dynamin-1-like protein*

Abreviaturas

E-C: excitación-contracción

ECAR: tasa de acidificación del medio de cultivo (*extracellular acidification rate*)

ECL: quimioluminiscencia mejorada (*enhanced chemiluminescence*)

EDL: músculo extensor largo de los dedos (*extensor digitorum longus muscle*)

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGTA: ácido etileno-bis(oxietileno-nitrilo)tetraacético (*triethylene glycol diamine tetraacetic acid*)

EM: enfermedad mitocondrial

Ent: entrenado

ε: coeficiente de extinción molar

FAD: dinucleótido de flavina y adenina, oxidado

FADH: dinucleótido de flavina y adenina, reducido

FABP: proteína de unión a ácidos grasos (*fatty acid-binding protein*)

FBS: suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)

FCCP: carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona

FKBP12: *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A*

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

HBSS: *Hanks' Balanced Salt Solution*

HPR: peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*)

Hq: *Harlequin*

HSP60: proteína de choque térmico de 60 kDa (*60 kilodalton heat shock protein*)

HSP70: proteína de choque térmico de 70 kDa (*70 kilodalton heat shock protein*)

iTRAQ: etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*)

KO: *knock out*

LAMP1: proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (*lysosome-associated membrane glycoprotein 1*)

LC3: *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

MELAS: encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios parecidos a un accidente cerebrovascular (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*)

MERF: epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rasgadas (*myoclonus epilepsy with ragged-red fibers*)

MFN2: mitofusina 2 (*mitofusin 2*)

MLS: secuencia de localización mitocondrial (*mitochondrial localization sequence*)

MME: membrana mitocondrial externa

MMI: membrana mitocondrial interna

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico

mTOR: diana de rapamicina (*mechanistic target of rapamycin*)

mTORC1: *mechanistic target of rapamycin complex 1*

mTORC2: *mechanistic target of rapamycin complex 2*

MYL3: cadena ligera esencial de la miosina (*myosin light chain 3*)

Abreviaturas

- NAD:** dinucleótido de nicotinamida y adenina, oxidado
- NADH:** dinucleótido de nicotinamida y adenina, reducido
- NDUFA9:** *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9*
- NDUFB7:** *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7*
- NDUFB8:** *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8*
- NDUFS1:** *NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit*
- NRF2:** *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
- OCR:** tasa de consumo de oxígeno (*oxygen consumption rate*)
- OPA1:** *optic atrophy protein 1*
- OXPHOS:** sistema de fosforilación oxidativa (*oxidative phosphorylation system*)
- P62:** *sequestosome-1*
- PAR:** *poly [ADP-ribose]*
- PARP-1:** *poly [ADP-ribose] polymerase 1*
- PBS:** tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
- PCA:** análisis por componentes principales (*principal component analysis*)
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
- PGC1 α :** *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
- PRDX6:** peroxirredoxina 6 (*peroxiredoxin 6*)
- PVDF:** fluoruro de polivinilideno
- ROS:** especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*)
- RP-LC-MS/MS:** espectrometría de masas por cromatografía reversa en fase líquida
- Rpm:** revoluciones por minuto
- RS:** retículo sarcoplásmico
- RYR:** receptor de rianodina (*ryanodine receptor*)
- SDHA:** *succinate dehydrogenase complex, subunit A*
- SDHB:** *succinate dehydrogenase complex, subunit B*
- SDS:** deodecilsulfato sódico
- SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
- Sed:** sedentario
- SERCA:** *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*
- SOD:** superóxido dismutasa (*superoxide dismutase*)
- TBS:** tampón tris salino (*tris buffered saline*)
- TBST:** tampón tris salino con tween 20 (*tris buffered saline-tween 20*)
- TOM20:** *mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog*
- TRX1:** tiorredoxina (*thioredoxin*)
- TUNEL:** *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*
- VDAC1:** canal aniónico dependiente de voltaje (*voltage-dependent anion-selective channel*)
- WB:** *western blot*
- WT:** genotipo o fenotipo silvestre (*wild type*)

INTRODUCCIÓN

1. La mitocondria.

Las mitocondrias son orgánulos celulares de origen bacteriano (1), especializados en la producción de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP) mediante el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS, *oxidative phosphorylation system*), y con roles adicionales en multitud de rutas metabólicas y biosintéticas.

1.1. Estructura.

La mitocondria está formada por dos membranas compuestas por una bicapa de fosfolípidos y proteínas: la membrana mitocondrial externa (MME), que posee una alta permeabilidad a moléculas de pequeño tamaño; y la membrana mitocondrial interna (MMI), con una mayor proporción de proteínas y mucho menos permeable al paso de moléculas. La MMI —en la que se encuentra la maquinaria que lleva a cabo el proceso OXPHOS— forma una serie de invaginaciones conocidas como crestas, que aumentan su superficie e incrementan así la producción de ATP (Fig.1). La doble membrana deja dos compartimentos bien diferenciados: el espacio entre la MME y la MMI, llamado espacio intermembrana; y la matriz mitocondrial en el interior de la MMI. Esta última alberga múltiples copias del genoma mitocondrial (Fig.1).

Aunque durante mucho tiempo ha predominado la imagen estática de la mitocondria como orgánulo discreto, desde hace unos años se ha sustituido por una imagen dinámica, en la que las mitocondrias sufren constantes procesos de movimiento, fusión y fisión, formando una red mitocondrial que cambia en respuesta a diferentes estados de la célula (2). Las mitofusinas (MFN1 [*mitofusin-1*] y MFN2 [*mitofusin-2*]) y OPA1 (*optic atrophy protein 1*) son las principales proteínas inductoras del proceso de fusión, mientras que DRP1 (*dynamin-1-like protein*) lo es del proceso de fisión (3).

1.2. Genética.

Las mitocondrias poseen su propio genoma. El ADN mitocondrial (ADNmt) humano es una molécula circular y bicatenaria de 16569 kilobases que alberga 37 genes (4). Como ocurre en procariontes, el ADNmt tiene una alta proporción de genes codificantes, con ausencia de repeticiones y secuencias intergénicas (4). Del total de genes, 13 codifican subunidades de los complejos I, III y IV de la cadena

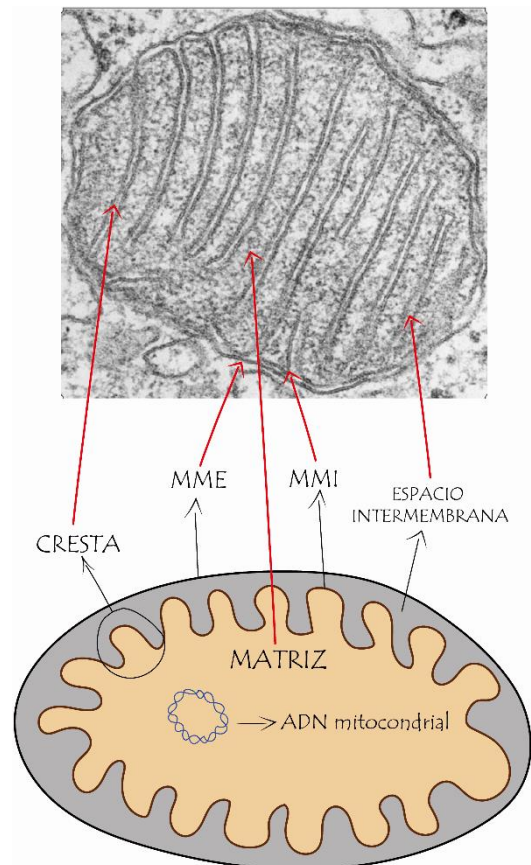


Figura 1. Partes de una mitocondria. Arriba, mitocondria en el microscopio electrónico de transmisión; abajo, esquema de una mitocondria. MMI: membrana mitocondrial interna; MME: membrana mitocondrial externa.

transportadora de electrones (CTE) y del complejo ATP sintasa, los cuales constituyen —junto con el complejo II, codificado enteramente por el ADN nuclear— el sistema de fosforilación oxidativa. Otros 22 genes codifican moléculas de ARN de transferencia para el sistema de traducción mitocondrial. Los 2 genes restantes codifican los ARN ribosómicos 16S y 12S (4). En los últimos años, además de los 37 genes conocidos, se ha descrito que el ADNmt puede codificar pequeños marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*) que se traducen en péptidos con importantes funciones, como son la humanina (5), MOTS-c (*mitochondrial open reading frame of the twelve S rRNA-c*) (6) y SHLPs (*small humanin-like peptides*) (7).

1.3. Funciones.

La mitocondria es considerada el centro de producción de energía de la célula, mediante la generación de ATP a través del proceso OXPHOS. Además, desempeña otras funciones esenciales como son la biosíntesis de macromoléculas, el mantenimiento de la homeostasis del calcio, la señalización celular por especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y la inducción de la apoptosis. Por otro lado, el dinamismo de las mitocondrias hace posible su contacto mediante señales con otros orgánulos como autofagosomas, lisosomas, retículo endoplásmico y el núcleo, estableciéndose una comunicación necesaria para muchas funciones en la célula.

1.3.1. Ciclo de Krebs y biosíntesis de macromoléculas.

El ciclo de Krebs, ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo del ácido cítrico, tiene lugar en la matriz mitocondrial de las células eucariotas. Se trata de una ruta cíclica que comprende una serie de ocho reacciones que oxidan el acetil coenzima A (acetil CoA) procedente de diferentes rutas catabólicas (glucólisis, β -oxidación de ácidos grasos y desaminación de aminoácidos), produciendo CO_2 y los cofactores reducidos $\text{NADH}+\text{H}^+$ y FADH_2 . Estos últimos confieren el poder reductor que será utilizado por la CTE para la generación del potencial de membrana y la consiguiente producción de ATP (8) (**Fig.2**). Este ciclo está regulado mediante interacciones alostéricas a través de la ratio $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ y de la concentración de ADP presentes en la mitocondria.

El ciclo de Krebs constituye una ruta anfibólica ya que, además de llevar a cabo un proceso catabólico, algunos de sus intermediarios actúan como precursores para la biosíntesis de otras macromoléculas. Es el caso del citrato, que es exportado de la mitocondria mediante el transportador malato/citrato y actúa como fuente de carbono para la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y cuerpos cetónicos (9) (**Fig.2**). El succinil coA, junto a la glicina, participa en la síntesis del grupo hemo y otras porfirinas, a partir de su conversión en δ -aminolevulinato (ALA) mediante la enzima δ -aminolevulinato sintetasa. El ALA es exportado al citosol, donde es transformado en coproporfirinógeno III en una serie de cuatro reacciones, para volver a entrar a la mitocondria, en la que tiene lugar otra serie de modificaciones que terminan con la inserción del hierro para dar lugar al grupo hemo (10) (**Fig.2**). A partir de los intermediarios oxalacetato y α -cetoglutarato, se sintetizan el aspartato y el glutamato, respectivamente, así como otros aminoácidos, mediante transaminación. Algunos de estos aminoácidos suponen una fuente de nitrógeno

para numerosas reacciones como la biosíntesis de purinas y pirimidinas (11) (Fig.2). Por otro lado, la mitocondria participa en las etapas iniciales la gluconeogénesis, finalizándose el resto del proceso en el citosol. La enzima piruvato carboxilasa cataliza la conversión del piruvato en oxalacetato (12). Este último puede ser convertido en fosfoenolpiruvato por la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial o citosólica. A continuación, el fosfoenolpiruvato sigue una serie de reacciones que dan lugar finalmente a la glucosa (13) (Fig.2).

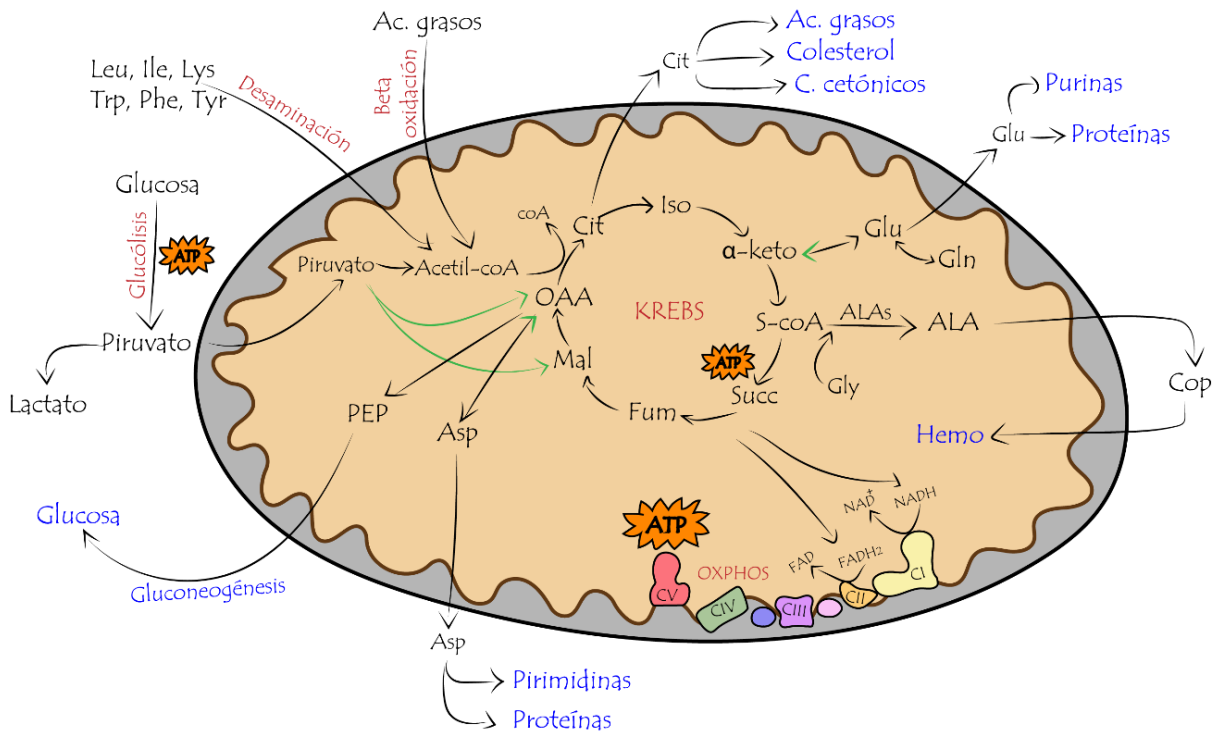


Figura 2. Principales reacciones catabólicas, anabólicas y rutas anapleróticas en la mitocondria. En rojo, las rutas catabólicas; en azul, los productos del anabolismo; en verde, las principales rutas anapleróticas para la reposición de intermediarios del ciclo de Krebs. Iso: isocitrato; α-keto: α-cetoglutarato; Succ: succinato; Fum: fumarato; Mal: malato; OAA: oxalacetato; Cit: citrato; ALA: δ-aminolevulinato; ALAs: δ-aminolevulinato sintetasa; Cop: coproporfirinógeno III; PEP: fosfoenolpiruvato.

Dado que todas estas reacciones anabólicas suponen una reducción de los niveles de algunos de los intermediarios del ciclo de Krebs, es necesario reponer sus reservas, lo cual tiene lugar mediante una serie de reacciones anapleróticas (14) (Fig.2). La carboxilación reversible del piruvato, mediante la enzima piruvato carboxilasa, aumenta las reservas de oxalacetato. La enzima malato deshidrogenasa cataliza la carboxilación reductora del piruvato para dar malato. Por otro lado, las reacciones de transaminación son reacciones reversibles que, además de participar en la síntesis de aminoácidos, sirven para producir intermediarios del ciclo de Krebs a partir de ellos. Por ejemplo, el glutamato y el aspartato experimentan una transaminación para dar α-cetoglutarato y oxalacetato, respectivamente. La enzima glutamato deshidrogenasa proporciona una ruta adicional para la síntesis de α-cetoglutarato a partir de glutamato.

1.3.2. Fosforilación oxidativa.

La mayor parte de las células producen energía en forma de ATP, a partir de la oxidación aeróbica de nutrientes, mediante el proceso de fosforilación oxidativa. En células de mamíferos, el ATP producido mediante OXPHOS representa aproximadamente el 70% del ATP total generado en la célula. El 30% restante se produce mayoritariamente en el citosol, a partir de la degradación anaeróbica de nutrientes, principalmente mediante el proceso de glucólisis (15).

La fosforilación oxidativa es llevada a cabo por la CTE y la ATP sintasa (complejo V, CV), situados en la MMI. La CTE está compuesta por cuatro complejos multiproteicos: la NADH deshidrogenasa:ubiquinona reductasa (complejo I, CI), la succinato:ubiquinona oxidorreductasa (complejo II, CII), la ubiquinol:citocromo C oxidorreductasa (complejo III, CIII) y la citocromo C oxidasa (complejo IV, CIV); así como dos transportadores móviles de electrones: la coenzima Q (COQ) y el citocromo C (CYTC) (**Fig.3**). Los pares de electrones provenientes de la oxidación del $\text{NADH} + \text{H}^+$ y el FADH_2 son transferidos a través de la CTE. Esta transferencia de electrones se produce desde donantes a aceptores, mediante una serie de reacciones redox, hasta llegar al oxígeno molecular que, en el complejo IV, capta los electrones formando H_2O (**Fig.3**). La energía producida por la transferencia de electrones a través de la CTE es utilizada por los complejos I, III y IV para transportar protones (H^+) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico generado por la diferencia en la concentración de H^+ a un lado y otro de la membrana almacena una energía potencial (potencial de membrana mitocondrial) que es disipada al pasar los H^+ a través del CV de nuevo hacia la matriz. Este proceso libera energía, que es utilizada por la ATP sintasa para la transformación de adenosín difosfato (ADP) en ATP mediante una reacción de fosforilación (**Fig.3**).

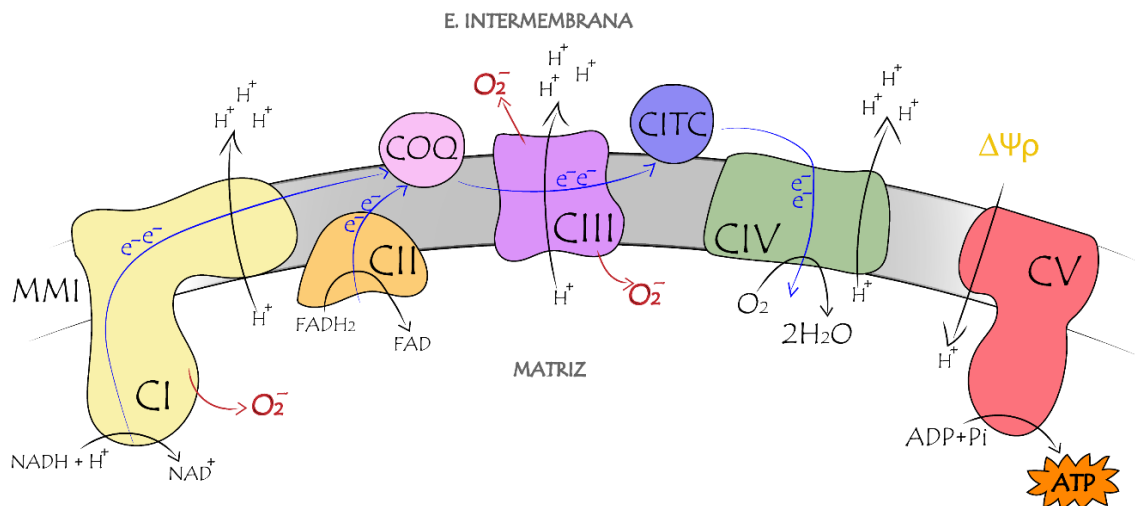


Figura 3. Proceso de fosforilación oxidativa. La cadena transportadora de electrones (formada por los complejos I-IV) y la ATP sintasa (CV) se localizan en la membrana mitocondrial interna (MMI) y llevan a cabo el proceso de fosforilación oxidativa. Los coenzimas reducidos $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 se oxidan y transfieren sus electrones a los complejos I y II, respectivamente. Éstos transfieren los electrones a la coenzima Q (COQ), cuya forma reducida se los cede al complejo III y éste al citocromo C (CYTC). Finalmente, se produce la reducción del O_2 a H_2O en el complejo IV, al recibir los electrones del CYTC. La transferencia de electrones está acoplada a un bombeo de H^+ por los complejos I, III y IV desde la matriz al espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico que es disipado a través del CV para la generación de ATP, a partir de ADP y fosfato inorgánico. Los complejos I y III producen superóxido (O_2^-) como consecuencia de su actividad, lo que puede dar lugar a la formación de otras especies reactivas del oxígeno.

En cuanto a la organización de los complejos en la MMI, las evidencias aportadas en los últimos años han hecho cambiar de un modelo “líquido” —en el cual los complejos difunden libre e independientemente por la MMI, colisionando de forma aleatoria entre ellos para llevar a cabo la transferencia de electrones (16)— a un “modelo de plasticidad”. Según este último, los complejos se encuentran en un equilibrio dinámico, asociándose entre ellos para formar supercomplejos (17, 18). Esta organización supondría una ventaja, ya que permite transferir los electrones con mayor eficacia, con la consecuente disminución de la producción de ROS (19). En mamíferos, se han descrito distintas combinaciones de supercomplejos: I+III₂, III₂+IV₁₋₂ y I+III₂+IV₁₋₄. Este último recibe el nombre de “respirasoma”, ya que contiene todos los componentes necesarios para transferir electrones del NADH al O₂ (20). El complejo II existe mayoritariamente en forma libre (21), mientras que el complejo V no se ha encontrado formando parte de ningún supercomplejo, aunque sí forma homodímeros con funciones en la formación de las crestas mitocondriales (22)

1.3.2.1. Complejo I.

El complejo I lleva a cabo la oxidación del NADH+H⁺, catalizando la transferencia de electrones a la COQ y bombeando 4 H⁺ al espacio intermembrana por cada par de electrones que transfiere (23). Es el componente de mayor tamaño del sistema OXPHOS y el responsable del 40% de la fuerza protón motriz (24).

El CI está formado por 14 subunidades centrales que llevan a cabo la función catalítica y que están conservadas desde bacterias hasta mamíferos. Además, existen hasta 31 subunidades accesorias cuyas funciones son mayoritariamente desconocidas. Se ha sugerido que alguna de ellas puede tener un papel en la formación, regulación o estabilización del complejo (24). Estructuralmente, el CI tiene forma de L con dos brazos bien diferenciados: uno hidrofóbico, embebido en la MMI; y uno hidrofílico, que se proyecta a la matriz. Funcionalmente, el CI se divide en tres módulos: el módulo N, encargado de aceptar los electrones del NADH; el módulo Q, que dona los electrones a la COQ; y el módulo P, cuya función es la de bombear H⁺ al espacio intermembrana (24).

1.3.3. Señalización mediante especies reactivas del oxígeno.

Las ROS son un grupo de moléculas derivadas del oxígeno que presentan electrones desapareados en su orbital externo, lo que las convierte en agentes oxidantes de otras moléculas. Constituyen un producto natural del metabolismo de las células y tienen diversas funciones esenciales en la señalización y la homeostasis celular. Sin embargo, en ocasiones se produce un desequilibrio entre la formación de ROS y la capacidad de defensa antioxidante, a favor de las primeras, lo que genera una situación de estrés oxidativo en la célula (25).

La CTE es una de las principales fuentes de ROS en la mayor parte de las células de mamíferos. Aunque la respiración celular es un proceso altamente eficiente, una pequeña fuga de electrones —principalmente atribuida a los complejos I y III (26)— conduce a una reducción parcial del O₂ por un solo electrón para formar superóxido (O₂⁻). Mientras el complejo I forma O₂⁻ hacia la matriz

mitocondrial, el complejo III también lo forma hacia el espacio intermembrana (27) (**Fig.3**). Además, existen otras enzimas que generan O_2^- en la mitocondria en menor medida: la piruvato deshidrogenasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la flavoproteína Q transferidora de electrones (28).

Dos moléculas de O_2^- pueden ser convertidas en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por las enzimas superóxido dismutasa 1 y 2 (SOD1 y SOD2) (**Fig.4**). El H_2O_2 puede ser convertido en radical hidroxilo (OH^\bullet) mediante la reacción de Fenton, o bien puede ser reducido a agua mediante enzimas como peroxirredoxinas, glutatión peroxidadas o la catalasa (25) (**Fig.4**).

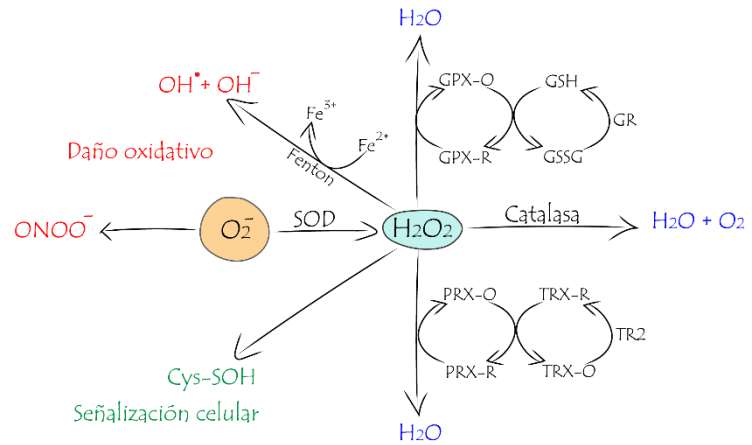


Figura 4. Esquema de la transformación de superóxido mitocondrial. El O_2^- puede ser convertido, bien en H_2O_2 a través de la SOD, o bien puede reaccionar con el NO para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). El $ONOO^-$ es altamente reactivo y puede causar daño oxidativo. El H_2O_2 puede ser reducido a H_2O mediante la acción de tres tipos de enzimas: las glutatión peroxidadas (GPX-R \rightarrow GPX-O), que oxidan el glutatión (GSH \rightarrow GSSG), el cual es posteriormente reducido por la glutatión reductasa (GR); las peroxirredoxinas (PRX-R \rightarrow PRX-O), cuya actividad es restaurada mediante la oxidación de la tiorredoxina (TRX-R \rightarrow TRX-O) y ésta, a su vez, se reduce por la acción de la tiorredoxina reductasa (TR2); y la catalasa. Además, en presencia de metales, el H_2O_2 puede ser convertido en hidróxido (OH^-) y radical hidroxilo (OH^\bullet) mediante la reacción de Fenton, siendo este último altamente reactivo y generador de daño oxidativo. Por último, el H_2O_2 puede oxidar residuos de cisteína de distintas proteínas (Cys-SOH), interviniendo en procesos de señalización celular.

El H_2O_2 es más estable que el resto de las ROS. Esto, unido a que tiene la capacidad de atravesar membranas, le permite actuar como segundo mensajero a través de diferentes modificaciones redox en residuos de cisteína de proteínas. Así —ya sea mediante la afectación del centro catalítico de las proteínas,

de sus residuos regulatorios o alterando su capacidad de interacción con otras proteínas—, el H_2O_2 constituye una importante molécula señalizadora a múltiples niveles, pudiendo determinar la proliferación, la supervivencia o la muerte celular (29).

Las ROS son, por tanto, esenciales en multitud de procesos fisiológicos tales como el envejecimiento (30, 31), la diferenciación celular (32, 33) o la inflamación (28). Sin embargo, algunas situaciones alteran la transferencia de electrones a través de los complejos de la CTE, como pueden ser mutaciones en alguna de sus subunidades (34), defectos en su ensamblaje (35) o la presencia de elementos reguladores de su función como IF1 (*ATPase inhibitory factor 1*) (36). Esto puede provocar un incremento en la producción de ROS, contribuyendo al daño en las mitocondrias y participando en el desarrollo de cáncer (37), enfermedades mitocondriales (38) y neurodegenerativas (39).

1.3.4. Mantenimiento de la homeostasis del calcio.

En las células, el calcio (Ca^{2+}) es una molécula señalizadora universal y versátil, ya que actúa como segundo mensajero en multitud de procesos y es capaz de generar señales en distintas localizaciones y momentos. Las mitocondrias tienen un papel muy importante en la regulación de la homeostasis del

Ca^{2+} , pudiendo captar grandes cantidades de Ca^{2+} (de 10 a 20 veces más que los valores citoplasmáticos) y modificando así su concentración y capacidad de señalización en el citosol (40).

La concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) mitocondrial regula diferentes funciones intrínsecas en el orgánulo relacionadas con el metabolismo y la muerte celular. Por ejemplo, un incremento moderado de la $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial puede activar distintas enzimas del ciclo de Krebs, aumentando la síntesis de ATP (41); puede inducir la fragmentación de la red mitocondrial mediante la desfosforilación de DRP1 por la calcineurina (42); o disminuir el umbral para la apertura del poro de permeabilidad transitoria, aumentando la susceptibilidad de la célula a entrar en apoptosis (43).

1.3.5. Apoptosis.

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada en respuesta a diferentes estímulos como daño en el ADN, falta de nutrientes, hipoxia o radiación ultravioleta, entre otros. Es un proceso altamente conservado y regulado, y presenta una serie de eventos que incluyen la externalización de fosfatidilserina en la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y una reducción del volumen celular. Finalmente, la célula colapsa y se escinde en múltiples fragmentos denominados “cuerpos apoptóticos”, que son eliminados mediante fagocitosis por células vecinas o macrófagos (44, 45). Según el punto donde se inicia la apoptosis, ésta se clasifica en dos vías: extrínseca e intrínseca.

1.3.5.1. Vía extrínseca: se induce por moléculas extracelulares (citoquinas pro-apoptóticas o pro-inflamatorias) que se unen a receptores de la membrana plasmática de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, desencadenando una serie de eventos que llevan a activar a las caspasas ejecutoras responsables de degradar los componentes (46).

1.3.5.2. Vía intrínseca: también conocida como vía mitocondrial, está altamente regulada por la familia de proteínas BCL-2, entre las cuales hay algunas con función pro-apoptótica y otras con función anti-apoptótica (47). El evento que marca el punto de inicio de la muerte celular por esta vía es la permeabilización de la MME. A partir de ahí, diferentes proteínas mitocondriales —como el CYTC, SMAC (*diablo homolog, mitochondrial*) y OMI (*serine protease HTRA2, mitochondrial*)— pueden salir al citosol y activar a las caspasas (48, 49).

Aunque la función de las caspasas es clave en el proceso apoptótico, se ha observado que, cuando éstas se inhiben, la muerte celular sigue teniendo lugar (50). Existen por tanto proteínas que promueven la apoptosis independientemente de la actuación de las caspasas, siendo este proceso menos eficiente y más lento que la apoptosis dependiente de caspasas. La endonucleasa G y el factor inductor de apoptosis son dos proteínas capaces de migrar desde la mitocondria al núcleo tras un estímulo apoptótico e inducir la fragmentación del ADN independiente de caspasas (51, 52).

2. Factor inductor de apoptosis.

El factor inductor de apoptosis (*apoptosis inducing factor*, AIF) se describió en 1996 como una proteína inductora de núcleos apoptóticos en células Hela (53). Actualmente se sabe que AIF —también conocida como PCDCD8— está codificada en el gen *Aifm1*, que se localiza en el cromosoma X; se expresa de forma ubicua en mamíferos y su secuencia de aminoácidos se encuentra muy conservada entre el ratón y el humano (92% de identidad). Además, presenta una alta homología con otras oxidorreductasas tanto de eucariotas como de procariontas (54).

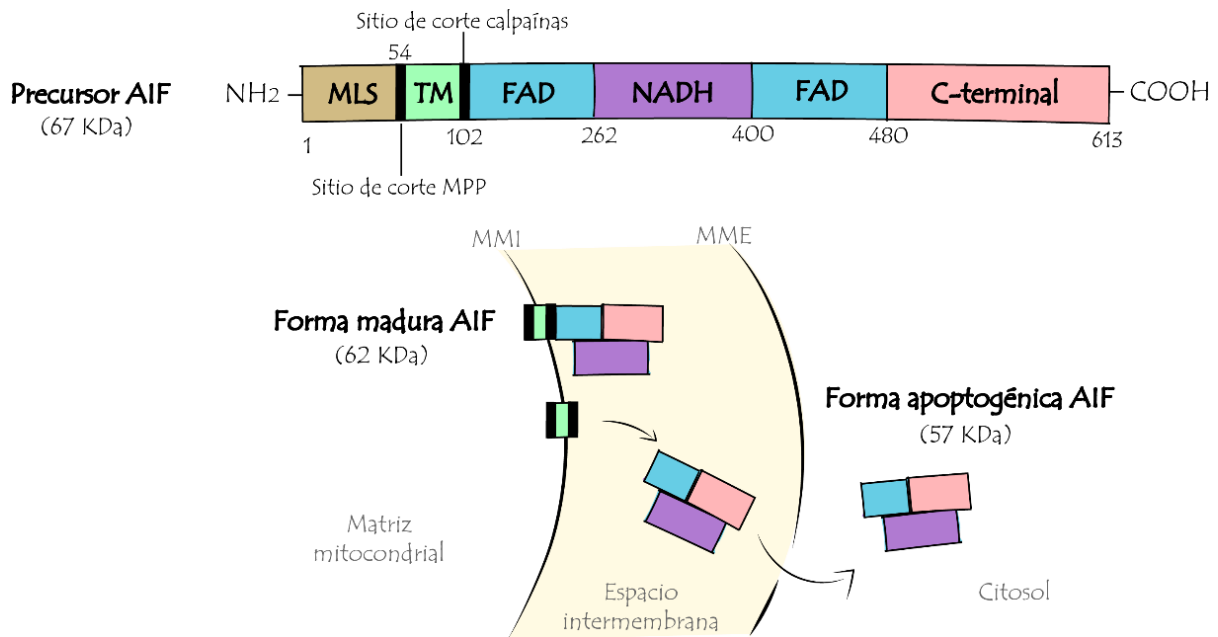


Figura 5. Dominios funcionales y procesamiento de AIF. El precursor de AIF (67 kDa) contiene una secuencia de localización mitocondrial (MLS), seguida de un sitio de corte por la peptidasa mitocondrial de la matriz (MPP), una región transmembrana (TM), un sitio de corte por calpaínas, dos dominios de unión a FAD flanqueando un dominio de unión a NADH, y un dominio C-terminal. El precursor sufre un corte por la MPP y da lugar a la forma madura de AIF (62 kDa), que se ancla a la membrana mitocondrial interna (MMI), con los dominios funcionales orientados al espacio intermembrana. Tras un estímulo apoptótico, AIF sufre un corte por calpaínas, dando lugar a la forma apoptogénica (57 kDa), que se escinde de la MMI y sale al citosol. MME: membrana mitocondrial externa.

AIF se traduce en el citosol como una proteína precursora de 67 kDa, que contiene una parte N-terminal con una secuencia de localización mitocondrial (MLS, *mitochondrial localization sequence*); una región central espaciadora; y una parte C-terminal con dos secuencias de localización nuclear. Este precursor es importado a la mitocondria en su forma nativa (54), donde sufre un corte que elimina la región MLS y da lugar a una forma madura de 62 kDa, que se ancla a la MMI, con la parte N-terminal situada en la matriz y la C-terminal expuesta hacia el espacio intermembrana (55). Tras un estímulo apoptótico, AIF sufre otro corte que la escinde de la MMI, dando lugar a una molécula soluble de 57 kDa que sale al citosol tras la permeabilización de la MME y migra al núcleo donde promueve la degradación del ADN (55) (Fig.5). La estructura cristalina de AIF es similar a la de las enzimas glutatión reductasas (56) y, como ellas, presenta tres dominios funcionales: dos de unión al FAD, que flanquean otro de unión al NADH; y una región C-terminal (Fig.5). Aunque en la estructura de AIF de ratón no se encuentra ningún

dominio típico de unión al ADN, la estructura cristalina de AIF humana (AIFD1-120) demuestra un fuerte potencial electrostático positivo, sugiriendo que se une al ADN mediante interacciones electrostáticas (57).

2.1. Funciones.

2.1.1. Inducción de la apoptosis.

Tras un estímulo apoptótico, la forma madura de AIF sufre un corte por calpaínas (58), que la escinde de la MMI y da lugar a una molécula soluble de 57 kDa localizada en el espacio intermembrana (55). Tras la permeabilización de la MME, la forma de AIF de 57 kDa es liberada al citosol, donde puede interactuar con proteínas que determinan su distribución: la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), que promueve la retención de AIF en el citosol (59); y la ciclofilina A (CYPA), que facilita su redistribución al núcleo (60). Recientemente se ha observado que la interacción de AIF con la tiorredoxina (TRX1) reducida en el citosol promueve su interacción con HSP70, lo que la retiene en el citosol, promoviendo la supervivencia. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, la interacción de AIF con la TRX1 oxidada favorece su unión con CYPA y su traslocación al núcleo (61). Una vez en el núcleo, el complejo AIF:CYPA recluta a la histona H2AX, formándose un complejo conocido como “degradasoma”, el cual se une al ADN y promueve su degradación y la condensación de la cromatina. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales el degradasoma actúa no están totalmente dilucidados (62, 63).

Existen numerosos ejemplos en la literatura que afirman que el mecanismo por el que AIF induce la apoptosis es independiente de la acción de las caspasas (64, 65). Sin embargo, también se muestran algunos ejemplos en los que AIF se libera de la mitocondria al citosol como consecuencia de la activación de caspasas, cuando ésta ocurre antes de la permeabilización de la MME —proceso que se da en una pequeña parte de casos (66–68)—.

En los últimos años se ha descrito el papel que juega AIF en un tipo de muerte celular denominado *parthanatos*, caracterizada por ser dependiente de PARP-1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*) e independiente de caspasas. Principalmente como consecuencia de daño en el ADN, PARP-1 se activa y provoca la acumulación de polímeros de PAR (*Poly [ADP-ribose]*). Como consecuencia, se produce una reducción de los depósitos de NAD^+ , causando una caída de los niveles de ATP, lo que da lugar a la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo (69). La muerte por *parthanatos* está involucrada en múltiples procesos patológicos, incluyendo infarto de miocardio (70), isquemia cerebral (71), shock séptico (72), enfermedades neurodegenerativas (73) y cáncer (74).

2.1.2. Actividad oxidorreductasa.

AIF posee actividad NAD(P)H-oxidorreductasa en su dominio N-terminal, e inicialmente se propuso que cataliza la transferencia de electrones desde el NAD(P)H al O_2 , generando superóxido, si bien la transferencia de electrones ocurre de una forma muy poco eficiente comparada con otras flavoproteínas

(75). Sin embargo, posteriormente otros autores han descrito que, tras la oxidación del NAD(P)H, en condiciones en las que hay cofactores reducidos en abundancia, AIF dimeriza y forma complejos de transferencia de carga FADH₂/NAD(P) muy estables, con funciones en los ciclos redox, en la formación de las crestas mitocondriales y en la biogénesis de los complejos de la CTE. Además, dichos complejos mostrarían una menor susceptibilidad de corte por calpaína y unión al ADN, que son eventos críticos en la inducción de la muerte celular, por lo que podrían actuar como un sensor redox para la célula (75, 76). No obstante, el papel fisiológico que la actividad oxidorreductasa de AIF posee en mitocondrias funcionales aún no es completamente conocido.

2.1.3. Mantenimiento de la respiración mitocondrial.

El papel de AIF en la inducción de la apoptosis ha sido el más estudiado desde su descubrimiento. Sin embargo, no explicaba el fenotipo observado en células en cultivo carentes de AIF, en las que se detectaba un déficit de actividad del CI, así como una menor tasa de consumo de O₂ (77, 78). Tampoco explicaba la deficiencia de actividad del CI encontrada en el modelo de ratón *Harlequin* (Hq), el cual presenta unos niveles residuales de la proteína AIF del 20% (78). A lo largo de varios años, el déficit de CI producido por la deficiencia de AIF se ha confirmado en numerosos estudios realizados en células madre embrionarias (77), embriones de ratón (79), músculo esquelético (80, 81), corazón (81), hígado (80), cerebro (77), retina (82) y células hematopoyéticas (83). Además, en algunos casos se ha observado disfunción de los complejos CIII y CIV asociada a la pérdida de AIF en estos modelos, aunque se trata de un efecto menos claro.

Las evidencias muestran que AIF no forma parte del CI, no se une directamente a él, ni su pérdida afecta a la transcripción de subunidades del CI (77). El mecanismo mediante el cual AIF regula la bioenergética del sistema OXPHOS no está completamente dilucidado. Recientemente se ha propuesto que AIF transfiere equivalentes reducidos a la CTE, manteniendo el pool de NAD⁺/NADH, pues comparte una alta homología con Ndi1, una NADH-ubiquinona oxidorreductasa tipo 2 (NDH-2) de levaduras, que cataliza la misma reacción que el CI pero sin bombear H⁺ desde la matriz al espacio intermembrana (84). Otro posible mecanismo que en los últimos años ha cobrado mucha relevancia apunta a que AIF participa en el importe y ensamblaje de los complejos de la CTE a través de su interacción con la proteína CHCHD4 (*mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40*), homóloga a la proteína Mia40 de levaduras (79, 85). CHCHD4 se localiza en la MMI y controla el importe a la mitocondria de una serie de proteínas de pequeño tamaño ricas en cisteínas, que comparten un dominio CHCHD (*coiled coil-helix1-coiled coil-helix2*) y son codificadas por el ADN nuclear. CHCHD4 cataliza la oxidación de cisteínas, formando puentes disulfuro transitorios que resultan en el plegamiento y la activación de las proteínas, necesarios para poder realizar su función en la mitocondria (86). Se ha observado que, mientras la deficiencia en AIF da lugar a un déficit de CHCHD4 en la MMI, no sucede lo mismo a la inversa. Además, la sobreexpresión de CHCHD4 rescata la pérdida de subunidades de la CTE en varios cultivos celulares deficientes en AIF (79, 85). Todo esto sugiere que AIF es necesario para la correcta función de CHCHD4 en el importe de determinadas proteínas a la mitocondria, entre

las cuales se encuentran algunas subunidades de los complejos de la CTE. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan esta interacción redox-dependiente no están totalmente dilucidados.

2.1.4. Posible rol como antioxidante mitocondrial.

Algunos autores han propuesto que AIF actúa como un antioxidante, en base a que las neuronas granulares y los cardiomiocitos del ratón Hq son más susceptibles a la muerte celular por estrés oxidativo (87, 88). Otras evidencias en este sentido sugieren que AIF podría tener un papel antioxidante tejido-específico, ya que la actividad de la SOD y la catalasa en músculo esquelético de este modelo son un 150% y un 200% respectivamente mayores en comparación al control, fenómeno que no aparece en otros tejidos como la retina o el cerebelo (78). Por otro lado, se han estudiado los niveles de ROS en células inmortalizadas Hep3B y HeLa con el ARNm de AIF interferido, observando que éstos son 1,5-2 veces más altos que en las células control, efecto que se revierte mediante el tratamiento con antioxidantes (89). Además, en células Hep3B con el ADN mitocondrial deplecionado no se produce un aumento de los niveles de ROS, lo que sugiere que la función de AIF es detoxificar las ROS provenientes de la CTE y no de otras partes de la célula (89).

Sin embargo, otros estudios contradicen la afirmación de que AIF actúe como un antioxidante. Por ejemplo, se ha demostrado que, en mitocondrias aisladas de cerebro de ratones Hq, la producción de ROS es similar a la observada en mitocondrias de animales WT, de lo cual se deduce que AIF no modula directamente la liberación de ROS, y que el estrés oxidativo asociado a su déficit es una consecuencia de la disfunción mitocondrial (90). En otro estudio llevado a cabo en un modelo de ratón KO total para AIF en músculo esquelético e hígado, se observó que los niveles de ROS, catalasa, carboxilación y peroxidación lipídicas permanecen inalterados con respecto al WT, por lo que no se atribuyó a AIF ningún papel antioxidante (80). Además, se han llevado a cabo estudios en modelos celulares —en las líneas HCT116, DLD-1, SW480, MCF-7 y A549 con el ARNm de AIF interferido—, en los que se ha comprobado que los niveles de ROS se reducen con respecto a las células control, sugiriendo, por el contrario, que la función normal de AIF contribuye a la producción de ROS (91).

3. Enfermedades mitocondriales.

Las enfermedades mitocondriales (EM) conforman un grupo de desórdenes genéticos caracterizados por la presencia de mitocondrias cuya función OXPHOS se encuentra alterada de forma directa o indirecta. En la actualidad se estima que la incidencia del conjunto de las EM es de aproximadamente 1 de cada 5000 nacimientos, constituyendo el grupo de errores congénitos del metabolismo más numeroso (92). Sin embargo, a título individual, cada EM representa en sí misma una enfermedad rara.

De las aproximadamente 1500 proteínas requeridas para el normal funcionamiento de una mitocondria, 13 son codificadas por el ADNmt; el resto están codificadas en el ADN nuclear, son traducidas en el citoplasma e importadas a la mitocondria. Por lo tanto, las EM pueden estar causadas tanto por mutaciones en ADNmt como en el ADN nuclear. Las mutaciones en el ADNmt siguen una herencia materna y su patogenicidad depende del tipo de mutación y del número de copias de ADNmt mutadas

presentes en cada tejido u órgano. En cambio, las mutaciones en proteínas codificadas por el ADN nuclear siguen una herencia mendeliana que puede ser autosómica (dominante o recesiva) o ligada al cromosoma sexual X. Las mutaciones en el ADN nuclear pueden afectar al sistema OXPHOS de forma directa, así como de manera indirecta mediante defectos en el mantenimiento, la replicación, transcripción y traducción del ADNmt; la dinámica mitocondrial; la maquinaria de importe a la mitocondria; la integridad de la membrana; y la homeostasis metabólica (93). La deficiencia de CI supone alrededor de un 30% del total de diagnósticos, constituyendo así la principal causa de EM, y dando lugar a trastornos neurológicos, musculares, acidosis láctica y disfunción en órganos como el corazón, hígado y riñón (94).

3.1. Manifestaciones de las enfermedades mitocondriales.

Las EM son muy heterogéneas tanto a nivel genético como clínico. Esto se refleja en el hecho de que distintas mutaciones pueden dar lugar a una misma EM, así como la misma mutación puede dar lugar a diferentes manifestaciones clínicas. Las EM pueden manifestarse a cualquier edad y cursar con un amplio abanico de síntomas diferentes. Aunque pueden afectar a cualquier órgano o tejido, normalmente se presentan de forma multisistémica, viéndose más afectados aquellos órganos que tienen un mayor requerimiento energético (como cerebro, hígado, corazón y músculo esquelético). Todas estas características dan lugar a un amplio espectro de presentaciones clínicas que incluyen demencia, ataxia, fallo hepático, disfunción renal, ceguera, sordera, miopatía y cardiomiopatía, entre otras. Por su alta prevalencia y por la severidad de los síntomas asociados, la afectación del músculo esquelético y el corazón representa un importante campo de estudio dentro de las EM.

3.1.1. Miopatía mitocondrial.

La miopatía mitocondrial se origina cuando las mitocondrias presentes en las fibras musculares exhiben defectos en su función y dinámica. Esto da lugar al mal funcionamiento de la maquinaria contráctil muscular y a la acumulación intermiofibrilar y subsarcolemal de mitocondrias, característica que se conoce como presencia de “fibras rojo rasgadas” (por su aspecto con la tinción tricrómico de Gomori) (95). En la rutina clínica, se realizan biopsias musculares para el diagnóstico de las EM; en ellas es habitual observar, mediante microscopía electrónica, mitocondrias subsarcolemales hinchadas y alargadas, con crestas irregulares e inclusiones paracrystalinas. Otras características que se pueden encontrar en los músculos, aunque no son específicas de las EM, son la presencia de fibras atrofiadas o hipertrofiadas, núcleos internos en las fibras, un aumento en la cantidad de gotas lipídicas y acumulación de colágeno (96). La aparición de los síntomas musculares es muy variable y suele darse de forma progresiva; los síntomas más habituales son debilidad muscular, atrofia muscular e intolerancia al ejercicio (referida a la aparición de fatiga precoz o desproporcionada ante cualquier actividad física, frecuentemente acompañada de dolor y destrucción muscular). A menudo, la debilidad comienza en los músculos de los ojos y los párpados, lo que da lugar a oftalmoplejía progresiva y ptosis (97). Además, suele aparecer debilidad en otros músculos de la cara y cuello, ocasionando problemas en el habla y en la deglución (98). Algunos pacientes pueden presentar debilidad en brazos y piernas lo que, en algunos

casos, limita su uso (98). Uno de los síntomas más graves que puede aparecer es debilidad en los músculos implicados en la respiración, con la consecuente necesidad de ventilación artificial para respirar (98).

3.1.2. Cardiomiopatía mitocondrial.

Las manifestaciones cardíacas en las EM pueden ser causadas por defectos estructurales del corazón, funcionales, o ambos. Incluyen cardiomiopatía, arritmia, fallo cardíaco, hipertensión pulmonar, dilatación de la aorta, derrame pericárdico, enfermedad coronaria y muerte súbita (99, 100). Se estima que la frecuencia con la que se desarrolla cardiomiopatía en las EM es de alrededor del 20-25%, y hasta del 40% en algunos casos (101). Además, la mortalidad en niños con EM que presentan cardiomiopatía es mucho más alta que en aquellos que no la presentan. La forma más común de cardiomiopatía es la hipertrófica, que se da en el 40% de los pacientes (101, 102), y en muchos de los casos de deficiencia en el CI de la CTE. Por ejemplo, está asociada al síndrome MELAS, producido por mutaciones en genes que codifican el ARN transferente mitocondrial; a la deficiencia en coenzima Q10, causada por mutaciones en genes implicados en la biosíntesis de la coenzima Q10; o la ataxia de Friedreich, causada por defectos en el gen de la frataxina. Otro tipo de cardiomiopatía común en las EM es la dilatada, que se da, por ejemplo, en el síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojo rasgadas (MERF), causado por mutaciones en genes que codifican el ARN transferente mitocondrial; el síndrome de Kearns-Sayre, producido por deleciones en el ADNmt; y el síndrome de Barth, causado por mutaciones en el gen de la tafazzina. Otras formas menos frecuentes de cardiomiopatía en las EM son la histiocitoide (que también se da en el síndrome MERF), la restrictiva o la asociada con fibroelastosis endocárdica (103, 104). El corazón es un órgano con una alta demanda energética; y se ha puesto de manifiesto su adaptación para regular el metabolismo en función de los sustratos disponibles para la producción de energía, pudiendo pasar de oxidar ácidos grasos preferentemente a oxidar glucosa en condiciones patológicas. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales las alteraciones en la utilización de sustratos pueden causar cardiomiopatía es aún un tema de intensa investigación (105).

3.1.3. Deficiencia del factor inductor de apoptosis en humanos.

Desde el año 2010, se han descubierto numerosas mutaciones patogénicas en el gen *Aifm1*, con un patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X, y asociadas a un fenotipo mitocondrial muy variable en cuanto a la sintomatología y la severidad. Entre las diferentes manifestaciones clínicas encontradas en distintos pacientes se encuentran encefalomiopatía, neuropatía auditiva familiar y esporádica, disfunción neuro-motora severa infantil, leucodistrofia hipomielinizante, ataxia, displasia espondilometáfisaria, así como atrofia muscular (106). De hecho, esta última se ha relacionado con pérdida muscular, dificultades para tragar, insuficiencia respiratoria y oftalmoplejía externa progresiva (107). Además, se ha reportado un caso de cardiomiopatía hipertrófica infantil (108). En algunos de estos pacientes se han estudiado los niveles de actividad OXPHOS en biopsias musculares (108–112) o fibroblastos (113), observándose diferentes disfunciones que afectan a unos u otros complejos de la CTE. Principalmente se ha encontrado

un déficit de actividad de los complejos CIV (108–110, 112, 114) y CI (108, 112, 113); y en menor medida, del CIII (109, 113).

Por otro lado, aunque las mutaciones en AIF han sido mayoritariamente relacionadas con mitocondriopatías neurodegenerativas, esta proteína también ejerce un papel importante en el contexto de otras enfermedades como el cáncer (115–118).

3.2. Ratón *Harlequin* como modelo de enfermedad mitocondrial.

Uno de los modelos murinos disponibles para el estudio de las EM es el ratón *Harlequin*. Éste se originó de forma espontánea a consecuencia de una inserción viral en el intrón 1 del gen *Aifm1*. Dicha inserción causa una pérdida parcial de AIF, quedando de forma residual aproximadamente un 20% de los niveles de ARNm y proteína con respecto al ratón *wild type* (WT). La deficiencia total de AIF es letal a nivel embrionario (119). Sin embargo, los niveles residuales de AIF en el ratón Hq son suficientes para generar ratones viables y fértiles. No obstante, tanto los ratones machos hemicigotos como las hembras homocigotas para la mutación presentan características típicas de las EM, entre las que destacan una neurodegeneración progresiva, ataxia, ceguera por degeneración de la retina, miopatía y un mayor riesgo de desarrollar cardiomiopatía (78). La deficiencia de AIF en el ratón Hq está asociada a una disfunción OXPHOS que afecta principalmente al CI. Por ello, el ratón Hq es considerado un modelo útil para evaluar potenciales aproximaciones terapéuticas para las EM.

3.2.1. Fenotipo del ratón *Harlequin*.

Desde el nacimiento, los ratones Hq presentan un menor tamaño que los ratones WT, siendo esta diferencia aún más marcada en la edad adulta (78, 120). Inicialmente, los ratones Hq carecen de pelaje, mientras los WT comienzan a desarrollarlo; sin embargo, poco tiempo después se observa un cierto desarrollo del pelo de forma parcheada (78, 120). Se ha observado una correlación directamente proporcional entre el peso corporal y el porcentaje de superficie corporal cubierta por pelo que presentan los ratones Hq, así como una correlación inversamente proporcional entre estos dos parámetros y la severidad de la ataxia que desarrollan (78).

La deficiencia de AIF no afecta con la misma severidad al fenotipo de todos los tejidos en el ratón Hq, así como tampoco da lugar a la misma disfunción del sistema OXPHOS, siendo el sistema nervioso el tejido más afectado. A los 3 meses de edad se detecta ataxia cerebelosa en la mayoría de los animales Hq, la cual va agravándose con el paso del tiempo (78). Además, los ratones Hq desarrollan una degeneración de la retina aproximadamente a partir de los 4 meses de edad, lo que les conduce a la ceguera (87). El fenotipo del sistema nervioso se correlaciona con una reducción de la actividad del CI muy significativa, de aproximadamente el 50% en regiones como cerebelo, tálamo, corteza y nervio óptico; y de un 75% en la retina (77, 78). Puesto que el sistema nervioso es el tejido con un fenotipo más acusado, la mayoría de los esfuerzos se han invertido en estudiar las bases fisiopatológicas de la deficiencia de AIF en cerebro y retina. Por ello, el conocimiento que se tiene sobre el papel de AIF en otros tejidos, como corazón y músculo esquelético, es mucho más limitado.

El fenotipo cardiaco en el ratón Hq es, *a priori*, más moderado, pues la actividad del CI es similar a la de ratones control (77, 78). Sin embargo, los cardiomiocitos del ratón Hq son más sensibles a sufrir muerte celular inducida por estrés oxidativo que los WT (88). Además, tras sufrir un proceso de isquemia/reperfusión, los ratones Hq presentan un mayor daño isquémico y un área de infarto más grande que los WT. Asimismo, muestran una mayor susceptibilidad de fallo cardiaco por estrés biomecánico (88).

Por otro lado, se ha descrito que la diferencia de tamaño y peso de los ratones Hq se debe a que éstos desarrollan atrofia muscular. Aunque el número de fibras permanece inalterado, éstas presentan un menor tamaño y una disminución del número de núcleos, así como un cambio de fibras rápidas a fibras lentas, tanto en músculos “lentos” como el sóleo, como en músculos “rápidos” como el EDL (*extensor digitorum longus*) (120). Además, tanto el sóleo como el EDL del ratón Hq presentan un claro retraso en el proceso de regeneración muscular tras una inyección con cardiotoxina, comparado con el ratón WT (120). Este fenotipo del músculo esquelético en el ratón Hq se corresponde con un déficit de actividad del CI de aproximadamente el 30% respecto al ratón control (78).

Aparte de lo observado en el ratón Hq, en un modelo de ratón KO total para AIF específico de músculo esquelético y corazón, se ha detectado el desarrollo de una cardiomiopatía dilatada severa y atrofia muscular asociados a un déficit de actividad del CI de hasta un 80% en ambos tejidos, sumado a un déficit moderado del CIV en el corazón (81).

4. Autofagia.

La autofagia es un proceso catabólico que participa en el reciclaje de componentes celulares, desde proteínas hasta orgánulos enteros, al enviarlos a los lisosomas para su degradación. Se trata de un proceso altamente regulado con importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis celular, que generalmente promueve la supervivencia celular y evita la apoptosis (121). La autofagia puede ser no selectiva —cuando engulle aleatoriamente porciones del citosol—, o selectiva, cuando secuestra sustratos u orgánulos específicos, como es el caso de la degradación selectiva de mitocondrias o mitofagia. El entorno ácido y las hidrolasas presentes en el lisosoma degradan la carga, exportando los componentes reciclados al citoplasma para ser utilizados de nuevo en procesos biosintéticos o en la generación de energía.

Atendiendo a la manera en la que la diana a degradar es llevada a los lisosomas, se pueden diferenciar tres tipos de autofagia: macroautofagia, cuando la diana es rodeada por una estructura membranosa denominada “fagóforo”, que se elonga hasta formar una estructura cerrada de doble membrana conocida como “autofagosoma”, para finalmente ser liberada al lisosoma en el que se degrada; microautofagia, cuando el lisosoma, a partir de la invaginación de su membrana, engulle directamente una porción de citoplasma u orgánulo; y autofagia mediada por chaperonas, en la cual las chaperonas dirigen hacia los lisosomas únicamente a aquellas proteínas que contienen un motivo peptídico concreto (motivo

KFERQ) (122). De los tres tipos de autofagia, la macroautofagia es la mejor estudiada hasta la fecha y a partir de ahora se hará referencia a ella en esta memoria como autofagia.

En respuesta al tipo de estrés ambiental inductor de la autofagia, ésta puede ser regulada a través de dos rutas: dependiente o independiente de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*).

4.1. Regulación dependiente de mTOR.

mTOR está constituido por dos complejos multiproteicos: mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*) y mTORC2 (*mechanistic target of rapamycin complex 2*). En condiciones normales, mTORC1 actúa como un regulador del crecimiento y la proliferación celular, promoviendo rutas anabólicas que incluyen biosíntesis de proteínas, lípidos y orgánulos; así como limitando procesos catabólicos como la autofagia. Por otro lado, mTORC2 regula principalmente la estructura del citoesqueleto y la supervivencia celular (123).

En células de mamíferos, la generación del autofagosoma comienza con la formación del fagóforo, que es inducida por un complejo compuesto por las proteínas ULK1/ULK2 (*unc-51-like kinase 1/2*), ATG13 (*autophagy-related protein 13*), RB1CC1 (*RBI-inducible coiled-coil protein 1*) y C12orf44 (*Chromosome 12 open reading frame*) (44). En condiciones normales, mTORC1 se asocia con este complejo y —mediante la fosforilación de ULK1 (en su residuo S757) y de ATG13— evita que se una a él la AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-2*) (124). Sin embargo, en condiciones de escasez de nutrientes, mTORC1 es inhibido y se disocia del complejo, de manera que se desfosforilan parcialmente estas proteínas, a la vez que AMPK se une y fosforila a ULK1 (en su residuo S555), induciendo la autofagia (124). El complejo ULK, así activado, recluta a otro complejo formado por las proteínas PIK3C3 (*phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*), beclin1 y PIK3R4 (*phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4*) (125). Este complejo produce fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P), que es esencial para reclutar otras proteínas con motivos de unión a este fosfoinosítido (122). Algunas de ellas forman parte del complejo ATG12-ATG5-ATG16L (*Autophagy-related 12, 5 and 16L*), que facilita la unión covalente de LC3-I (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) al grupo amino del fosfolípido de membrana fosfatidiletanolamina (formándose LC3-II). Así, LC3-II se asocia con el fagóforo y participa en su elongación (mediante la incorporación de lípidos) y su cierre para formar el autofagosoma (122). Finalmente, el autofagosoma se dirige hacia el lisosoma y se fusiona con él, formando el autolisosoma, donde la carga es digerida (122) (Fig.6).

4.2. Regulación independiente de mTOR.

Existen varios mecanismos que regulan la autofagia que no son dependientes de la acción de mTOR. Es el caso de AMPK, uno de los mayores sensores de energía en la célula. AMPK detecta los niveles de AMP/ATP y regula una gran variedad de procesos, incluyendo la autofagia. Un bajo nivel de energía en la célula activa a AMPK, que puede inhibir al complejo mTORC1 o directamente fosforilar y activar a ULK1, activando la autofagia (122). También se ha visto que las ROS pueden activar a algunos

reguladores de la autofagia. Por ejemplo, en condiciones de falta de nutrientes, las ROS pueden oxidar residuos de cisteínas de la AMPK, aumentando así su actividad (126) (Fig.6).

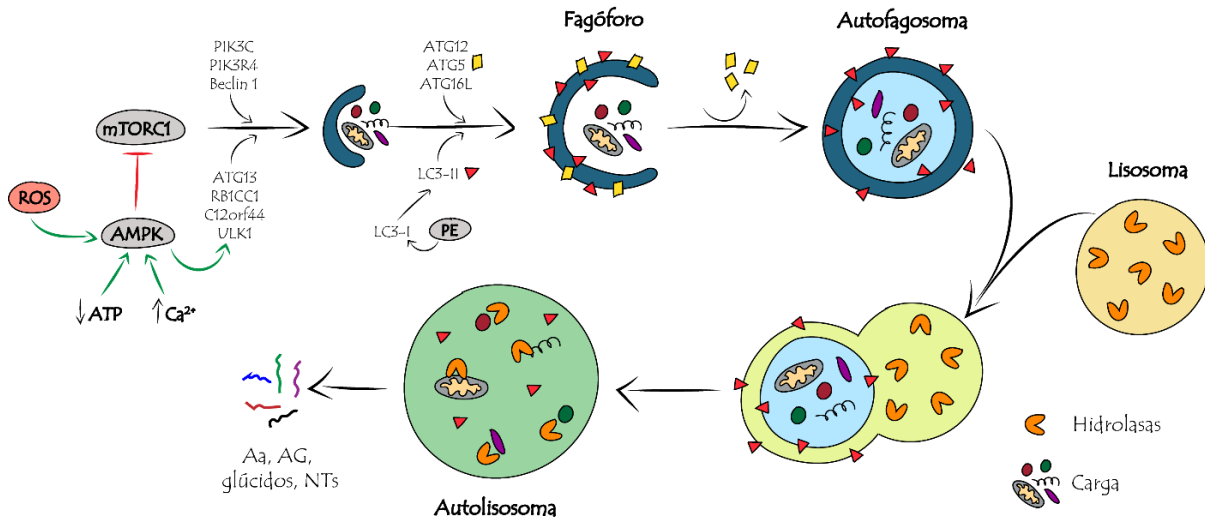


Figura 6. Esquema representativo del mecanismo de autofagia. Un descenso de los niveles de ATP, un incremento en la $[Ca^{2+}]$ citosólica o de las ROS pueden activar a la AMPK. Ésta, mediante la inhibición de mTORC1 o directamente fosforilando a ULK1, desencadena la formación del fagóforo, proceso en el que intervienen distintos complejos proteicos. Una vez rodeada la carga, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma, formándose el autolisosoma, donde la carga será degradada por las hidrolasas del lisosoma. Los productos de la degradación son utilizados por la célula en procesos biosintéticos o en la generación de energía. PE: fosfatidiletanolamina; aa: aminoácidos; AG: ácidos grasos; NTs: nucleótidos.

Por otro lado, se han descrito numerosos casos en los que variaciones en la $[Ca^{2+}]$ celular regulan los niveles de autofagia. Por ejemplo, se ha observado que un incremento en la $[Ca^{2+}]$ citosólica producida por estrés del RE causa la activación de AMPK a través de la CAMKK2 (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*), induciendo así la autofagia (127). También se ha visto que el Ca^{2+} puede inducir la autofagia vía WIPI1 (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 1*), mediante una ruta alternativa que activa la CAMKKI (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I*) y sin activar a AMPK (128) (Fig.6).

4.3. Autofagia en las enfermedades mitocondriales.

En condiciones fisiológicas, se dan unos niveles basales de autofagia que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis celular. No obstante, en situaciones de estrés celular como falta de nutrientes o de ATP, puede darse una activación de la autofagia que tiene como consecuencia la degradación de proteínas u orgánulos disfuncionales, así como la generación de energía (129). En los músculos estriados, se ha demostrado que un nivel adecuado de autofagia es esencial para mantener la masa muscular y una correcta fisiología del músculo esquelético (130, 131) y cardíaco (132, 133). Sin embargo, una desregulación de la autofagia, ya sea por una disminución de los niveles requeridos o por una sobre activación de la misma, puede conducir a la muerte celular. En este sentido, también se han descrito numerosos casos en los que la desregulación de la autofagia puede favorecer el desarrollo de miopatía en músculo esquelético (134) y en corazón (135).

En los últimos años, en diversos modelos de EM se ha descrito una acumulación de marcadores de autofagia, que podría deberse tanto a la activación de la vía —como mecanismo de compensación para obtener energía, y de eliminación de mitocondrias disfuncionales— como a un fallo secundario en el flujo autofágico. Por ejemplo, se ha observado un incremento en la eliminación de mitocondrias mediante mitofagia en las fibras musculares de un modelo de ratón con una mutación en la helicasa mitocondrial Twinkle (136), y un aumento de autofagosomas en el nervio óptico de un modelo de ratón con mutación en OPA1 (137). Tanto en modelos celulares de cíbridos transmitocondriales como en fibroblastos, se ha descrito un aumento de la mitofagia y una acumulación de marcadores autofágicos por un flujo interrumpido (138, 139). Además, existen numerosos trabajos en los que se muestra la acumulación de marcadores autofágicos, entre los que se encuentra un estudio realizado por nuestro grupo en fibroblastos de distintos pacientes con EM (140–146). Estas evidencias sugieren que las alteraciones de la autofagia pueden jugar un papel en la fisiopatología muscular de las EM y, por ello, su regulación constituye una nueva diana terapéutica para abordar nuevos tratamientos. Por ejemplo, se ha demostrado que la inhibición de mTOR mediante la administración de rapamicina a ratones modelo del síndrome de Leigh retrasa la aparición y el desarrollo de los síntomas neurológicos y extiende la esperanza de vida (147).

5. Entrenamiento físico como terapia.

5.1. Beneficios del entrenamiento en la población general.

Actualmente existen muchas evidencias sobre los beneficios de la actividad física en la salud. El ejercicio físico realizado de forma rutinaria ha sido asociado con la reducción del riesgo de mortalidad prematura, así como con la prevención de al menos 25 tipos de enfermedades crónicas (148), entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares, desórdenes musculoesqueléticos, diabetes o cáncer (149). Por ejemplo, se ha visto que el ejercicio atenúa el proceso de enfermedad coronaria, disminuyendo la probabilidad de re-infarto y la mortalidad por causas cardíacas (150). Se ha observado que el ejercicio incrementa el aporte de oxígeno al corazón; reduce la fibrosis del miocardio, la producción de ROS y la apoptosis de los cardiomiocitos; promueve la angiogénesis y mejora la funcionalidad y supervivencia de los cardiomiocitos (151). Por otro lado, en el músculo esquelético, el ejercicio físico da lugar a un aumento en la fuerza, como consecuencia de la hipertrofia muscular generada, lo cual tiene implicaciones positivas en la percepción de la salud, especialmente en pacientes con sarcopenia, miopatía, intolerancia al ejercicio o desórdenes de movilidad (152). Se ha observado que, en respuesta al ejercicio, el músculo esquelético es capaz de producir un incremento del número de mitocondrias, facilitando la rápida generación de ATP (153), así como un incremento del número de transportadores de glucosa que facilita la entrada de glucosa a la célula (154).

5.2. Efectos del entrenamiento en la autofagia.

Durante el ejercicio físico se produce un desbalance de energía que induce una remodelación celular para intentar satisfacer el requerimiento energético. Además, las mitocondrias ineficientes y las

proteínas dañadas u oxidadas deben ser recicladas para permitir la síntesis de nuevos orgánulos y proteínas, mejorando así el funcionamiento de la maquinaria contráctil. En este sentido, cada vez más estudios demuestran que la autofagia tiene un papel clave en las adaptaciones del músculo esquelético al ejercicio. Así, el estrés celular que genera el ejercicio da lugar a alteraciones en los niveles de mensajeros como el Ca^{2+} , el AMP, el NAD^+ y las ROS, capaces de activar la autofagia para restaurar la homeostasis (155). Un desequilibrio en los niveles de autofagia, tanto por déficit como por exceso, puede dar lugar a una disfunción muscular y a la aparición de enfermedades degenerativas y distrofia muscular (156, 157). Por otro lado, se ha demostrado que el ejercicio físico es capaz de restaurar unos niveles adecuados de autofagia en el corazón, promoviendo la supervivencia de los cardiomiocitos y la función cardíaca, y ejerciendo de esta manera un efecto terapéutico sobre la enfermedad cardíaca (158, 159). Los efectos beneficiosos del ejercicio sobre la autofagia en el corazón pueden deberse tanto a un aumento de los niveles de autofagia basal (160) como a un efecto inhibitorio sobre ésta en aquellas enfermedades cardiovasculares en las que existe un exceso de autofagia (161). Sin embargo, también es necesario tener en cuenta que la práctica excesiva de ejercicio puede incrementar los niveles de autofagia hasta el punto de ejercer un efecto nocivo sobre los cardiomiocitos (162).

5.3. Efectos del entrenamiento en las enfermedades mitocondriales.

Actualmente no existe una cura efectiva para la mayoría de las EM. Los tratamientos disponibles están destinados a paliar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes (163). El ejercicio físico es uno de los tratamientos que desde hace unos años está cobrando cada vez más fuerza, aplicándose de forma coadyuvante para atenuar algunas de las manifestaciones clínicas de las EM (164). Los pacientes con miopatías de origen mitocondrial a menudo presentan intolerancia al ejercicio, que se manifiesta con síntomas como taquicardia y disnea a intensidades bajas, causados por la incapacidad de los músculos para utilizar el oxígeno que les llega (165). A pesar de esta condición, en los últimos años numerosos estudios han demostrado que el músculo mantiene una capacidad plástica que le permite adaptarse al entrenamiento. Así, programas de entrenamiento moderado —tanto de resistencia (166–168) como de fuerza (169, 170) y combinados (171)— han demostrado aumentar la biogénesis y la funcionalidad de las mitocondrias de miocitos de pacientes con EM, mejorando la capacidad oxidativa de los músculos, la tolerancia al ejercicio y la calidad de vida de los pacientes. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha estudiado los efectos que tiene sobre pacientes con EM un innovador programa combinado de entrenamiento de resistencia, fuerza y de los músculos respiratorios, aplicado durante 8 semanas (172). Los resultados han mostrado numerosas mejoras en diferentes indicadores de la capacidad física, incluyendo la capacidad aeróbica, la fuerza muscular, la potencia de los músculos respiratorios y la capacidad para realizar actividades de la vida diaria y la propia percepción de la salud general. Además, se ha observado un cambio en la composición corporal, hacia un incremento de masa muscular y una reducción de masa grasa (172). Por otro lado, nuestro grupo ha estudiado los efectos de un programa de entrenamiento combinado de resistencia y fuerza en el ratón Hq, observando una mejora significativa en la capacidad aeróbica y en la fuerza muscular, junto a un incremento en los niveles de

PGC1 α [*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*] y la actividad de los complejos OXPHOS en músculo esquelético (173).

Pese a los numerosos beneficios que el ejercicio físico produce en los pacientes con EM, las bases moleculares que los explican son, en su mayoría, desconocidas. Algunos estudios realizados en pacientes con miopatía mitocondrial indican que el entrenamiento induce un incremento de la capacidad oxidativa residual del músculo por aumento del contenido mitocondrial y de la actividad de los complejos de la CTE (166, 167, 174). Aunque alguno de los trabajos ha atribuido las mejoras funcionales a descensos en el porcentaje de heteroplasmia (175), otros estudios han demostrado ausencia de cambio en esta variable (166, 169, 174). Por otro lado, hay investigaciones que han señalado la atenuación del estrés oxidativo por efecto del entrenamiento como mecanismo positivo de adaptación (176). En animales, se han llevado a cabo algunos estudios en ratones con deficiencia en el CIV (177) o en ratones deficientes en la polimerasa gamma mitocondrial (178), en los que se ha mostrado cómo un programa de entrenamiento de resistencia incrementa los niveles de PGC1 α , la masa mitocondrial y la capacidad OXPHOS, asociados a una menor producción de ROS. Por otro lado, hasta ahora, pese a la acumulación de marcadores de autofagia en los músculos esqueléticos de pacientes con EM, apenas se ha estudiado si el entrenamiento puede contribuir a mejorar la regulación de la autofagia en estas patologías.

Los efectos del entrenamiento a nivel cardíaco en las EM han sido mucho menos estudiados. Hasta la fecha, un estudio ha analizado la respuesta cardíaca al entrenamiento en pacientes con el síndrome MELAS, indicando que los pacientes tenían la misma capacidad cardíaca de adaptación que los individuos sanos, y que las limitaciones funcionales se deben principalmente a la limitación muscular y a un aumento del tono simpático sobre el sistema cardiovascular (179). Asimismo, métodos de simulación matemática han revelado que, en comparación con el corazón, la mayor vulnerabilidad del músculo esquelético al fallo OXPHOS en situaciones de aumento de la demanda de ATP podría ser debida a una mayor acumulación de fosfato inorgánico citosólico (180). No obstante, puesto que el entrenamiento ha demostrado efectos beneficiosos en pacientes con miopatía mitocondrial, es también relevante extender el análisis de su utilidad y seguridad en casos de cardiomiopatía mitocondrial.

OBJETIVOS

Objetivos

El corazón y el músculo esquelético son tejidos con una alta demanda energética, lo que los lleva a sufrir afectaciones severas en las enfermedades mitocondriales. Actualmente se desconocen gran parte de los efectos que la deficiencia de AIF produce en estos tejidos, así como su momento de aparición y evolución a lo largo de la vida. Por otro lado, se ha comprobado que el ejercicio físico moderado en pacientes con enfermedad mitocondrial mejora la funcionalidad de las mitocondrias de los miocitos, aumentando la capacidad oxidativa de los músculos, y mejorando así la tolerancia al ejercicio y la calidad de vida de los pacientes.

Con estos precedentes, en esta tesis doctoral se han propuesto dos objetivos principales:

Objetivo 1: estudiar las bases fisiopatológicas que subyacen al fenotipo causado por la deficiencia de AIF, tanto en corazón como en músculo esquelético del ratón *Harlequin*.

Objetivo 2: estudiar los efectos, a nivel molecular, que un programa de entrenamiento combinado de resistencia y fuerza produce en el corazón y el músculo esquelético del ratón *Harlequin*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales.

1.1. Reactivos, tampones, medios de cultivo, kits y *softwares*.

Todos los reactivos, tampones, medios de cultivo y kits empleados en la presente tesis doctoral fueron de grado analítico y adecuados para las técnicas de biología molecular y celular correspondientes. La composición específica de las soluciones se detalla a lo largo de los métodos descritos en las siguientes páginas. A continuación, se especifica la casa comercial y el país de origen en los que fueron adquiridos los distintos productos.

Tabla 1. Productos, *software* y equipos.

Producto	Casa comercial	Lugar de origen
Azida sódica	Sigma-Aldrich	Missouri
Azul de tripano	Bio-Rad	California
Biochrom 30+	Biochrom Ltd	Reino Unido
Catalase Colorimetric Activity Kit	Arbor Assays	Michigan
Chemidoc MP Imaging System	Bio-Rad	California
Colagenasa tipo II	Worthington	Nueva Jersey
Contador automático de células	Bio-Rad	California
Coomassie Brilliant Blue G-250	Thermo Scientific	Massachusetts
Criterion™ Cell	Bio-Rad	California
Dako Fluorescent Mounting Medium	Agilent	Massachusetts
Deoxinucleótidos trifosfato	Nzytech	Portugal
Detodecilsulfato sódico	Bio-Rad	California
Digitonina	Merck	Alemania
Dimetil sulfóxido	Sigma-Aldrich	Missouri
DMEM for Primary Cell Isolation	Thermo Scientific	Massachusetts
ECL CheLuminate-HRP PicoDetect	PanReac	Alemania
ECL SuperSignal™ West Femto	Thermo Scientific	Massachusetts
Electrodos CS-420	Cibertec	España
Epoch Microplate Spectrophotometer	BioTek	Vermont
Factor de crecimiento de cardiomiocitos	Thermo Scientific	Massachusetts
Fluo-3AM	Invitrogen	Massachusetts
Formalina Q-Path®	VWR Chemicals	Pensilvania
Fosfoenolpiruvato	Sigma-Aldrich	Missouri
GraphPad Software		California
Grip Strength Meter	Harvard Apparatus, Panlab	España
HBSS	Thermo Scientific	Massachusetts
Hidroxicloroquina	Sigma-Aldrich	Missouri
ImageJ	Rasband W.S, Bethesda	Maryland
ImageScanner III	GE Healthcare	Reino Unido

Materiales y métodos

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Sigma-Aldrich	Missouri
Inhibidores de proteasas y fosfatasas	Roche Diagnostics Corporation	Indianapolis
iTRAQ® Reagents Multiplex Kit	Applied Biosystems	Massachusetts
Kit Micro BCA Protein Assay	Thermo Scientific	Massachusetts
Lactato deshidrogenasa	Sigma-Aldrich	Missouri
Leupeptina	Sigma-Aldrich	Missouri
LTQ-Orbitrap-Velos-Pro	Thermo Scientific	Massachusetts
Membranas de fluoruro de polivinilideno	Millipore	Massachusetts
MgCl₂ (PCR)	Bioline	Reino Unido
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad	California
Mitochondria Isolation Kit for Tissue	Abcam	Reino Unido
MitoStress Test	Agilent	Massachusetts
MOPS	Sigma-Aldrich	Missouri
NADH	Roche Diagnostics Corporation	Indianapolis
Neocuproina	Sigma-Aldrich	Missouri
N-etil-maleimida	Thermo Scientific	Massachusetts
Nitroazul de tetrazolio	Sigma-Aldrich	Missouri
Oligonucleótidos	Integrated DNA Technologies	Iowa
OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit	Cells Biolabs	California
PEAKS Studio X+	Bioinformatics Solutions Inc	Canada
Piruvato kinasa	Sigma-Aldrich	Missouri
Placas Lab-Tek 4 pocillos	Ibidi	Alemania
Placas XFp	Agilent	Massachusetts
Poliacrilamida	Invitrogen	California
Primary Cardiomyocyte Isolation Kit	Thermo Scientific	Massachusetts
Proteome Discoverer 1.4	Thermo Scientific	Massachusetts
Puntas de pipeta OMIX C18	Agilent Technologies	California
QG Sample Processing Kit	Invitrogen	Massachusetts
QuantiGene Plex Gene Expression Assay	Invitrogen	Massachusetts
Resina Epoxi TAAB 812	Sigma-Aldrich	Missouri
Rotarod	Letica Scientific Instruments, Panlab	España
Seahorse XF Base Medium	Agilent	Massachusetts
Software IDL®	Research Systems	Colorado
Tampón Laemmli	Bio-Rad	California
Tampón reacción 10X (PCR)	Bioline	Reino Unido
Tampón tris-glicina/SDS	Thermo Scientific	Massachusetts
Tapiz rodante	Harvard Apparatus, Panlab	España
Tapsigargina	Sigma-Aldrich	Missouri
Taq polimerasa	Applied Biosystems	California

Termociclador ThermalCycler Verity	Applied Biosystems	California
TMT sixplex Isobaric Mass Tagging Kit	Thermo Scientific	Massachusetts
Tripsina	Promega	Wisconsin
Ultramicrotomo Ultracut UCT	Leica	Alemania
XFp Extracellular Flux Analyzer	Agilent	Massachusetts

Se indican la casa comercial y el lugar de origen de cada producto o *software*.

1.2. Anticuerpos.

En las tablas 2 y 3 se especifican los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las técnicas de *western blot*, *blue native* e inmunofluorescencia.

Tabla 2. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo primario	Referencia	Dilución (WB o BN)	Dilución (IMF)
8-OHdG	Santa Cruz sc-66036		1/50
AIF	Abcam ab32516	1/2000	1/500
AMPK total	Cell Signalling #5832	1/1000	
Anexina A3	ProteinTech 11804-1-AP	1/1000	1/100
Anexina A5	GeneTex GTX103250	1/20000	
ATG16L	MBL PM040B	1/1000	
ATP5A	Abcam ab14748	1/5000	1/500
Beclin1	MBL PD017	1/1000	
Caspasa 3	Cell Signalling #9662	1/1000	
Catalasa	Sigma C0979	1/1000	
Catepsina B	Cell Signalling #31718	1/1000	
CHCHD4	ProteinTech 21090-1-AP	1/1000	
Citrato sintasa	Abcam ab96600	1/1000	
CORE2	Abcam ab14745	1/1000	
COX5A	Abcam ab110262	1/1000	
COXI	Abcam ab 14705	1/500	
FKBP12	Abcam ab24373	1/1000	
Hemoglobina-β	PAD098Mu01	1/1000	
HSP60	Abcam ab59457	1/20000	
LAMP1	DSHB 1D4B	1/1000	
LC3B	Sigma L7543	1/2000	1/1000
MFN2	Abnova H00009927-M03	1/1000	
MYL3	ProteinTech 10913-1-AP	1/2000	
NDUFA9	Abcam ab14713	1/1000	
NDUFB7	ProteinTech 14912-1-AP	1/1000	
NDUFB8	Abcam ab110242	1/1000	
NDUFS1	GeneTex GTX113787	1/1000	

OPA1	Beckton Dickinson 612606	1/1000	
OXPHOS cocktail	Abcam ab110413	1/250	
P62	Abcam ab109012	1/5000	
pAMPK (Thr172)	Cell Signalling #2535	1/1000	
pmTOR (Ser2448)	Cell Signaling #5536	1/1000	
Polímeros de PAR	Abcam ab14459	1/500	
PRDX6	GeneTex GTX115262	1/1000	
Proteasoma 26 S	Abcam ab140675	1/1000	
pRYR2 (S2814)	Badrilla A010-31	1/5000	
RYR1	Abcam ab2868	1/5000	
RYR2	Thermofisher MA3-916	1/1000	
SDHA	Abcam ab14715	1/10000	
SDHB	Abcam ab14714	1/1000	
SERCA2	Abcam ab2861	1/1000	
SOD1	Enzo ADI-SOD-100	1/1000	
SOD2	Millipore 06-984	1/1000	
TOM20	Proteintech 11802-1-AP	1/10000	
Troponina C1	Proteintech 13504-1-AP	1/2000	
Troponina I	Proteintech 21652-1-AP	1/2000	
VDAC1	Abcam ab14734	1/2000	

Abreviatura del antígeno que reconoce cada anticuerpo primario utilizado, casa comercial, referencia del producto y dilución empleada para las técnicas de *western blot* (WB), *blue native* (BN) e inmunofluorescencia (IMF).

Tabla 3. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo secundario	Referencia	Dilución (WB y BN)	Dilución (IMF)
Goat anti-mouse IgG2b-TexasRED	Southern Biotech 1090-07		1/500
Goat anti-mouse-Px IgG	Invitrogen G21040	1/2000	
Goat anti-rabbit-Alexa 488	Fisher A11008		1/500
Goat anti-rabbit-Px IgG	Invitrogen G21234	1/2000	
Goat anti-rat-Px IgG	Sigma A9057	1/3000	
Rat anti-mouse Ig HRP	Quimigen 18-8817-33	1/2000	

Anticuerpo secundario utilizado, casa comercial, referencia del producto y dilución empleada para las técnicas de *western blot* (WB), *blue native* (BN) e inmunofluorescencia (IMF).

1.3. Modelo animal.

Los estudios de esta tesis doctoral se realizaron con ratones macho *Harlequin* (Hq/Y, B6CBACa Aw-J/A-Aifm1Hq/J) como modelo de enfermedad mitocondrial, y ratones macho de la cepa B6CBACa Aw-J/A como controles sanos (*wild type*, WT).

Se llevaron a cabo dos estudios, realizados de forma independiente y con distintos grupos de ratones. Por un lado, se estudiaron los efectos de una intervención con entrenamiento (detallada más adelante) sobre las variables que caracterizan la enfermedad mitocondrial en los músculos estriados del ratón Hq. Para ello, se adquirieron un total de 44 ratones de 6-8 semanas de edad, procedentes del Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), y se establecieron 4 grupos experimentales: WT sedentarios (WT Sed; n=12), WT entrenados (WT Ent; n=11), Hq sedentarios (Hq Sed; n=11) y Hq entrenados (Hq Ent; n=10). Por otro lado, se estudió la evolución temporal causada por la deficiencia de AIF en músculo cardíaco y esquelético del ratón Hq, para lo que se recibieron del Jackson Laboratory ratones macho WT (B6CBACa Aw-J/A) y hembras heterocigotas (X/Hq, B6CBACa Aw-J/A-Aifm1Hq/J) de 6-8 semanas de edad, los cuales fueron cruzados entre sí para la obtención de la descendencia necesaria con la que realizar los análisis a diferentes edades. A partir de la descendencia (generaciones F₁ y F₂), se fueron asignando de forma aleatoria ratones macho Hq y WT a tres grupos correspondientes a 2, 3 y 6 meses —según la edad a la que serían sacrificados—. Así, se establecieron 6 grupos experimentales, con 8-12 ratones en cada uno: WT 2 meses, Hq 2 meses, WT 3 meses, Hq 3 meses, WT 6 meses y Hq 6 meses.

Los ratones se mantuvieron en el animalario del Hospital 12 de Octubre en condiciones controladas de temperatura (21°C), humedad (60%) y ventilación, así como con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, y acceso a comida y agua *ad libitum*.

2. Métodos.

2.1. Procedimientos con ratones.

Todos los experimentos realizados con ratones fueron previamente aprobados por los Comités de Ética y Bienestar Animal del Hospital 12 de Octubre, de la Universidad Autónoma de Madrid y de la Comunidad de Madrid. Asimismo, fueron autorizados y realizados según la legislación para la protección de animales de investigación, tanto europea (Convención Europea para la Protección de los Animales Vertebrados ETS123) como española (32/2007 y R.D. 1201/2005). El código de permiso para el estudio de los efectos del entrenamiento fue el PROEX111/15; el código de permiso para el estudio de la evolución temporal fue el CEI85-1567-A248.

2.1.1. Genotipado del gen *Aifm1*.

Para el genotipado de los ratones, se realizó una extracción de ADN a partir de un fragmento de cola. Éste se troceó en pequeños pedazos y se homogeneizó en una solución de NaOH 25 mM y ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) 0,2 mM estéril. Se calentó la mezcla durante 30 minutos a 95°C y en agitación. Finalmente, se añadió TRIS-HCl 40 mM estéril y se centrifugó durante 3 minutos a 1500 x g para obtener el sobrenadante con el ADN.

Una vez aislado el ADN, se llevó a cabo la determinación de la presencia o ausencia de la inserción viral en el gen *Aifm1* mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo que se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Klein *et al.* (87): dos oligonucleótidos para el intrón 1 de

Aifm1 (5'-AGTGTCCAGTCAAAGTACCGGG-3' para el *forward*; 5'-CTATGCCCTTCTCCATGTAGTT-3' para el *reverse*) y un oligonucleótido para la inserción viral (5'-CCAGAACTGTCTCAAGGTTCC-3'). Para cada muestra, se preparó una mezcla de reacción con los siguientes reactivos: 6,4 µl de H₂O destilada estéril; 2 µl de tampón de reacción 10X; 0,8 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,6 µl de dimetil sulfóxido; 4 µl de deoxinucleótidos trifosfato 10 mM; 2 µl de cada oligonucleótido 20 µM; 2 µl de ADN; y 0,2 µl de Taq polimerasa 5 U/µl. Se utilizó un termociclador modelo ThermalCycler Verity y se programaron las siguientes condiciones: 2 minutos a 94°C, 35 ciclos (30 segundos a 94°C, 1 minuto a 62°C y un minuto a 72°C) y 2 minutos a 72°C. Por último, con las muestras obtenidas tras la PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para la detección de las bandas correspondientes al alelo WT y/o Hq.

2.1.2. Evaluación del fenotipo.

Con el fin de registrar, tanto el momento de aparición, como la intensidad de los diferentes rasgos fenotípicos causados por la enfermedad, todos los ratones Hq de ambos grupos de estudio fueron evaluados funcionalmente a lo largo del tiempo.

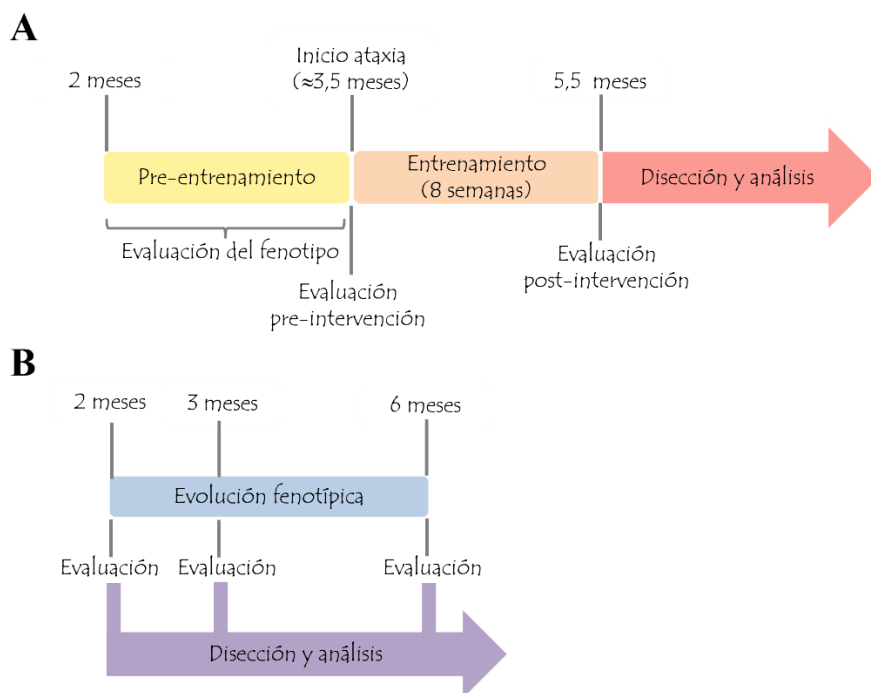


Figura 7. Esquemas representativos de los tiempos a los que se llevaron a cabo los estudios. (A) Estudio de los efectos de la intervención con un programa de entrenamiento. **(B)** y estudio de la evolución temporal de la enfermedad causada por la deficiencia de AIF.

En el caso del estudio de los efectos del entrenamiento, la evaluación del fenotipo de los ratones Hq se realizó antes de la intervención. Comenzó a las 8 semanas de edad y terminó cuando cada animal Hq mostró los primeros síntomas de ataxia, momento en el que los ratones pasaron a la fase de intervención (12-14 semanas de edad) (**Fig.7A**). De esta manera se garantizó que el inicio de la intervención con entrenamiento tuviese lugar en el momento en el que cada ratón presentó el mismo grado de desarrollo de la enfermedad. La evaluación se realizó según el método descrito por Fiuza-Luces *et al.* (173).

Brevemente, durante la fase de evaluación previa al entrenamiento, en las semanas pares se determinó la capacidad locomotora en tapiz rodante y la fuerza muscular de las patas delanteras; en las semanas impares, se determinó la coordinación mediante el test del *rotarod*. Cuando los animales Hq mostraron alteraciones claras en la capacidad locomotora, se les realizó un test de esfuerzo máximo en tapiz rodante (173), de modo que ratones con rendimiento similar en el test de esfuerzo se asignaron aleatoriamente al grupo sometido a la intervención con entrenamiento o al sedentario. Además, cada ratón Hq se emparejó con un ratón WT de su misma edad que entró simultáneamente en el protocolo de entrenamiento tras pasar igualmente el test de esfuerzo en tapiz rodante.

Por otro lado, en el estudio de la evolución temporal de la enfermedad, la evaluación —tanto en ratones Hq como en ratones WT— se realizó a los tres tiempos de edad correspondientes a cada grupo (2, 3 y 6 meses, **Fig.7B**), mediante el empleo de las siguientes pruebas: capacidad locomotora en tapiz rodante, fuerza muscular de las patas delanteras, test de rendimiento en *rotarod* y evaluación de la coordinación mediante prueba de agarre en barra horizontal.

Además, en ambos grupos de estudio se determinó diariamente el peso y el estado del pelaje de cada ratón.

A continuación, se describe detalladamente cada una de las pruebas empleadas (**Fig.8**):

- Capacidad locomotora en tapiz rodante: tras una adaptación inicial realizada a lo largo de tres días, en cada sesión de evaluación el ratón caminó durante 15 minutos por un tapiz rodante a una velocidad de 10 cm/s y con una pendiente del 15%, tal como describe Fiuza-Luces *et al.* (173). Dos observadores independientes valoraron la capacidad locomotora del ratón en función de las siguientes variables: equilibrio de la marcha, capacidad para caminar en línea recta y alteraciones de la marcha en las extremidades posteriores. Para cada una de las variables, se asignó valor 0 para la ausencia total de alteraciones; 1 para alteraciones leves; y 2 para alteraciones severas. En el estudio de los efectos del entrenamiento, cuando el sumatorio de la puntuación obtenida en las tres variables evaluadas para un ratón alcanzaba una puntuación ≥ 3 , el animal realizaba una prueba de esfuerzo máximo y era asignado aleatoriamente al grupo sedentario o entrenado.
- Fuerza de agarre de las patas delanteras (*hand-grip strength test*): se midió la fuerza máxima de agarre (en gramos) de las extremidades anteriores del ratón, utilizando un transductor de fuerza isométrica. En cada evaluación, se realizaron tres medidas separadas entre sí por un intervalo de 5 minutos, registrándose la mayor puntuación de las tres obtenidas por cada animal.
- Test de coordinación y equilibrio en *rotarod*: antes de iniciar la primera evaluación, se realizaron dos sesiones de adaptación de los ratones al dispositivo *rotarod*. La primera de ellas consistió en mantener al ratón encima del eje giratorio parado durante 60 segundos. En la segunda se situó al ratón encima del eje y se mantuvo el giro del dispositivo a una velocidad constante de 4 rpm durante 60 segundos. Posteriormente, en cada sesión de evaluación, la velocidad de la prueba se incrementó progresivamente desde 4 a 40 rpm en un periodo de 300 segundos. Se anotó el tiempo que el ratón

tardaba en caer de la rueda, así como la velocidad máxima alcanzada, según el método descrito por Fiuza-Luces *et al.* (173).

- **Test de coordinación y agarre en barra horizontal:** para evaluar la coordinación y fuerza combinadas, se siguió el método descrito por Deacon (181). Brevemente, se colgó al ratón por las patas delanteras en el centro de una barra horizontal de 2 mm de diámetro suspendida en el aire. En un periodo máximo de 30 segundos, se anotó el tiempo que el ratón tardó, bien en caerse de la barra, o bien en desplazarse hasta uno de los extremos de la barra. En función de estos parámetros, se asignó una puntuación a cada ratón, según se indica en la **tabla 4**. Cuando el animal efectuó la prueba sin ninguna dificultad, el test se repitió sucesivamente con una barra de mayor diámetro (4 y 6 mm).

Tabla 4. Criterios para la puntuación en el test de la barra horizontal.

Puntuación	Tiempo (s)	Caída
1	1 a 5	SÍ
2	6 a 10	SÍ
3	11 a 20	SÍ
4	21 a 30	SÍ
5	21 a 30	NO
6	11 a 20	NO
8	6 a 10	NO
10	1 a 5	NO

Las puntuaciones oscilan entre 1 y 10 y se calculan en función del tiempo que tardan los ratones, bien en caerse, o bien en llegar al extremo de la barra.

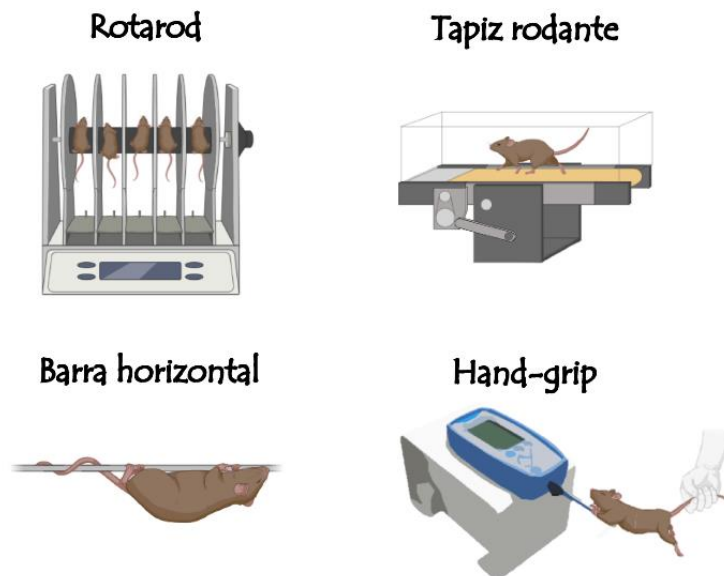


Figura 8. Test empleados para la evaluación de los ratones. Test de coordinación y equilibrio en *rotarod*; test de capacidad locomotora en tapiz rodante; test de coordinación y agarre en barra horizontal; y test de fuerza de agarre de las patas delanteras en *hand-grip*.

2.1.3. Programa de entrenamiento.

En el momento de la evaluación en el que cada ratón Hq obtuvo una puntuación ≥ 3 en el test de locomoción en tapiz rodante, se emparejó con un ratón WT de su misma edad, pasando a la fase de intervención para el estudio de los efectos del entrenamiento. Así, cada pareja fue asignada al grupo del entrenamiento o al grupo sedentario (en el que no se realizaba el programa de entrenamiento, pero los ratones podían moverse libremente por la jaula).

El programa de entrenamiento tuvo una duración de 8 semanas y combinó ejercicios de fuerza, resistencia y coordinación. Se realizó tal y como se describe en Fiuza-Luces *et al.* (173). Brevemente, se sometió a los ratones a una sesión diaria de ejercicio de resistencia en el tapiz rodante, de intensidad y duración moderadas en las primeras fases (20 minutos al 35% de la velocidad máxima alcanzada en el test de esfuerzo inicial), que se fueron incrementando hasta alcanzar los 40 minutos al 75% de dicha velocidad en las últimas sesiones de entrenamiento. Además, en las semanas pares realizaron dos sesiones de ejercicios de fuerza y en las semanas impares tres sesiones de entrenamiento de coordinación en *rotarod*. Los ejercicios de fuerza consistieron en: 1) mantener al ratón sobre una rejilla metálica, invirtiéndola a continuación para obligar al animal a trepar de nuevo a la parte superior de la rejilla; y 2) mantener al ratón enganchado por las patas delanteras en una percha durante el tiempo que resistiese hasta caer. En ambas pruebas se mantuvo a los animales a 40 cm de la superficie de trabajo, con un cojín acolchado para amortiguar las caídas. Las repeticiones de estos ejercicios fueron aumentando progresivamente desde 1 vez en las primeras sesiones hasta 6 veces al final del protocolo de intervención.

Tras la finalización de la intervención, con una edad media de 5 meses y medio, se volvió a evaluar el fenotipo de los ratones. 48h después de la realización del último test de evaluación post-entrenamiento, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para la obtención y análisis de sus tejidos.

2.1.4. Tratamiento con leupeptina.

Para estudiar el flujo autofágico, se trató a 5 ratones WT y 5 ratones Hq de 3 meses de edad con leupeptina. La leupeptina se administró, diluida en suero salino estéril, por vía intraperitoneal (40 mg/kg). Después de 30 minutos de tratamiento, los animales se sacrificaron y diseccionaron tal y como se indica en el siguiente apartado, obteniendo los tejidos correspondientes para su posterior análisis.

2.1.5. Disección y almacenamiento de los tejidos.

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical en el momento correspondiente a su grupo de estudio (5 meses y medio para los ratones del estudio de la intervención; y 2, 3 o 6 meses para el grupo del estudio de la evolución temporal). Inmediatamente después, se diseccionaron y se extrajo el corazón. Se retiraron las aurículas y se lavó el interior de los ventrículos con NaCl al 0,9% a 4°C para eliminar restos de sangre. Asimismo, se extrajeron los siguientes músculos esqueléticos: bíceps femoral, cuádriceps y tibial anterior. Rápidamente, todos los tejidos se congelaron a -80°C hasta su uso.

Además, se fijó un fragmento apical de cada corazón en formaldehído al 10% Q Path. Posteriormente, los fragmentos fijados se enviaron al servicio de Biobanco del Hospital 12 de Octubre, donde se llevó a cabo una inclusión en parafina, seguida de la realización de cortes de tejido de 5 µm de grosor. Por otro lado, un tibial anterior de cada ratón se congeló en isopentano pre-enfriado en nitrógeno líquido; se realizaron cortes en criostato de 5 µm de grosor de los tibiales en el Biobanco y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.1.6. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales.

Para obtener cultivos primarios de cardiomiocitos de ratones neonatales, se utilizó el kit *Pierce Primary Cardiomyocyte Isolation Kit*, según las instrucciones del fabricante. En resumen, se sacrificaron ratones WT y Hq de entre 1-4 días de edad mediante decapitación. Se obtuvo el corazón e inmediatamente se mantuvo en HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , a 4°C. Seguidamente, se troceó el corazón en fragmentos de 1-3 mm³, y éstos se lavaron dos veces con HBSS a 4°C para eliminar la sangre. Posteriormente, se añadieron 200 µl de la enzima 1 y 10 µl de la enzima 2 del kit. Se agitó suavemente la mezcla y se incubó durante 30-35 minutos a 37°C en un incubador con CO₂ al 5%. A continuación, para eliminar las enzimas, se lavó cuidadosamente el tejido troceado con HBSS dos veces a 4°C. Se añadieron 500 µl de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) para cultivos primarios, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%; y se disgregó el tejido mediante pipeteo (unos 30 pases). Una vez disgregado, se añadió 1 ml más de DMEM suplementado y se contó el número de células totales vivas con azul tripano en un contador automático. Por último, se sembraron las células en placas —a la densidad óptima según el experimento a realizar— y se incubaron durante 24 horas a 37°C en un incubador con CO₂ al 5%. Con el objeto de reducir la presencia de fibroblastos en el cultivo, al día siguiente, se reemplazó el medio por DMEM suplementado, al que se le añadió factor de crecimiento de cardiomiocitos 1/1000, renovándose el medio cada 3 días. A partir del 2º día tras la siembra, los cardiomiocitos comenzaron a emitir prolongaciones y a establecer contactos entre sí. Además, algunos de ellos comenzaron a latir, incrementándose el número de cardiomiocitos contráctiles a lo largo de los días siguientes. Se consiguió una pureza de cardiomiocitos en el cultivo de aproximadamente el 80%.

2.1.7. Obtención de tejidos para microscopía electrónica.

Para la obtención de corazones y cuádriceps destinados a microscopía electrónica, se perfundieron 3 ratones WT y 3 ratones Hq de 6 meses de edad, previamente anestesiados con pentobarbital sódico mediante inyección intraperitoneal. La perfusión se realizó mediante la administración por la vía aórtica de un primer lavado con suero salino seguido de una solución de fijación compuesta por paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en tampón fosfato de Sørensen pH 7,2, y a una presión constante de 75 mmHg. Tras la perfusión, se extrajeron los correspondientes tejidos y se incubaron en la solución de fijación durante 24 horas. Los pasos siguientes relativos a la inclusión, corte, tinción y visualización de los tejidos se detallan más adelante en el apartado 2.10.

2.2. Análisis de proteínas.

2.2.1. Obtención de homogeneizados proteicos totales.

Para la extracción de proteínas, se homogeneizaron fragmentos de tejido en tampón de lisis para músculo (Tris-HCl 10 mM a pH 7,6; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton™ X-100 al 1%) con inhibidores de proteasas y fosfatasas, en una relación 1:10 (peso:volumen). Se lisó el tejido con un homogenizador de vidrio de tipo Potter a 4°C. A continuación, se centrifugó a 11000 x g durante 15 minutos y a 4°C, y se recogió el sobrenadante con las proteínas solubilizadas.

2.2.2. Cuantificación de proteínas.

Se cuantificó la concentración de proteínas en homogeneizados y fracciones mitocondriales utilizando el kit Micro BCA Protein Assay y siguiendo las instrucciones del fabricante para la lectura en placa. La absorbancia se midió en el lector de placas Epoch Microplate Spectrophotometer.

2.2.3. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (*western blot*).

Para la inmunodetección de proteínas se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) y posteriormente una electrorransferencia con un sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell o bien con un sistema Criterion™ Cell.

En primer lugar, se desnaturalizaron las proteínas con tampón Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos a 95°C. Una vez hervidas, las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en presencia de deodecilsulfato sódico (SDS). En el caso del sistema Mini-PROTEAN, el porcentaje de poliacrilamida del gel fue de un 4% para la parte concentradora, mientras que el porcentaje de la parte separadora varió en función del tamaño de las proteínas a detectar (7,5%; 10%; 12,5% o 15%). En el caso del sistema Criterion, se utilizaron geles comerciales del 10%, 12,5% o en gradiente (8%-16%; 4%-20%). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 120V para el sistema Mini-PROTEAN y de 200V para el sistema Criterion, en un tampón Tris-glicina/SDS. A continuación, se transfirieron las proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)—previamente activadas en metanol— mediante transferencia húmeda (en un tampón con Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%) durante 1 hora, a 4°C y un voltaje constante de 100V para el sistema mini-PROTEAN y de 80V para el sistema Criterion. Las membranas con las proteínas fueron posteriormente bloqueadas en una solución de leche desnatada al 5% en tampón Tris-HCl con Tween-20 al 0,1% (TBST), o en una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en TBST —en función de los requerimientos de cada anticuerpo— durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavaron las membranas 3 veces con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), diluido en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas 2 veces con TBST y 2 veces con TBS. Finalmente, se reveló la señal del anticuerpo secundario con el sustrato quimioluminiscente ECL CheLuminate-HRP PicoDetect o ECL

SuperSignal™ West Femto, con un analizador Chemidoc MP Imaging System. Para el control de carga, tras el revelado de todos los anticuerpos, se tiñeron las membranas con Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0,1% en una solución de metanol y agua (1:1), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se destiñeron con una solución de etanol, ácido acético glacial y agua (4:1:5) durante 1 minuto a temperatura ambiente, y se dejaron secar al aire para tomar una imagen en el analizador Chemidoc.

Análisis de las imágenes: la densidad óptica, tanto de las bandas de los anticuerpos como de las bandas teñidas con azul de Coomassie, fue cuantificada mediante el *software* de análisis de imagen ImageJ. La densidad óptica de la banda de cada proteína detectada mediante un anticuerpo fue normalizada por la suma de la densidad óptica de las bandas detectadas mediante la tinción con Azul de Coomassie de su carril, según un método descrito anteriormente (182).

Los anticuerpos primarios y secundarios conjugados con HPR empleados para la detección de proteínas se muestran en las **tablas 2 y 3**, respectivamente.

2.2.4. Electroforesis nativa azul (*blue native electrophoresis*, BN-PAGE).

Esta técnica permite separar los diferentes complejos proteicos de una mezcla de proteínas. Con el fin de separar los complejos de la CTE en función de su peso molecular, se llevó a cabo una electroforesis en condiciones nativas en una primera dimensión (1D-BN-PAGE). Posteriormente, las subunidades que conforman los complejos se separaron en función de su peso molecular, mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en una segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE). Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo los protocolos previamente descritos por Nijtmans *et al.* 2008 (183).

Obtención de las fracciones mitocondriales: para la obtención de fracciones mitocondriales de corazón y de cuádriceps, y debido a la cantidad limitada de tejido disponible, se partió de una mezcla de porciones de tejido del mismo peso de 8 ratones WT de 6 meses por un lado, y de 8 ratones Hq de 6 meses por otro. Las muestras se homogeneizaron en tampón sacarosa (sacarosa 440 mM, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico [MOPS] 20 mM y EDTA 11 mM) con inhibidores de proteasas, en una relación 1:12,5 (peso:volumen) a 4°C. Se centrifugaron a 800 x g durante 5 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante. Éste se centrifugó a 20000 x g durante 20 minutos a 4°C, descartándose el sobrenadante. El *pellet* resultante con las mitocondrias se guardó a -80°C hasta su uso.

Preparación de la muestra para *blue native*: se solubilizaron las fracciones mitocondriales en una solución de ácido 2-aminocaproico 1,5 M y Bis-Tris 150 mM a pH 7, en una relación de volumen 1:1. A continuación, se cuantificó la concentración de proteínas mediante un ensayo BCA según lo indicado en el apartado 2.2.2. Para solubilizar los complejos, se añadió digitonina 2mg/ml y se incubaron las muestras en hielo durante 15 minutos. Se centrifugaron a 20000 x g durante 30 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se diluyó con tampón de carga (ácido 2-aminocaproico 750mM, Bis-Tris 50 mM, EDTA 0,5 mM, Serva Blue G-250 0.02%, a pH 7,0) en una relación de volumen 1:10 (tampón:muestra).

1D-BN-PAGE: para la electroforesis de la primera dimensión, se emplearon geles comerciales Bis-Tris en gradiente del 3 al 12% de poliacrilamida. Se cargaron 40 µg de muestra por pocillo y se llevó a cabo la electroforesis con un tampón Bis-Tris 50 mM a pH 7,0 para el ánodo y un tampón Bis-Tris 15 mM, tricina 50 mM y Serva Blue G-250 al 0.02% a pH 7,0, para el cátodo. Una vez que el frente alcanzó la mitad del gel, el tampón del cátodo fue sustituido por un tampón Bis-Tris 15 mM y tricina 50 mM a pH 7,0, hasta terminar la electroforesis. Uno de los geles se reservó para llevar a cabo la segunda dimensión. El resto se transfirieron a membranas de PVDF mediante transferencia húmeda, a un voltaje constante de 30 V durante toda la noche. Finalmente, se detectaron las proteínas de los complejos mediante inmunodetección con anticuerpos, según el protocolo previamente descrito en el apartado 2.2.3.

2D-BN/SDS-PAGE: se cortó cada carril del gel de la primera dimensión que se había reservado y se incubó con una solución de disociación con SDS 1% y β-mercaptoetanol 1% en agua destilada, durante 1 hora a temperatura ambiente. Cada uno de los carriles se rotó 90° y se colocó sobre un gel desnaturalizante del 4% de poliacrilamida para la parte concentradora y del 10% para la separadora. A continuación, se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje de 30V para la parte concentradora y de 80V para la parte separadora del gel. Se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF y se llevó a cabo la inmunodetección con anticuerpos según el protocolo descrito en el apartado 2.2.3.

Análisis de las imágenes: la densidad óptica de las bandas fue cuantificada con el *software* de análisis de imagen ImageJ. En el caso de la 1D-BN-PAGE, la densidad óptica de la banda de cada proteína de los complejos CI, CIII, CIV y CV fue normalizada por la banda correspondiente a la proteína SDHA (del CII).

Los anticuerpos primarios y secundarios conjugados con HRP empleados para la detección de proteínas se muestran en las **tablas 2 y 3**, respectivamente.

2.2.5. Perfil proteómico mediante espectrometría de masas.

El estudio del perfil proteómico se llevó a cabo en homogeneizados totales tanto de corazón como de bíceps femoral de ratones WT y Hq, sedentarios y entrenados, del estudio de la intervención.

Preparación de la muestra: debido a la limitación de las muestras, se partió de una mezcla de homogeneizado proteico con 100 µg de proteína total, compuesta por la misma cantidad de proteínas de cada ratón de su grupo experimental, obtenidas mediante el método descrito en la sección 2.2.1. Las muestras resultantes se analizaron en el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO, Madrid), mediante espectrometría de masas. Brevemente, las proteínas se concentraron en la interfase de un gel concentrador y separador en una electroforesis SDS-PAGE y se visualizaron las bandas con Azul de Coomassie para posteriormente cortar la banda del gel con las proteínas concentradas. Los fragmentos de gel obtenidos se destiñeron en una solución de acetonitrilo y agua en una ratio 1:1. A continuación, se redujeron las proteínas con 1,4-ditiotreitol 10 mM, y se alquilaron con iodoacetamida 10 mM. Más tarde, se digirieron las proteínas con tripsina, y los sobrenadantes con los péptidos tripticos se desalaron sobre puntas de pipeta OMIX C18.

Marcaje de los péptidos con iTRAQ: la mezcla de péptidos resultante de la digestión con tripsina fue marcada con un reactivo iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) para cada muestra en el caso del corazón, y dos reactivos iTRAQ para cada muestra en el caso del bíceps femoral, según el método descrito previamente (184). Brevemente, se disolvieron los péptidos en bicarbonato de trietilamonio 0,5 M a pH 8,0. A continuación, se incubó cada muestra con un reactivo iTRAQ disuelto en isopropanol y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se detuvo el marcaje mediante la adición de ácido fórmico al 0,1%. A continuación, las muestras se secaron y se mezclaron para proceder a su identificación y cuantificación, obteniendo así una mezcla 4plex en corazón y una mezcla 8plex en bíceps femoral.

Cuantificación e identificación de los péptidos: los péptidos se identificaron gracias a la técnica de cromatografía en fase líquida-espectrometría de masas (RP-LC-MS/MS) (185), utilizando un sistema nano HPLC Easy-nLC II acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-Velos-Pro. Los péptidos obtenidos se buscaron en la base de datos de UniProt-Mus musculus, utilizando el algoritmo Sequest como motor de búsqueda y el *software* Proteome Discoverer 1.4. La intensidad de la señal para cada péptido se normalizó por el valor correspondiente al grupo control (siendo éste 1), lo que permitió la cuantificación relativa de los distintos grupos experimentales.

2.2.6. Identificación de las modificaciones oxidativas en proteínas.

Para identificar fenómenos de oxidación de cisteínas, se obtuvieron homogeneizados totales de corazón y cuádriceps de animales del estudio de la evolución temporal, con el método anteriormente descrito en la sección 2.2.1., utilizando en este caso el mismo tampón de homogeneización, pero conteniendo además n-etil-maleimida 100 mM y neocuproína 100 μ M. Se obtuvo una mezcla de homogeneizados de 8 ratones WT, y otra de 8 ratones Hq. A continuación, los homogeneizados se trataron con SDS al 2% y se incubaron 15 minutos a 37°C.

Posteriormente, se analizaron 100 μ g de cada muestra por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del CBMSO. Brevemente, los péptidos obtenidos tras la digestión con tripsina se marcaron con TMT Sixplex Isobaric Mass Tagging Kit, disuelto en acetonitrilo, durante 1 hora a temperatura ambiente. El marcaje se paró con hidroxilamina al 5%; se secaron las muestras y se mezclaron obteniendo una mezcla 6plex (ya que este procedimiento se realizó junto a otras 4 muestras de otros tejidos, que no son objeto del presente trabajo). Finalmente, se identificaron los péptidos resultantes mediante RP-LC-MS/MS, tal y como se indica en la sección 2.2.5., y se analizaron con el *software* PEAKS Studio X+.

2.2.7. Detección de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para medir los niveles de diferentes aminoácidos y otros metabolitos presentes en músculo esquelético y corazón de ratones del estudio de la intervención, se utilizó la cromatografía líquida de alta eficacia, siguiendo una metodología aprobada por la Entidad Nacional de Acreditación ENAC (ISO15189),

empleada en el Servicio de Bioquímica del Hospital 12 de Octubre. Se partió de 1,7 mg de proteína total en el caso de corazón, y 2 mg en el caso de cuádriceps, por cada ratón (5 ratones WT y 5 ratones Hq). A continuación, se desproteinizaron las muestras con ácido sulfosalicílico al 50% y se analizaron mediante cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna con ninhidrina, en el equipo Biochrom 30+, obteniéndose la concentración de cada metabolito presente en cada muestra ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

2.3. Medidas de Actividad enzimática.

2.3.1. Actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones.

Las medidas de actividad enzimática de los complejos de la CTE, la ATP sintasa y la proteína de matriz mitocondrial citrato sintasa (CS), se determinaron en homogeneizados proteicos totales de corazón y cuádriceps, así como en fracciones mitocondriales de corazón (CI y CIV), según el protocolo previamente descrito por Medja *et al.* 2009 (186). Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en el equipo Shimadzu UV-1800 a una temperatura de 37°C. La actividad específica ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) se calculó a partir de la cantidad de proteína utilizada y el coeficiente de extinción molar (ϵ) de cada compuesto.

Obtención de los homogeneizados proteicos totales: en el caso del corazón, debido a la limitación de tejido, se valoraron 4 muestras de ratones WT y 4 muestras de ratones Hq, cada una de ellas procedente de una mezcla de tejido del mismo peso de 2 animales diferentes del mismo grupo experimental. En cuádriceps, se valoraron 5 muestras de ratones WT y 5 Hq. Cada una de las muestras se homogeneizó en tampón manitol (manitol 225 mM; sacarosa 75 mM; Tris-HCL 10 mM, pH 7,4; y EDTA 0,1 M) a 4°C, en una relación 1:20 (peso:volumen). A continuación, los homogeneizados se centrifugaron a 650 x g durante 20 minutos a 4°C, y se reservó el sobrenadante con las proteínas solubilizadas, almacenándose a -80°C hasta su posterior uso.

Obtención de las fracciones mitocondriales: en el caso del corazón, debido a la limitación de tejido, se agruparon 8 ratones WT en una sola muestra y 8 ratones Hq en otra. Para la purificación de las mitocondrias se utilizó el kit Mitochondria Isolation Kit for Tissue, según las instrucciones del fabricante.

Actividad de la NADH deshidrogenasa:ubiquinona oxidorreductasa (CI): la actividad del CI se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 340 nm que se produce cuando se oxida el NADH ($\epsilon = 6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) a NAD^+ , acoplado a la reducción de la decilubiquinona a decilubiquinol. El medio de reacción estaba compuesto por BSA 3,75 mg/ml y decilubiquinona 100 μM en tampón fosfato 50 mM a pH 7,5. El ensayo se realizó (en corazón, con 30 μg de homogeneizado proteico total o 20 μg de mitocondrias aisladas; en cuádriceps, con 10 μg de homogeneizado proteico total) en presencia y en ausencia de rotenona 12,5 μM para inhibir la actividad del CI. La reacción se inició con la adición de NADH 100 μM y se midió la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. La actividad del CI se calculó como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de rotenona.

Actividad de la succinato deshidrogenasa (CII): la actividad del CII se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 600 nm del aceptor de electrones 2,6-diclorofenolindofenol ($\epsilon = 19,1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) oxidado. El medio de reacción estaba compuesto por succinato 20 mM, DCPIP [2,6-diclorofenolindofenol] 50 μM , KCN 1 mM y BSA 2 mg/ml en tampón fosfato 25 mM a pH 7,5. En cada caso, se añadieron 40 μg o 5 μg de homogeneizado proteico total de corazón o cuádriceps, respectivamente, y se midió la absorbancia de la línea base. A continuación, se añadió decilubiquinona 100 μM como iniciador de la reacción. Se midió la absorbancia a 600 nm durante 3 minutos y se calculó la actividad del CII como la diferencia de actividad en presencia y ausencia (línea base) de decilubiquinona.

Actividad de la ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa (CIII): la actividad del CIII se determinó midiendo el aumento en la absorbancia a 550 nm del citocromo c reducido ($\epsilon = 18,5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), acoplado a la oxidación decilubiquinol a decilubiquinona. El medio de reacción estaba compuesto por KCN 5 mM, EDTA 100 μM , citocromo c 75 μM y Tween 20 0,025% en tampón fosfato 25 mM a pH 7,5. El ensayo se realizó con 20 μg de homogeneizado proteico total en corazón, o 4 μg de homogeneizado total en cuádriceps, en presencia y ausencia de antimicina A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para inhibir la actividad del CIII. Se incubó la mezcla durante 3 minutos a 37°C y se añadió decilubiquinol 100 μM como iniciador de la reacción. Se registró la absorbancia a 550 nm durante 3 minutos y se calculó la actividad del CIII como la diferencia de actividad en presencia y ausencia de antimicina A.

Actividad de la citocromo c oxidasa (CIV): la actividad del CIV se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 550 nm que resulta de la oxidación del citocromo c ($\epsilon = 18,5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) reducido. El medio de reacción estaba compuesto por citocromo c 100 μM (reducido entre el 90% y el 95%) en tampón fosfato 50 mM a pH 7,5. En el caso del corazón, se añadieron 40 μg de homogeneizado proteico total o 16 μg de mitocondrias aisladas por ensayo; y en el caso del cuádriceps, se añadieron 6,5 μg de homogeneizado proteico total, y se midió la absorbancia a 550 nm durante 3 minutos.

Actividad de la citrato sintasa: la actividad de la CS se determinó midiendo el incremento en la absorbancia a 412 nm producida por la reducción del ácido-5-5'ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, $\epsilon = 13,6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) acoplada a la oxidación de la coenzima A libre. El medio de reacción estaba compuesto por acetil coA 300 μM , DTNB 100 μM y Triton™ X-100 0,1% en tampón Tris-HCl 100 mM a pH 8,1. El ensayo se realizó con 40 μg de homogeneizado proteico total, o 16 μg de mitocondrias aisladas en el caso del corazón; y 5 μg de homogeneizado proteico total en el caso del cuádriceps. Se incubó la mezcla a 37°C durante 5 minutos, seguido de la lectura de la línea base durante 4 minutos. A continuación, se añadió oxalacetato 500 μM como iniciador de la reacción y se midió la absorbancia a 412 nm durante 3 minutos. Se calculó la actividad de la CS como la diferencia de actividad en presencia y ausencia (línea base) de oxalacetato.

2.3.2. Actividad catalase.

Se midió la actividad de la enzima catalasa en homogeneizados proteicos de corazón y cuádriceps, en 8 ratones WT y 8 ratones Hq de 6 meses del estudio de la evolución temporal. Para ello, se llevó a cabo el ensayo *Catalase Colorimetric Activity Kit* y se siguieron las instrucciones del fabricante para el homogeneizado de las muestras y para el ensayo colorimétrico. Los resultados se expresaron en unidades de actividad /ml.

2.3.3. Actividad Ca^{2+} -ATPasa cardiaca.

Se midió la actividad enzimática de la proteína Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico cardiaco en homogeneizados proteicos de 9 ratones WT y 6 ratones Hq de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal, según el protocolo descrito por Saborido *A et al.* (187).

Preparación de la muestra: una porción de corazón de cada animal se homogeneizó en medio A (MOPS 20 mM pH 7,0; sacarosa 0,25 M; inhibidores de proteasas y fosfatasas) en una relación 1:6,5 (peso:volumen). A continuación, se diluyó cada homogeneizado con 5 volúmenes más de medio A y se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se cuantificó la proteína con el ensayo BCA previamente descrito.

Ensayo espectrofotométrico: se valoraron alícuotas de homogeneizado con 20 µg de proteína en 1 ml de mezcla de ensayo (MOPS 25 mM pH 7,0; EGTA [3,12-Bis(carboxymethyl)-6,9-dioxo-3,12-diazatetradecano-1,14-dioic acid] 1 mM; MgCl_2 15 mM; KCl 200 mM; azida sódica 10 mM; fosfoenolpiruvato 10 mM a pH 7,0; piruvato kinasa 2,4 U; lactato deshidrogenasa 10 U; NADH 0,27 mM; CaCl_2 1 mM; y Triton™-X100 al 0,005%). El ensayo se realizó por duplicado, y paralelamente en ausencia y presencia de tapsigargina 0,4 µM para inhibir específicamente a la Ca^{2+} -ATPasa. Se incubaron todas las cubetas durante 5 minutos a 37°C; a continuación, se añadieron 40 µl de ATP 100 mM para iniciar la reacción, y se midió la absorbancia a 340 nm durante 8 minutos a 37°C. La actividad de la Ca^{2+} -ATPasa se calculó como la diferencia de la actividad en presencia y ausencia de tapsigargina, despreciando los 3 primeros minutos de reacción, en los que cae la interferencia de la actividad Mg-ATPasa; y se expresó en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína.

2.4. Respirimetría de alta resolución.

Para evaluar la respiración mitocondrial, se empleó un respirómetro de alta resolución XFp Extracellular Flux Analyzer, con el que se midió la tasa de consumo de oxígeno (OCR, *Oxygen Consumption Rate*), así como la tasa de acidificación del medio de cultivo (ECAR, *Extra Cellular Acidification Rate*), en cardiomiocitos de ratones neonatales, tanto WT como Hq.

Protocolo del ensayo: Se realizó un MitoStress Test, para lo cual se sembraron 90000 cardiomiocitos/pocillo en placas XFp y se mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, aproximadamente 5 días (hasta que se adhirieron a la

placa, establecieron prolongaciones y contactos entre ellos, y comenzaron a latir). El día del ensayo, se reemplazó el medio de cultivo por el medio de ensayo Seahorse XF Base Medium —previamente suplementado con glucosa 10 mM, piruvato sódico 1 mM y L-glutamina 2 mM, a pH 7,4— y se incubaron las células durante 1 hora a 37°C en un incubador sin CO₂. A continuación, las células se introdujeron en el respirómetro (OCR y ECAR basal) y se fueron añadiendo, de forma consecutiva, los siguientes compuestos: oligomicina 2,6 μM; carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 1 μM; FCCP 2 μM; y rotenona 1 μM con antimicina A 1 μM (concentración final en todos los casos). Tras la adición de cada compuesto se midieron la OCR y la ECAR correspondientes. Tras finalizar el ensayo, se lavaron los pocillos, se lisaron las células de cada pocillo y se midió la concentración de proteínas mediante el ensayo BCA, con el fin de normalizar cada medida por la cantidad de proteína presente en cada pocillo.

Parámetros calculados: los datos de OCR obtenidos (nmol de O₂·min⁻¹·mg⁻¹ de proteína) se expresaron como:

- Tasa de respiración máxima (OCR max): diferencia entre la OCR tras la adición de FCCP y la OCR tras la adición de rotenona más antimicina A.
- Tasa de respiración sensible a oligomicina: diferencia entre la OCR basal y la OCR tras la adición de oligomicina.
- Tasa de escape de protones: diferencia entre la OCR tras la adición de oligomicina y la OCR tras la adición de rotenona más antimicina A.
- Respiración no mitocondrial: OCR tras la adición de rotenona con antimicina A.

Los datos de ECAR obtenidos se expresaron como la variación de pH por minuto y miligramo de proteína. Se evaluó la variación de pH en condiciones basales (ECAR basal) y en presencia de oligomicina (ECAR oligomicina) y FCCP (ECAR FCCP).

2.5. Ensayo de expresión de genes mediante QuantiGene Plex.

Con el fin de medir los niveles de expresión de distintos genes, tanto en corazón como en músculo esquelético, se llevó a cabo el ensayo QuantiGene Plex Gene Expression Assay. Para ello, se extrajo el ARN a partir de porciones de corazón y de cuádriceps, tanto de ratones WT como Hq de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal, utilizando un tampón de homogeneización comercial (*QG Sample Processing Kit*). A continuación, se diluyeron las muestras en tampón de homogeneización en una relación 1:2 (peso:volumen) y se hibridaron, por duplicado, en una placa que contiene las sondas correspondientes para cada ARNm, durante 16 horas a 54°C y con una agitación de 400 rpm. A continuación, se amplificó la señal de cada ARNm mediante su hibridación sucesiva con un pre-amplificador, un amplificador y una sonda con una etiqueta. Se añadió posteriormente un sustrato quimioluminiscente y se cuantificó su señal en un equipo Luminex MAGPIX Instrument. Así, la luminiscencia obtenida es proporcional a la cantidad de moléculas del ARNm de interés presentes en cada muestra. Con el fin de determinar cuáles eran los genes cuya expresión resultaba constante independientemente del grupo experimental, para utilizarlos como genes endógenos de referencia, se

llevó a cabo un primer ensayo QuantiGene Plex con 27 genes diferentes. Tras el ensayo, se seleccionaron los siguientes genes: *Polr2a* (subunidad RPB1 de la ARN polimerasa II), *Tbp* (proteína de unión a TATA) y *Ldha* (lactato deshidrogenasa A). Los niveles de expresión de cada uno de los genes de interés medidos se normalizaron por la media geométrica de la expresión de estos 3 genes de referencia.

2.6. Estudio del manejo del Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos ventriculares adultos.

Aislamiento de los cardiomiocitos ventriculares: se aislaron cardiomiocitos ventriculares nativos de 4 ratones WT y 4 ratones Hq de 6 meses de edad. Previo al sacrificio, los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico con heparina (100 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal. Rápidamente, se extrajo el corazón y se colocó en un sistema de perfusión tipo Langendorff, donde se perfundió de forma retrógrada a través de la inserción de la aorta ascendente en el sistema Langendorff, tal como se indica en detalle en Navarro-García *et al.* (188). A continuación, se siguió con la perfusión del corazón y su digestión, tal y como describe Ruiz-Hurtado *et al.* (189). Brevemente, el corazón se perfundió durante 3 minutos con solución Tyrode (NaCl 130 mM, KCl 5,4 mM, NaH_2PO_4 0,4 mM, MgCl_2 0,5 mM, HEPES 25 mM y glucosa 22 mM; a pH 7,4 ajustado con LiOH) libre de Ca^{2+} y suplementada con EGTA 0,2 mM. Le siguió una perfusión con solución Tyrode suplementada con CaCl_2 0,1 mM, colagenasa tipo II (1 mg/ml) y BSA (1mg/ml) durante 3-4 minutos a temperatura ambiente, para la disgregación enzimática de los cardiomiocitos ventriculares. Por último, una vez digerido enzimáticamente y troceado mecánicamente, y tras eliminar las aurículas, el corazón se filtró a través de una membrana de nylon con un poro de 250 μm , y se centrifugó a 280 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. El precipitado celular obtenido, correspondiente a los cardiomiocitos, se resuspendió en solución Tyrode suplementada con CaCl_2 1 mM para proceder con el marcaje fluorescente del Ca^{2+} de los cardiomiocitos.

Registro y análisis del manejo de Ca^{2+} intracelular en los cardiomiocitos aislados mediante microscopía confocal: una vez obtenidos los cardiomiocitos, se incubaron con el fluoróforo Fluo-3AM 5 μM durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se estimularon eléctricamente los cardiomiocitos a 2 Hz de frecuencia en una cámara que posee dos electrodos paralelos de platino con solución Tyrode. Se registraron —en el microscopio confocal Meta Zeiss LSM 510 y con un objetivo acromático 40x— las variaciones en la intensidad de fluorescencia del fluoróforo, que se corresponden con variaciones en la concentración del Ca^{2+} citosólico. De esta manera, se midieron los siguientes parámetros: la liberación transitoria de Ca^{2+} durante la sístole o estimulación eléctrica; la liberación espontánea de Ca^{2+} en forma de chispas o *sparks* de Ca^{2+} , que se producen durante la diástole o relajación, a través de los receptores de rianodina (RYRs) del RS; y la cantidad total de Ca^{2+} almacenada en el RS, tras la adición de cafeína 10 mM. La liberación transitoria de Ca^{2+} durante la contracción, así como los *sparks* de Ca^{2+} , se registraron a una velocidad de 1,5 ms/línea (1000 líneas por imagen). Por otro lado, para obtener la carga total de Ca^{2+} del RS tras la adición de cafeína, se registró la intensidad de fluorescencia a una velocidad de 3 ms/línea (10000 líneas por imagen) durante un periodo de 30 segundos. A continuación, se especifican los detalles de cada uno de los parámetros medidos:

- Análisis de la liberación transitoria de Ca^{2+} citosólico durante la sístole: se estimularon los cardiomiocitos eléctricamente a una frecuencia de 2 Hz, con un estimulador eléctrico adaptado a la cámara de registro que contiene los electrodos de platino tipo CS-420. Se registró la variación de fluorescencia que tiene lugar en una línea previamente seleccionada con el *software* Zen 2009 Imaging (ZEISS) a lo largo del eje longitudinal de cada célula. La amplitud del transitorio de Ca^{2+} fue calculada a partir del promedio de la fluorescencia registrada durante cuatro contracciones consecutivas. La amplitud del transitorio de Ca^{2+} se obtuvo como el cociente F/F_0 , donde F es el máximo valor de fluorescencia durante la estimulación eléctrica, y F_0 es la fluorescencia basal en reposo. Además, se calculó la velocidad de recaptación de Ca^{2+} citosólico hacia el RS —como medida indirecta de la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa cardiaca— mediante el parámetro *Tau*, que se calculó mediante el ajuste de la caída de la señal de la fluorescencia ajustado a una exponencial simple.
- Análisis de la carga total de Ca^{2+} del RS tras la adición de cafeína: se infirió la capacidad máxima de almacenar Ca^{2+} que posee el RS, registrando la salida total de Ca^{2+} del mismo, provocada por la adición de cafeína 10 mM. La amplitud del flujo de Ca^{2+} se calculó como F/F_0 .
- Análisis de la liberación espontánea de Ca^{2+} en forma de *sparks* durante la diástole: los *sparks* de Ca^{2+} son considerados incrementos en la fluorescencia de Ca^{2+} que ocurren de forma rápida, breve y localizada cuando las células están en estado quiescente o durante el periodo de relajación. Se registraron en cardiomiocitos que no estaban siendo estimulados eléctricamente. Con el fin de evitar falsos eventos, se consideraron *sparks* de Ca^{2+} aquellos cuyo incremento en la fluorescencia resultaba al menos cuatro veces mayor que la desviación estándar de la fluorescencia basal de la imagen (190).

Análisis: todas las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando el *software* IDL®. En cada caso, se corrigió la intensidad de la fluorescencia por el valor de fondo de la imagen fuera de la célula.

2.7. Determinación de los niveles de H_2O_2 en cardiomiocitos.

Se determinaron los niveles de H_2O_2 en cardiomiocitos WT y Hq de ratones neonatales en cultivo. Para ello, se sembraron las células en placas Lab-Tek de 4 pocillos y se mantuvieron en cultivo hasta que los cardiomiocitos se adhirieron, establecieron prolongaciones y comenzaron a latir. En ese momento, se marcaron con la sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DA-DCF) 25 μM , diluida en medio de cultivo DMEM, durante 30 minutos en un incubador de CO_2 a 37°C. A continuación, se lavaron los pocillos con PBS suplementado con MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM y glucosa 5 mM, y se registró la señal de fluorescencia de cada cardiomiocito en un microscopio confocal Zeiss LSM 510-META, con un objetivo acromático 40x y a una resolución de 1024x1024 píxeles. Por otro lado, para medir la cinética de descomposición del H_2O_2 celular, se añadió H_2O_2 250 μM y se registró la variación en la fluorescencia celular durante un tiempo de 10 minutos. La intensidad media de fluorescencia por célula se midió con el *software* ImageJ.

2.8. Inmunofluorescencia.

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados para la detección de proteínas se muestran en las **tablas 2 y 3**, respectivamente.

2.8.1. Inmunofluorescencia en tejido.

En el caso del corazón, se comenzó por desparafinar y rehidratar los cortes, para lo que se incubaron primero en un horno a 60°C durante 20 minutos. Seguidamente, se incubaron en xileno dos veces de 5 minutos; y en sucesivas soluciones de etanol en concentración decreciente (100%-96%-70%-50%) durante 3 minutos cada una. Finalmente, se lavaron con PBS (tampón fosfato salino) durante 5 minutos. En el caso del tibial anterior, los cortes congelados se incubaron con acetona durante 10 minutos a -20°C; y se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos.

A continuación, se desenmascaró el antígeno hirviendo los cortes durante 20 minutos en un tampón citrato a pH 6,0 o en un tampón Tris-EDTA a pH 9,0 —según el requerimiento de cada anticuerpo—. Seguidamente, se permeabilizaron los cortes y se bloquearon con BSA al 2% y Triton™ X-100 al 0,1% en TBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo durante una noche en una cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, los cortes se lavaron 3 veces con TBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente diluido en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Se lavaron 3 veces con TBS y se tiñeron los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 0,5 µg/ml diluido en TBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron los cortes 2 veces con TBS y se cubrieron con un cubre-objetos en medio de montaje Dako Fluorescent Mounting Medium. Las imágenes de las tinciones se tomaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 510-META, con el objetivo acromático 40x o plan acromático 63x, y a una resolución de 1024x1024 píxeles. El análisis de las imágenes se realizó con el *software* ImageJ.

2.8.2. Inmunofluorescencia en células.

Se realizó en cardiomiocitos de ratones neonatales cultivados sobre cubre-objetos, mantenidos en placas de cultivo de 24 pocillos. Tras la siembra, se dejó que los cardiomiocitos se adhiriesen, estableciesen prolongaciones y comenzaran a latir. En el caso de los experimentos para medir el flujo autofágico en cardiomiocitos, éstos se trataron con sulfato de hidroxicloroquina 30 µg/ml durante 24 horas. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos en un incubador de CO₂ a 37°C. Se lavaron con PBS para eliminar el exceso de fijador y se desenmascararon los antígenos con una solución de urea al 5% en tampón Tris-HCl 0,1 mM a pH 9,5, durante 20 minutos a 95°C. Posteriormente, las células se permeabilizaron con una solución de Triton™ X-100 al 0,1% en PBS y se bloquearon con una solución de suero de cabra al 10% y Triton X-100 al 0,01% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente diluido en solución de bloqueo, durante 1

hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las células se tiñeron con DAPI 0,5 µg/ml diluido en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS y se montaron sobre porta-objetos con medio de montaje Dako Fluorescent Mounting Medium. Las imágenes se tomaron en el microscopio confocal Zeiss LSM 510-META, con el objetivo acromático 40x o plan acromático 63x, y a una resolución de 1024x1024 píxeles. La intensidad de fluorescencia y el análisis de las imágenes se realizaron con el *software* ImageJ.

2.9. Tinción de núcleos apoptóticos mediante el ensayo TUNEL.

Se marcaron y detectaron núcleos apoptóticos en corazón y tibial anterior, tanto en ratones sedentarios como entrenados de 6 meses de edad, mediante marcaje TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling*). Para ello, se utilizó el kit In Situ Cell Death Detection Kit, y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, en el caso del corazón, se desparafinaron y rehidrataron los cortes, tal y como se describe en la sección 2.8.1., y se incubaron con una solución con proteinasa K (20 µg/ml en Tris/HCL 10 mM, a pH 7,4), durante 15 minutos a temperatura ambiente. En el caso del tibial anterior, los cortes criopresevados se incubaron en la solución de fijación (paraformaldehído al 4% en PBS, a pH 7,4), durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS durante 30 minutos, y se incubaron en solución de permeabilización (Triton™ X-100 al 0,1% en citrato sódico al 0,1%), durante 2 minutos a 4°C. Uno de los cortes se utilizó como control positivo, para lo que se trató con DNasa I (3000U/ml), durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, todos los cortes, tanto de corazón como de tibial anterior, se lavaron con PBS dos veces y se añadió la reacción TUNEL del kit, durante 60 minutos a 37°C y en oscuridad. Seguidamente, se lavaron los cortes con PBS 3 veces y se tiñeron con DAPI 0,5 µg/ml, diluido en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS y se montaron con un cubre-objetos en medio de montaje Dako Fluorescent Mounting Medium. Las imágenes se tomaron en el microscopio de fluorescencia ZEISS AX10, con un objetivo plan apocromático 20x, conectado a una cámara ZEISS AxioCam MRm.

2.10. Microscopía electrónica de transmisión.

Preparación de la muestra: una vez fijados los tejidos (según el método descrito en el apartado 2.1.7), se cortaron en un vibratomo secciones de 200 µm de grosor para cada tejido, y éstas se enviaron al Servicio de Microscopía Electrónica del CBMSO. Allí, se llevó a cabo la inclusión de las muestras en la resina, así como su corte, tinción y visualización. Brevemente, se llevó a cabo una post-fijación de las muestras con tetróxido de osmio al 2% y ferricianuro potásico al 1%, durante 1 hora a 4°C. Seguidamente, se lavaron con agua bidestilada estéril 3 veces y se marcaron con acetato de uranilo al 2%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras volver a lavar las muestras, se deshidrataron mediante su incubación en distintas soluciones de etanol a concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 95% y 3x 100%), durante 10 minutos cada una a 4°C. Finalmente, se incluyeron en una resina Epoxi TAAB 812, que polimerizó durante 2 días a 60°C. Una vez incluidas en la resina, se cortaron los bloques en secciones ultrafinas de 70 nm de grosor, utilizando el ultramicrotomo Ultracut UCT. Para aumentar el contraste, los cortes se

tiñeron con acetato de uranilo al 7%, durante 7 minutos y a temperatura ambiente; y con citrato de plomo, mediante procedimientos estandarizados.

Toma y análisis de las imágenes: se tomaron imágenes a distintos aumentos en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 Flash (Tokyo), acoplado a una cámara digital CMOS (4Kx4K) Oneview (Gatan). Los análisis se llevaron a cabo con el *software* ImageJ. Tanto en corazón como en cuádriceps, se midieron distintos parámetros relativos a la anatomía mitocondrial, según el método establecido por Picard, White y Turnbull (191). Concretamente, se midieron: área mitocondrial, perímetro mitocondrial, circularidad (hace referencia a cómo de curvo es el perímetro de un objeto) mitocondrial, redondez (hace referencia a cómo de parecido a un círculo es un objeto, siendo su diámetro el mismo en todas las direcciones) mitocondrial y diámetro de Feret (diámetro de mayor longitud que posee un objeto) mitocondrial. Además, se midió el número total de mitocondrias/área de tejido, así como el contenido mitocondrial (definido como la suma de todas las áreas de las mitocondrias/área de tejido). Por último, en el caso del corazón, se cuantificó el número de contactos establecidos entre mitocondrias/ número de mitocondrias totales, así como el número de gotas lipídicas/área de tejido, y el área de éstas. En el caso del cuádriceps, también se cuantificó el número de gotas lipídicas/área de tejido, así como la distancia entre líneas Z de los sarcómeros.

2.11. Estadística.

Para determinar si los datos siguieron una distribución normal, se realizó un test D'Agostino-Pearson, así como un test ROUT para eliminar posibles datos atípicos.

En aquellos casos en los que los datos siguieron una distribución normal, éstos se representaron como la media y la desviación estándar. En aquellos otros en los que la distribución no fue normal, los datos se presentaron como la mediana, el rango intercuartílico, el valor máximo y mínimo.

Para el análisis estadístico, en los grupos experimentales del estudio del entrenamiento, cuyos datos no siguieron una distribución normal, se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas entre los grupos (factor grupo). Cuando se encontraron diferencias significativas en el test principal, se empleó un test *post hoc* de Dunn, para hallar las diferencias significativas específicas entre pares de grupos experimentales. Por otro lado, en los análisis realizados en los grupos de ratones del estudio temporal, así como otras comparaciones por pares de grupos experimentales, cuyos datos no siguieron una distribución normal, se empleó el test no paramétrico de la U de Mann Whitney para determinar la existencia de diferencias significativas entre pares de grupos. Por último, en el estudio del manejo de Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos, cuyos datos sí siguieron una distribución normal, se empleó el test paramétrico de la t de Student para determinar la existencia de diferencias significativas entre pares de grupos experimentales.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism® 7 para Windows. Se asumió que las diferencias eran significativas cuando el p valor fue $< 0,05$.

Con el fin de determinar la dirección en el plano en la cual, para una variable dada, los datos de cada grupo experimental mostraron mayor variabilidad o dispersión, se realizó un análisis de componentes principales mediante el método descrito por Metsalu *et al.* (192), a través de la aplicación disponible en la página web <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>. Para visualizar la distribución de los datos y su densidad de probabilidad, se realizaron gráficos de violín (193) en la web <http://shiny.chemgrid.org/boxplot/>.

RESULTADOS

1. Evolución temporal de la capacidad aeróbica y muscular en los ratones Hq.

Con el objetivo de evaluar la capacidad aeróbica y muscular de los ratones Hq y su progresión en el tiempo, se sometió a los ratones del estudio de la evolución temporal (de 2, 3 y 6 meses) a una batería de pruebas funcionales: test de coordinación y equilibrio en *rotarod*, capacidad locomotora en tapiz rodante, fuerza de agarre de las patas delanteras en *hand-grip*, y test de coordinación y agarre en barra horizontal. Además, en cada momento de evaluación, se determinó el peso y el porcentaje de pelo que cubría la superficie corporal.

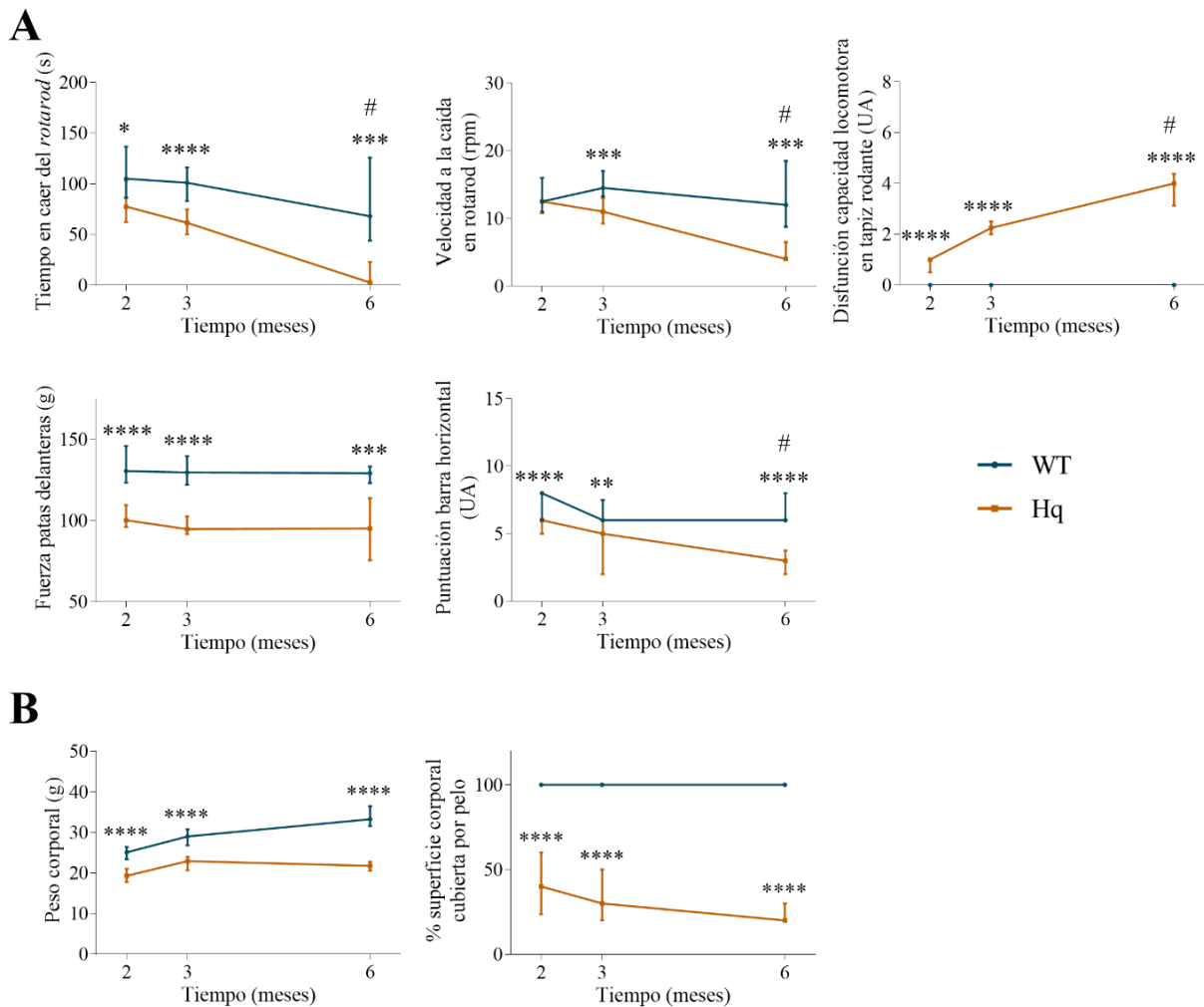


Figura 9. Evolución de la capacidad funcional. (A) Pruebas funcionales realizadas a ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal a 2, 3 y 6 meses: tiempo en caer del *rotarod*, velocidad de giro en el momento de la caída, disfunción de la capacidad locomotora en tapiz rodante, fuerza de las patas delanteras y puntuación en el test de la barra horizontal (barra de 6 mm). (B) Peso corporal y porcentaje de superficie corporal cubierta por pelo. **Datos:** para cada grupo experimental (2 meses, n=18 ratones; 3 meses, n=12 ratones; 6 meses, n=8-10 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. **Estadística:** *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo control de su edad; #p<0,05 Hq 6 meses significativamente distinto de Hq 2 meses (test U de Mann-Whitney). **Abreviaturas:** s, segundos; rpm, revoluciones por minuto; UA, unidades arbitrarias; g, gramos.

Los resultados del test *rotarod* mostraron que los ratones Hq tardaban un tiempo significativamente menor en caer de la rueda giratoria, en comparación a los ratones WT de su misma edad, en todos los momentos analizados (**Fig.9A**). Consecuentemente, la velocidad (rpm) a la que giraba la rueda cuando caían los ratones Hq fue significativamente menor que en el caso de los ratones WT a 3 y 6 meses de edad (**Fig.9A**). Por otro lado, en el test del tapiz rodante, los ratones Hq alcanzaron una puntuación total significativamente mayor que los WT de su edad (en los que la puntuación fue 0 en los tres momentos) a 2, 3 y 6 meses, lo cual significó una disfunción en la capacidad locomotora (**Fig.9A**). En cuanto al test de la fuerza de las patas delanteras, los ratones Hq mostraron una fuerza significativamente menor que los WT a todas las edades (**Fig.9A**). Por último, los ratones Hq alcanzaron una puntuación significativamente menor que los WT en el test de la barra horizontal a 2, 3 y 6 meses, que significó una peor coordinación y capacidad de agarre (**Fig.9A**). En general, se observó una tendencia a unos peores resultados y, por tanto, a una degeneración de la capacidad aeróbica y muscular de los ratones Hq a lo largo del tiempo, con la excepción de la fuerza en las patas delanteras.

En lo relativo al peso, éste fue significativamente menor en los ratones Hq que en los WT de su misma edad a 2, 3 y 6 meses. Además, se vio que a partir de los 3 meses los ratones Hq dejaron de ganar peso, al contrario que lo que sucedía en ratones WT (**Fig.9B**). Por último, los ratones Hq presentaron un porcentaje de pelo corporal significativamente menor (entre un 25% y un 40%) que los WT a todas las edades (**Fig.9B**).

2. Efectos del entrenamiento en la capacidad aeróbica y muscular de los ratones Hq.

Los ratones fueron sometidos a un programa de entrenamiento que combinó ejercicios de resistencia y fuerza (descritos en la sección de materiales y métodos), durante un total de 8 semanas. Antes y después de llevar a cabo dicho programa, se evaluó la capacidad de los ratones con distintos test: esfuerzo máximo en tapiz rodante y fuerza de agarre de las patas delanteras en *hand-grip*. Los resultados previos del laboratorio demostraron que el ejercicio físico produjo una mejora significativa en la capacidad aeróbica de los ratones Hq, así como en la fuerza muscular. Además, no se observó una mayor actividad de la proteína creatina quinasa en el suero de los ratones Hq, por lo que se descartó la existencia de daño muscular producido por el entrenamiento. Así, los resultados mostraron la efectividad del protocolo de entrenamiento utilizado (173).

A partir de este punto, los resultados se dividen en dos bloques: las manifestaciones de la deficiencia de AIF en corazón; y las manifestaciones de la deficiencia de AIF en músculo esquelético. En cada uno de ellos se estudian las alteraciones moleculares producidas por la deficiencia de AIF en dicho tejido, así como los posibles efectos del programa de entrenamiento sobre el fenotipo.

3. Manifestaciones de la deficiencia de AIF en corazón y efectos del programa de entrenamiento.

3.1. Análisis del perfil proteómico y de las modificaciones oxidativas postraduccionales.

Para comenzar el estudio de las manifestaciones de la deficiencia de AIF en corazón, así como los posibles efectos que tiene el programa de entrenamiento, se llevó a cabo un análisis del perfil proteómico mediante marcaje iTRAQ 4 plex y posterior identificación por espectrometría de masas. Se realizó en los ratones del estudio de la intervención con entrenamiento: WT sedentarios (WT Sed), WT entrenados (WT Ent), Hq sedentarios (Hq Sed) y Hq entrenados (Hq Ent). A partir de los resultados obtenidos — que indican la ratio de cambio en los niveles de proteína en los diferentes grupos experimentales con respecto al WT sedentario— se pudieron observar algunas proteínas cuyos niveles estaban alterados en los ratones Hq (en el material suplementario de la presente memoria se muestran las tablas con las proteínas alteradas más relevantes). Algunos de estos cambios se validaron posteriormente por *western blot*, con el fin de estudiar los procesos celulares relacionados con ellos, como se irá detallando a lo largo de los resultados.

Además, se realizó otro análisis proteómico para observar posibles cambios en los niveles de modificaciones oxidativas postraduccionales en residuos de cisteína de proteínas, mediante marcaje iTRAQ 6 plex y posterior identificación por espectrometría de masas. El estudio se llevó a cabo en los grupos experimentales de ratones de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal: WT sedentarios y Hq sedentarios (en el material suplementario se muestran las tablas con las modificaciones más relevantes). Las diferencias en los niveles de las modificaciones observadas a partir de este análisis no se pudieron validar, pero a lo largo de los resultados se hará referencia a aquellas encontradas en proteínas relacionadas con los procesos celulares alterados en los ratones Hq.

3.2. AIF y su función como inductora de muerte celular.

3.2.1. Niveles de AIF.

En primer lugar, se comenzó por comprobar en qué medida el corazón del ratón Hq presentaba una deficiencia en AIF, para lo que se midieron los niveles cardiacos de AIF por *western blot* en homogeneizados totales de los ratones del estudio de la evolución temporal. Se comprobó que los niveles de AIF en corazón de ratones Hq eran significativamente menores que en ratones WT de su misma edad, quedando aproximadamente un 5% de proteína residual respecto a éstos. Además, los niveles residuales de AIF se mantuvieron constantes a 2, 3 y 6 meses de edad (**Fig.10A**).

A continuación, se llevó a cabo la detección de AIF mediante inmunofluorescencia en un cultivo de cardiomiocitos aislados de ratones neonatales. Se observó que, en los cardiomiocitos WT, AIF presentaba un patrón de localización similar al observado con el marcaje mitocondrial (detectado

mediante un anticuerpo contra la proteína ATP5A del CV). Sin embargo, en el caso de los cardiomiocitos Hq, la mayor parte de AIF se encontraba presente en los núcleos (**Fig.10B**). Esta observación sugirió que la proteína residual de AIF presente en los cardiomiocitos Hq neonatales estaba mayoritariamente migrando desde las mitocondrias al núcleo celular.

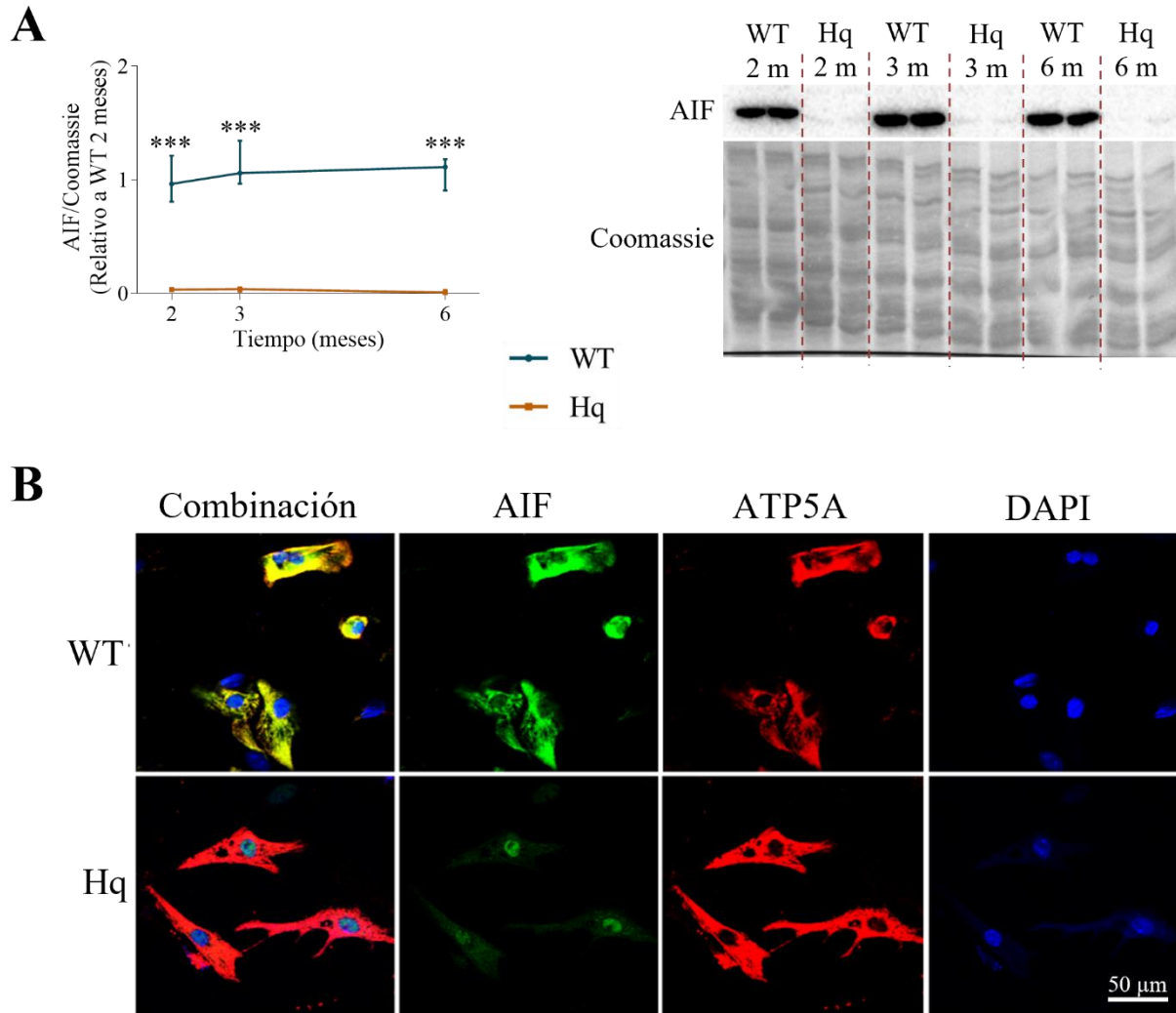


Figura 10. Niveles y localización celular de AIF en corazón. (A) Niveles de AIF medidos por *western blot* en homogeneizados de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total de su carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=8 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses. Estadística: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney). (B) Detección de AIF (verde), ATP5A (rojo) y núcleos (DAPI, azul) mediante inmunofluorescencia en cardiomiocitos neonatales de ratones WT y Hq (objetivo 40x).

3.2.2. Muerte celular.

Puesto que la principal función conocida de AIF en el núcleo es la inducción de muerte celular, se analizó si la proteína residual de AIF localizada en el núcleo estaba dando lugar a unos mayores niveles de muerte en el corazón Hq.

3.2.2.1. Niveles de caspasa 3 y *parthanatos*.

Para averiguar si podía estar teniendo lugar una activación de caspasas que tuviese como consecuencia la salida de AIF de la mitocondria, se determinaron por *western blot* los niveles de caspasa 3 en los ratones del estudio de la evolución temporal. Únicamente se observó la banda correspondiente a su zimógeno inactivo —pro caspasa 3— tanto en los ratones Hq como en los WT, pero no los fragmentos de 12 y 17 KDa que aparecen como consecuencia del corte proteolítico que sufre el zimógeno para su activación durante la apoptosis. A pesar de ello, se observaron unos niveles de aproximadamente el doble de la banda correspondiente a la pro caspasa 3 en los corazones Hq respecto a los WT a 2, 3 y 6 meses (**Fig.11**).

Con el objetivo de saber si la migración de AIF al núcleo se producía como consecuencia de la muerte celular tipo *parthanatos*, se midieron por *western blot* los niveles de polímeros de poli [ADP-ribosa] (PAR), generados por la activación de PARP-1, en los ratones del estudio de la evolución temporal. No se encontraron diferencias significativas en los niveles totales de polímeros entre los ratones Hq y WT a ninguna de las edades (**Fig.11**).

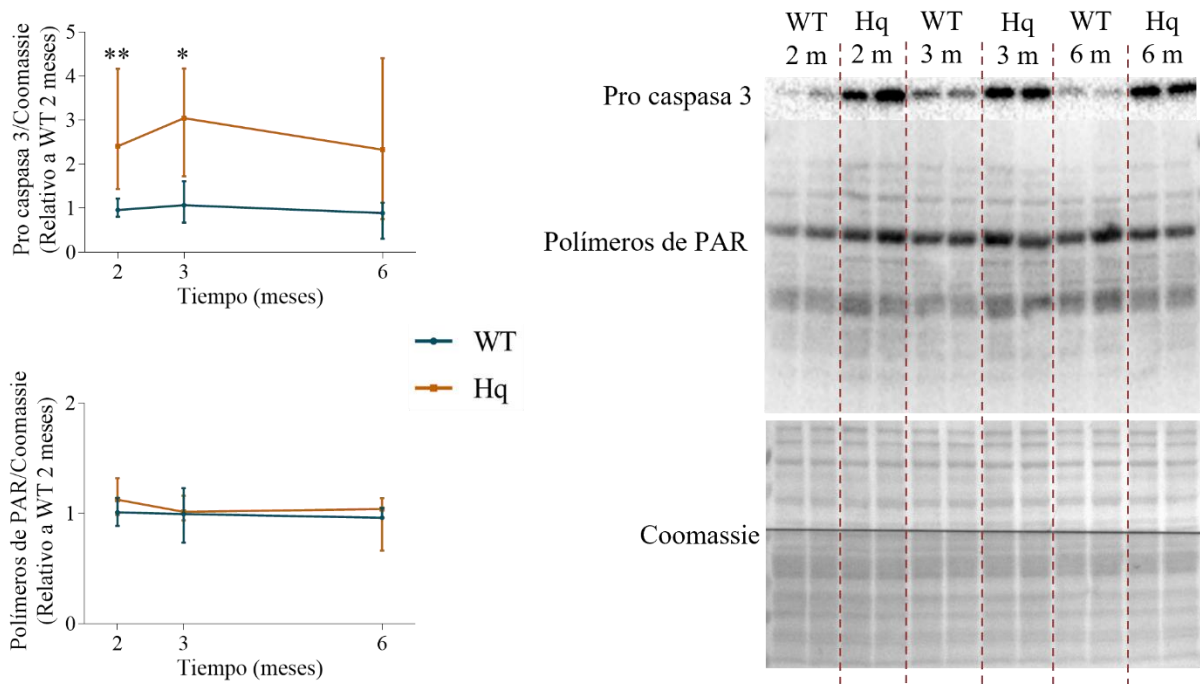


Figura 11. Niveles de pro caspasa 3 y *parthanatos* en corazón. Niveles de pro caspasa 3 y polímeros de poli [ADP-ribosa] (PAR) medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total de su carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=8 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

3.1.1.1. Niveles de anexinas.

Gracias al análisis proteómico realizado en ratones WT y Hq del estudio de la intervención, se observaron cambios en varias proteínas pertenecientes a la familia de las anexinas —entre cuyas funciones destaca su implicación en el proceso de apoptosis (194, 195)—. Concretamente, se encontraron unos niveles superiores de las anexinas A1, A3, A5 y A11 en los ratones Hq respecto a los WT (material suplementario, **Tabla S1**). Se decidió validar los niveles de dos de ellas, la anexina A3 y la anexina A5, mediante *western blot* en los ratones del estudio de la evolución temporal. Se corroboró así que los niveles de ambas proteínas eran significativamente mayores en los ratones Hq que en los WT a 2, 3 y 6 meses de edad (**Fig.12A**). Además, se detectó la anexina A3 mediante inmunofluorescencia en cortes de tejido cardiaco de los ratones sedentarios del estudio de la intervención, con el fin de observar su localización celular. Se vio que, en el caso de los ratones WT, la anexina A3 se disponía de forma homogénea por todo el corazón. Sin embargo, en el caso de los Hq, se encontraba agregada y dispuesta principalmente alrededor de los núcleos (**Fig.12B**).

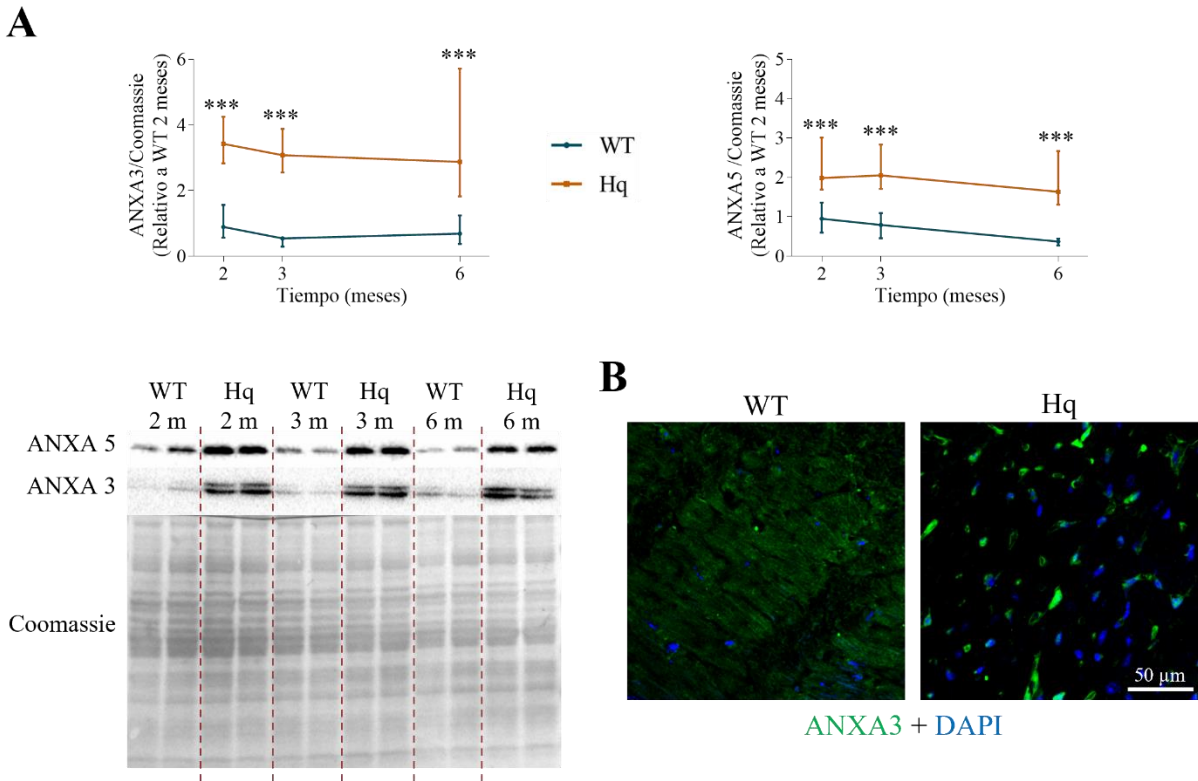


Figura 12. Alteraciones en la familia de las anexinas en corazón. (A) Niveles de las proteínas ANXA3 y ANXA5 medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total de su carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=8 ratones), se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney). (B) Detección de ANXA3 (verde) y núcleos (DAPI, azul) mediante inmunofluorescencia en cortes de tejido cardiaco de ratones WT y Hq sedentarios del estudio de la intervención (objetivo 40x). Abreviaturas: ANXA, anexina.

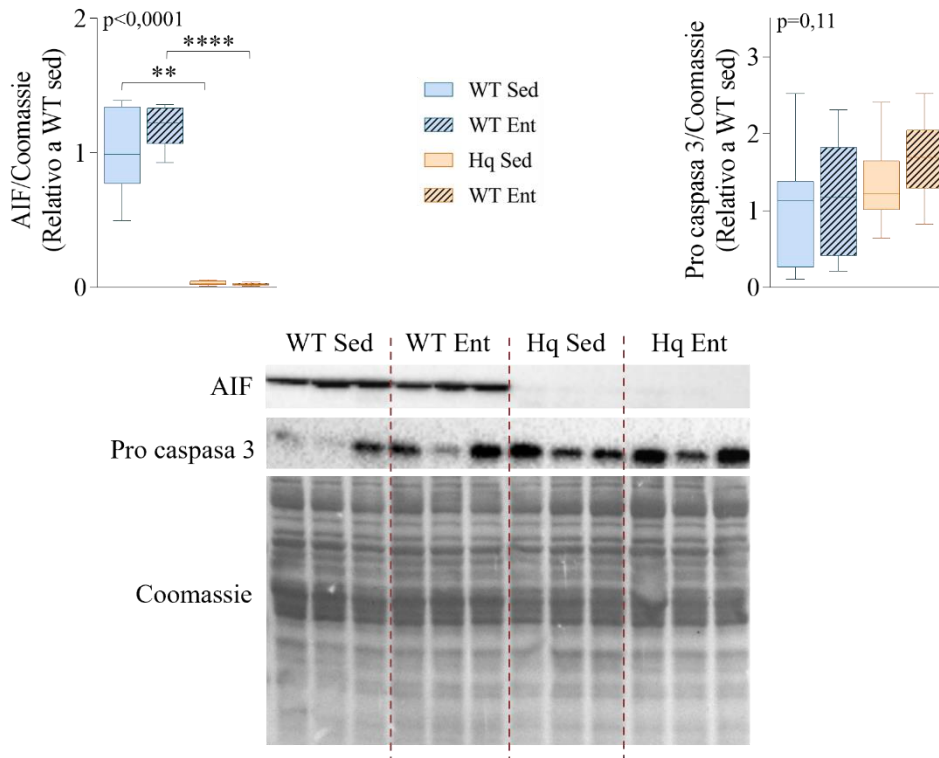
3.1.2. Efectos del entrenamiento sobre los niveles de AIF y la muerte celular.

Con el objetivo de analizar si el entrenamiento producía algún efecto sobre la cantidad residual de AIF en el ratón Hq, así como sobre los niveles de muerte celular, se midieron por *western blot* los niveles de AIF y caspasa 3 en los ratones del estudio de la intervención. No se observó ninguna diferencia significativa en los niveles residuales de AIF entre los ratones Hq entrenados y los sedentarios (**Fig.13A**). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de pro caspasa 3 en los ratones Hq entrenados en comparación con los sedentarios (**Fig.13A**). Por otro lado, se llevó a cabo un marcaje mediante TUNEL, con el fin de detectar la posible fragmentación del ADN producida por la apoptosis. No se observaron núcleos marcados en los cardiomiocitos, ni en ratones WT ni en los Hq, tanto sedentarios como entrenados. Sin embargo, sí se detectaron núcleos marcados con TUNEL en la capa más externa de células, correspondiente al epicardio, de los ratones Hq, tanto sedentarios como entrenados, pero no de los ratones WT (**Fig.13B**). Por otro lado, previamente se había descartado la presencia de necrosis en el músculo, tanto por efecto de la deficiencia de AIF como del entrenamiento, debido a que los niveles de creatina quinasa plasmática fueron normales (173). Finalmente, el estudio proteómico no sugirió ningún efecto del entrenamiento sobre los niveles de las proteínas pertenecientes a la familia de las anexinas, ni en el caso de los ratones Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios, ni en el de los WT entrenados respecto a los WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S1**).

En definitiva, los presentes datos indican que la inserción viral en el gen Aifm1 del ratón Hq produjo un déficit marcado de la proteína en el corazón, dejando unos niveles residuales de la misma de aproximadamente un 5%. Esta proteína residual migraría mayoritariamente desde las mitocondrias hasta los núcleos celulares, sin inducir la muerte celular en los cardiomiocitos —ni apoptosis, ni necrosis, ni parthanatos— aunque sí se detectó muerte en las células mesoteliales del epicardio de los ratones Hq. Además, el déficit de AIF indujo unos niveles mayores de pro caspasa 3 en tejido cardíaco, pero no su activación; así como de varias proteínas pertenecientes a la familia de las anexinas. Por último, el programa de entrenamiento utilizado no produjo cambios en los niveles de AIF ni tuvo efectos sobre la muerte celular en los ratones Hq.

Resultados

A



B

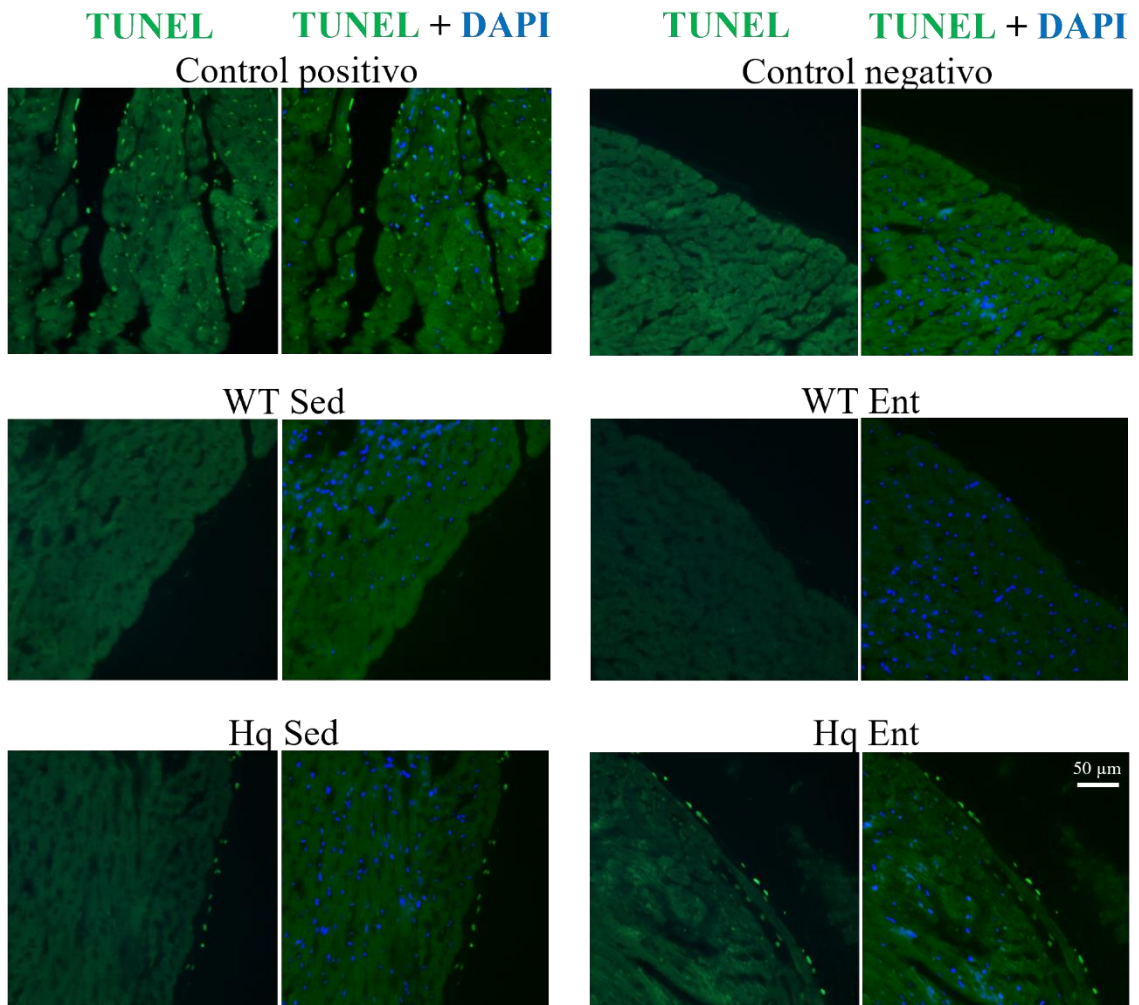


Figura 13. Efectos del entrenamiento sobre los niveles de AIF y muerte celular en corazón. (A) Niveles de AIF y pro caspasa 3 medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total de su carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en cada gráfica) y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos). (B) Detección de núcleos apoptóticos mediante TUNEL (verde) y núcleos (DAPI, azul) en cortes de corazón de ratones WT y Hq, Sed y Ent, del estudio de la intervención (objetivo 20x).

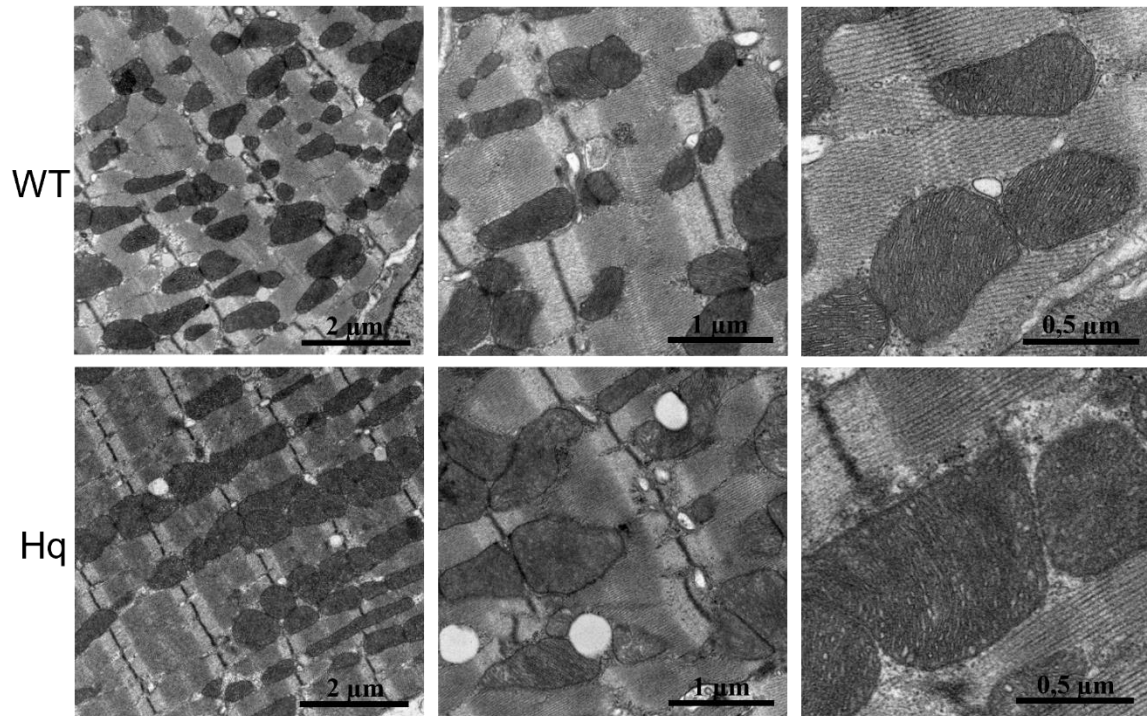
3.2. Fenotipo mitocondrial.

3.2.1. Ultraestructura mitocondrial.

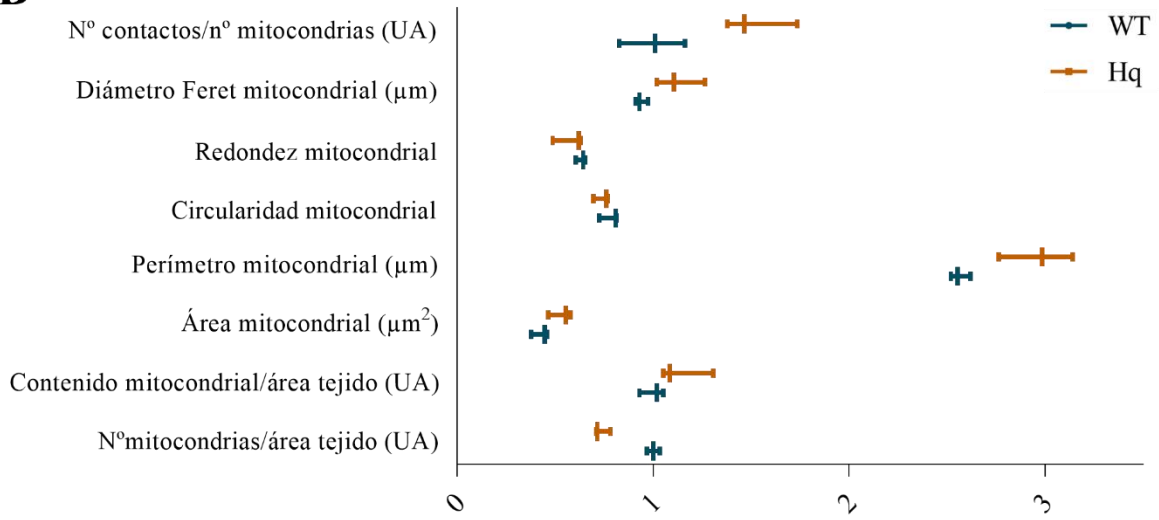
Para estudiar las posibles alteraciones que la deficiencia de AIF podía causar en la ultraestructura de las mitocondrias, se llevó a cabo un análisis de éstas a partir de imágenes de microscopía electrónica tomadas en tejido cardiaco de ratones WT y Hq de 6 meses de edad (**Fig.14A**), y se midieron distintos parámetros para la caracterización de estos orgánulos.

En primer lugar, se contó el número de mitocondrias presentes por superficie de tejido, y se observó un mayor número de mitocondrias en los ratones WT respecto a los Hq (**Fig.14B**). A continuación, se calculó el área mitocondrial y se observó que era mayor en ratones Hq que en ratones WT (**Fig.14B**). Además, un gráfico de violín en el que se representó la distribución de las mitocondrias en función del área mitocondrial mostró un patrón diferencial entre los ratones WT y los Hq, observándose una mayor acumulación de mitocondrias de menor área en los ratones WT y una mayor acumulación de mitocondrias de mayor área en los ratones Hq (**Fig.14C**). Sumando las áreas de todas las mitocondrias presentes en áreas de tejido iguales, se calculó el contenido mitocondrial total, resultando éste ligeramente mayor en los ratones Hq que en los WT (**Fig.14B**). Además, se midió el perímetro mitocondrial, que resultó mayor en los ratones Hq que en los WT (**Fig.14B**). Se midieron, por otro lado, la circularidad (parámetro que hace referencia a cómo de curvo es el perímetro de un objeto) y la redondez (parámetro que hace referencia a cómo de parecido a un círculo es un objeto, es decir, siendo su diámetro el mismo en todas las direcciones). En ambos casos se observaron niveles ligeramente mayores en los ratones WT respecto a los Hq (**Fig.14B**). También se midió el diámetro de Feret (entendido como la mayor distancia entre dos puntos de un objeto) mitocondrial, resultando ser mayor en los ratones Hq que en los WT, lo que indicaría unas mitocondrias más alargadas (**Fig.14B**). Por último, se midió el número de contactos que se establecen entre mitocondrias, normalizado por el número de mitocondrias presentes, y se vio que éste era mayor en ratones Hq que en ratones WT (**Fig.14B**).

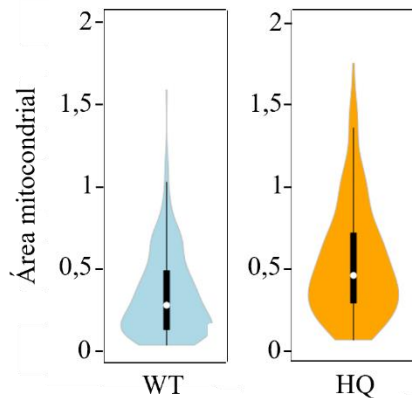
A



B



C



D

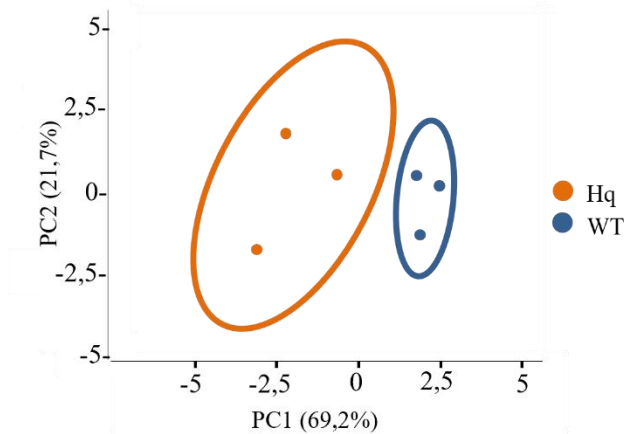


Figura 14. Ultraestructura mitocondrial cardiaca. (A) Imágenes representativas de las mitocondrias de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) de 6 meses, tomadas con el microscopio electrónico de transmisión a distintos aumentos (de izquierda a derecha: 5000x, 8000x y 15000x). (B) Variables relativas a la ultraestructura de las mitocondrias medidas con el software ImageJ: número de mitocondrias/área de tejido; contenido mitocondrial/área de tejido; área, perímetro, circularidad y redondez mitocondrial; diámetro mitocondrial de Feret; y número de contactos entre mitocondrias/nº de mitocondrias. Datos: para cada grupo experimental (n=3 ratones), se representan la mediana y los valores mínimo y máximo. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT (test U de Mann-Whitney). (C) Gráfico de violín que representa la distribución de todos los datos del área mitocondrial (de los 3 ratones de cada grupo) y su densidad de probabilidades, así como la mediana y el rango intercuartílico. (D) Análisis por componentes principales realizado a partir de todos los parámetros medidos en la gráfica B. Se muestra que los ratones WT y los Hq conforman dos entidades diferentes y no solapantes en lo que a la ultraestructura mitocondrial se refiere. Abreviaturas: UA, unidades arbitrarias.

Todos los parámetros mencionados fueron medidos en un total de 3 ratones WT y 3 ratones Hq, y en varias imágenes por ratón, obteniendo un total de aproximadamente 100 mitocondrias en cada grupo experimental. Debido al bajo número de animales analizados (n=3), no fue posible encontrar diferencias significativas entre los ratones WT y Hq. Sin embargo, el análisis estadístico realizado en la población de mitocondrias de cada grupo experimental (n=100) sí demostró diferencias significativas en los siguientes parámetros: número de mitocondrias por área de tejido (p<0,0001); área mitocondrial (p<0,0001); perímetro mitocondrial (p<0,0001); redondez mitocondrial (p=0,0005); diámetro de Feret mitocondrial (p<0,0001); y número de contactos entre mitocondrias (p=0,036).

Por otro lado, dado que el número de ratones analizados constituyó una muestra muy pequeña con relación a un gran número de variables, se llevó a cabo un análisis por componentes principales (PCA, *principal component analysis*) para inferir si los ratones WT y los Hq conforman entidades diferentes en lo que a la ultraestructura de las mitocondrias se refiere. Este análisis permite reducir un número elevado de parámetros medidos o dimensiones a un número pequeño de componentes principales más manejable, conservando la mayor parte de información posible. La gráfica generada a partir del PCA permitió ver que los ratones WT y los Hq conforman, cada uno, una entidad diferente, sin existir solapamiento entre ambos grupos (**Fig.14D**). Esto significa que, con un 95% de probabilidad, una nueva medida realizada en una muestra de alguno de los dos grupos experimentales caerá dentro del área correspondiente a su grupo.

3.2.2. Dinámica y biogénesis mitocondrial.

El hecho de que las mitocondrias de los ratones Hq tuviesen una mayor área y perímetro mitocondrial que las de ratones WT, así como una menor redondez, un mayor diámetro de Feret y un mayor número de contactos entre ellas, llevó a pensar en un posible aumento de la fusión mitocondrial. Por ello, se midieron por *western blot* los niveles de la proteína implicada en fusión, MFN2, en los ratones del estudio de la evolución temporal. Se comprobó que éstos eran significativamente mayores en los ratones Hq que en los WT a 2 y 6 meses de edad. Sin embargo, a 3 meses de edad no se encontraron diferencias entre los grupos (**Fig.15A**). Por otro lado, para comprobar si los ratones Hq presentaban un mayor contenido mitocondrial que los WT, se midieron los niveles de varias proteínas mitocondriales que son habitualmente utilizadas como indicadoras de contenido mitocondrial: la porina VDAC1, HSP60 y CS. Se encontraron unos niveles mayores de VDAC1 en los ratones Hq que en los WT de su edad, siendo la

Resultados

diferencia significativa a 6 meses. Además, los niveles de VDAC1 aumentaron con la edad en los ratones Hq, siendo mayores a 6 que a 2 meses (**Fig.15A**). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de HSP60 y CS entre los ratones Hq y WT a ninguna edad (**Fig.15A**). Por otro lado, se midieron los niveles del ARNm de *Pgc1 α* —principal regulador de la biogénesis mitocondrial— en ratones de 2 y 6 meses. Se encontraron unos niveles menores de *Pgc1 α* en los ratones Hq respecto a los WT, siendo significativa la diferencia únicamente a 6 meses de edad (**Fig.15B**).

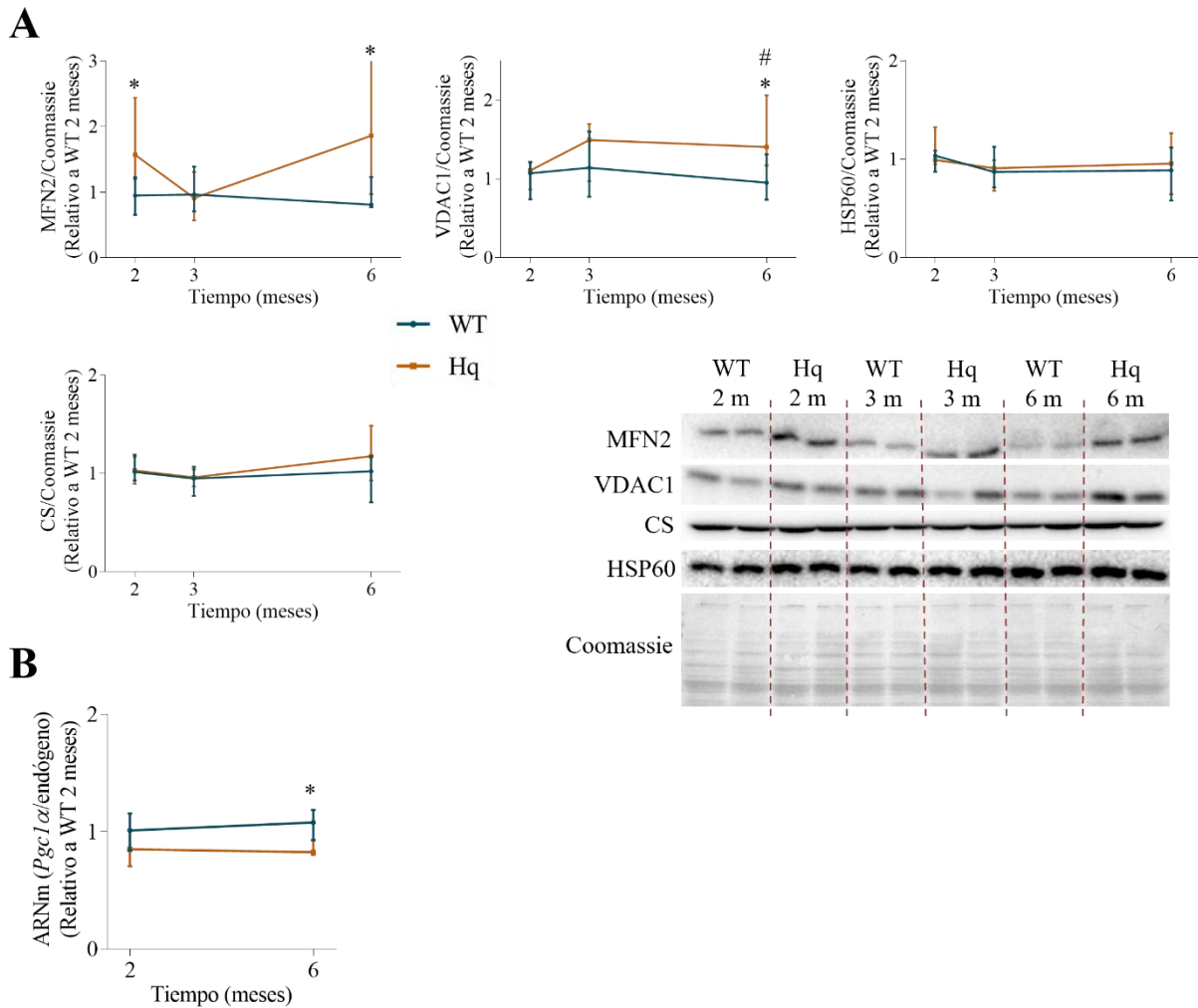


Figura 15. Dinámica y contenido mitocondrial en corazón. (A) Niveles de las proteínas MFN2, VDAC1, HSP60 y CS medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). (B) Niveles de ARNm de *Pgc1 α* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada mediante tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental ([A] n=8 ratones; [B] n=5-6 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses y, además, en (B) respecto a la expresión de genes endógenos. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad; #p<0,05 Hq 6 meses significativamente distinto de Hq 2 meses (test U de Mann-Whitney).

3.2.3. Efectos del entrenamiento sobre la dinámica y el contenido mitocondrial.

Con el fin de averiguar si el entrenamiento podía tener algún efecto sobre la fusión o el contenido mitocondrial, se cuantificaron los niveles de OPA1, VDAC1, HSP60 y CS en los ratones del estudio de la intervención. Respecto a OPA1, se cuantificaron todas las bandas correspondientes a las formas cortas y largas de la proteína y se sumaron (ya que no se observó un patrón diferencial entre ellas, ni por efecto del entrenamiento ni del genotipo). Aunque el test estadístico principal mostró diferencias entre grupos ($p=0,0006$), el test *post hoc* no detectó diferencias significativas por efecto del entrenamiento, ni en los ratones WT ni en los Hq (**Fig.16**). Sin embargo, sí se observaron unos niveles de OPA1 significativamente mayores en los ratones Hq que en los ratones WT sedentarios, tal y como se había visto para la proteína MFN2 en el estudio de la evolución temporal. Por otro lado, se observaron cambios significativos en los niveles de VDAC1 ($p=0,0015$), con más VDAC1 en los ratones Hq que en los WT sedentarios. Asimismo, se detectó un efecto del entrenamiento en los niveles de VDAC1 en los ratones WT entrenados respecto a los WT sedentarios, adaptación que no se observó en los ratones Hq (**Fig.16**). Respecto a HSP60 y CS, en ambas variables se detectaron cambios significativos en el test principal ($p=0,0005$ y $p=0,0006$, respectivamente). En el caso de HSP60, con el test *post hoc* no se detectaron diferencias entre los ratones entrenados y sedentarios, ni en los Hq ni en los controles. Sin embargo, sí se vieron unos niveles significativamente menores de HSP60 en los ratones Hq entrenados respecto a los WT entrenados (**Fig.16**). Por último, el test *post hoc* no reveló diferencias significativas en los niveles de CS entre los ratones entrenados y sedentarios, ni en el caso de los WT ni en el de los Hq; pero sí se vieron unos mayores niveles en los ratones Hq entrenados respecto a los WT (**Fig.16**).

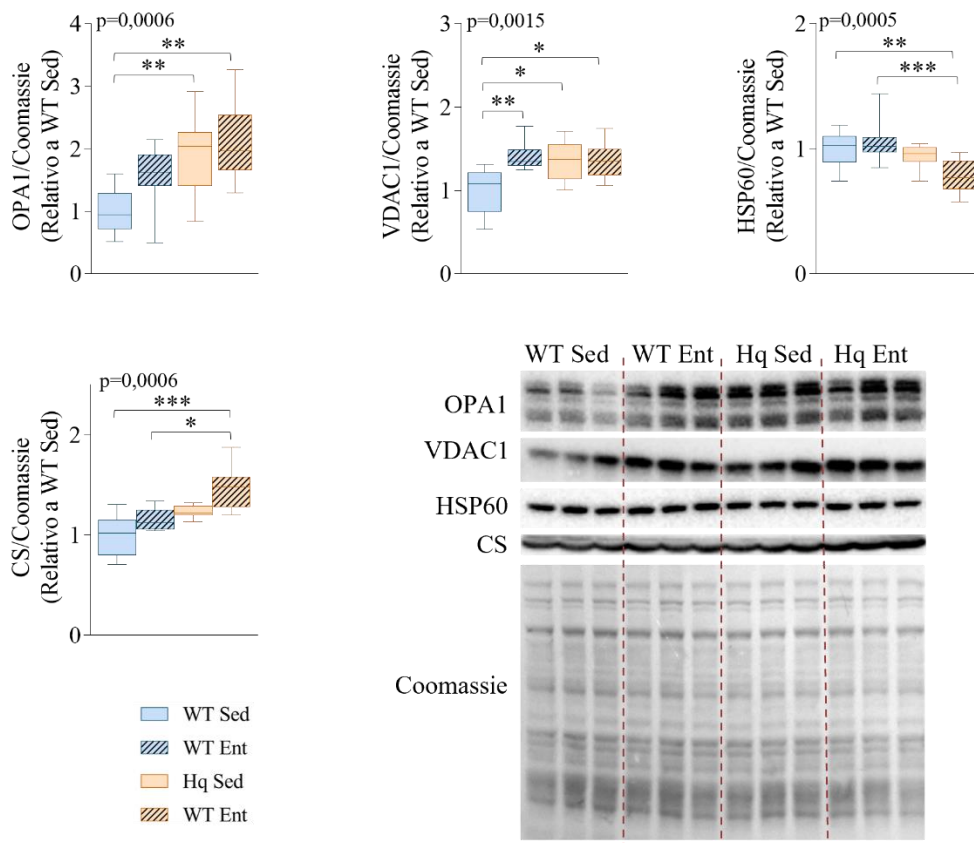


Figura 16. Efectos del entrenamiento sobre la dinámica y el contenido mitocondrial en corazón. Niveles de OPA1, VDAC1, HSP60 y CS medidos por *western blot* en homogenizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartilico y los valores mínimo y máximo. Los niveles se relativizaron respecto al promedio del WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en cada gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

En conclusión, la deficiencia de AIF en corazón indujo un cambio en el fenotipo mitocondrial del ratón Hq, con un posible aumento de la fusión mitocondrial, lo que daría lugar a un menor número de mitocondrias que tendrían un mayor tamaño y diámetro de Feret, y más conectadas entre sí que en los animales WT. Sin embargo, la ausencia de cambios significativos observada en las proteínas HSP60 y CS por efecto de la enfermedad, y los menores niveles de ARNm de Pgc1 α , impiden concluir que exista un aumento de la biogénesis mitocondrial en los ratones Hq que dé lugar a un mayor contenido mitocondrial. Por último, el entrenamiento no mostró efectos relevantes sobre la fusión ni el contenido mitocondrial en el corazón de los ratones Hq.

3.3. Alteraciones en la distribución de lípidos.

Las imágenes de tejido cardiaco tomadas en el microscopio electrónico de transmisión revelaron una posible alteración en la cantidad de gotas lipídicas presentes en los ratones Hq (**Fig.17A**). Por ello, se cuantificó el número de gotas lipídicas/área de tejido, así como el área promedio de las mismas. En cuanto al número de gotas lipídicas/área de tejido, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa debido a que el análisis se realizó con n=3 ratones (**Fig.17B**), si se tiene en cuenta el número de imágenes analizadas (aproximadamente 40 por genotipo), la diferencia sí resulta significativa (p<0,0001), lo que podría sugerir una tendencia a que los corazones de ratones Hq presenten un mayor número de gotas lipídicas que los WT. En cuanto al área de éstas, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones WT y Hq (**Fig.17B**).

Además, el estudio proteómico llevado a cabo en los ratones del estudio de la intervención indicó un nivel mayor de dos proteínas pertenecientes a la familia de proteínas de unión a ácidos grasos (FABP, *fatty acid binding proteins*) en los ratones Hq respecto a los WT (material suplementario, **Tabla S2**). Para validar esta diferencia, se midió la expresión de ARNm de una de ellas, *Fabp4*, en ratones de 2 y 6 meses, observándose unos niveles mayores en los ratones Hq que en los WT a ambas edades, y siendo significativa la diferencia a 2 meses (**Fig.17C**). Por otro lado, los valores del estudio proteómico correspondientes a los ratones WT entrenados respecto a los WT sedentarios, así como los Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios, no sugirieron ningún efecto del entrenamiento sobre estas proteínas (material suplementario, **Tabla S2**).

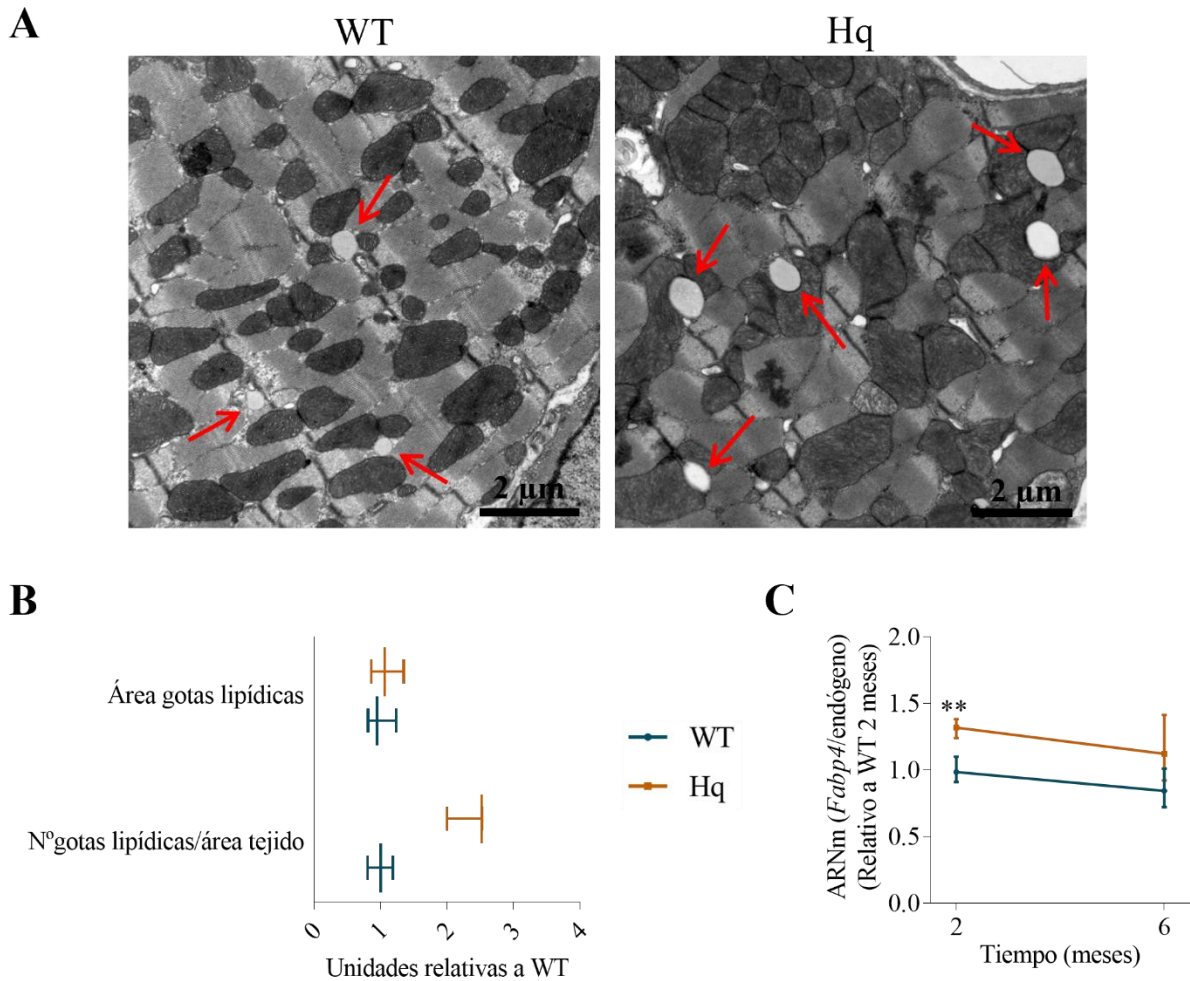


Figura 17. Distribución de lípidos en corazón. (A) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión representativas de tejido cardíaco de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) de 6 meses (5000x) del estudio de la evolución temporal. Las flechas rojas indican gotas lipídicas. (B) Número promedio de gotas lipídicas/área de tejido y área de las gotas lipídicas, en ratones WT y Hq de 6 meses, medidos en imágenes de microscopía electrónica de transmisión. (C) Niveles de ARNm de *Fabp4* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). Datos: (B) para cada grupo experimental (n=3 ratones) se representan la mediana, el valor mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT. (C) para cada grupo experimental (n=5-6 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses y a la expresión de genes endógenos. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

3.4. Sistema OXPHOS.

Está ampliamente descrito que la deficiencia de AIF da lugar a una disfunción de la CTE, que afecta principalmente al CI, lo cual tiene como consecuencia un déficit en la generación de ATP. Sin embargo, esta disfunción no ocurre en la misma medida en todos los tejidos del ratón Hq, siendo más acusada en el sistema nervioso y la retina. En el caso del corazón del ratón Hq, no está totalmente dilucidado en qué medida la deficiencia de AIF afecta a la función OXPHOS. Por esta razón, en esta tesis doctoral se estudiaron varios parámetros relacionados con el sistema OXPHOS.

3.4.1. Niveles de proteínas implicadas en el sistema OXPHOS.

El análisis proteómico realizado en los ratones del estudio de la intervención mostró numerosas proteínas —en mayor medida pertenecientes al complejo I, y en menor medida al III y IV— cuyos niveles parecían ser moderadamente menores en los ratones Hq sedentarios que en los WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S3**). A partir de estos datos, se procedió a validar por *western blot* los niveles de algunas de ellas, así como otras que no fueron identificadas en el análisis proteómico, pertenecientes a distintos complejos de la CTE y de la ATP sintasa, en homogeneizados totales de corazón de los ratones del estudio de la evolución temporal. Se observó que todas ellas —NDUFB8, NDUFS1, SDHB, CORE2, COX1 y ATP5A— presentaban niveles similares en los ratones Hq y los WT de su misma edad, a 2, 3 y 6 meses (**Fig.18A**).

La principal hipótesis que explica cómo AIF regula la función OXPHOS es mediante su interacción con la proteína CHCHD4. Ésta participa en una ruta de importe de ciertas proteínas a la mitocondria, algunas de las cuales forman parte de los complejos de la CTE. Para saber si las subunidades de los complejos que se importan a través de esta ruta podían estar afectadas en corazón, se cuantificaron por *western blot* los niveles de una de ellas —NDUFB7, la cual forma parte del CI— en homogeneizados totales de los ratones de la evolución temporal. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de NDUFB7 entre los ratones Hq y WT de su edad, a 2, 3 y 6 meses (**Fig.18A**). Sin embargo, los niveles de CHCHD4 sí resultaron ser significativamente menores en los ratones Hq a todas las edades, siendo aproximadamente la mitad que los de ratones WT de su edad (**Fig.18A**). Además, se observó un menor nivel de ARNm de *Chchd4* en ratones Hq de 2 y 6 meses en comparación a los WT de su misma edad, si bien la diferencia fue estadísticamente significativa únicamente a 2 meses (**Fig.18B**).

3.4.2. Efectos del entrenamiento sobre los niveles de proteínas implicadas en el sistema OXPHOS.

Los datos del análisis proteómico no sugirieron diferencias significativas en los ratones Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios, ni en los WT entrenados respecto a los WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S3**). Para validar estos datos, se midieron por *western blot* los niveles de NDUFB8, SDHB, CORE2, COX1 y ATP5A en homogeneizados totales de corazón de los ratones del estudio de la intervención. Efectivamente, no se observaron diferencias significativas para ninguna de estas proteínas entre los ratones entrenados y los sedentarios, ni en los Hq ni en los controles (**Fig.19**). Por último, se comprobó que el entrenamiento tampoco producía cambios en los niveles de CHCHD4, ni en los ratones WT ni en los Hq entrenados respecto a sus controles sedentarios (**Fig.19**).

Resultados

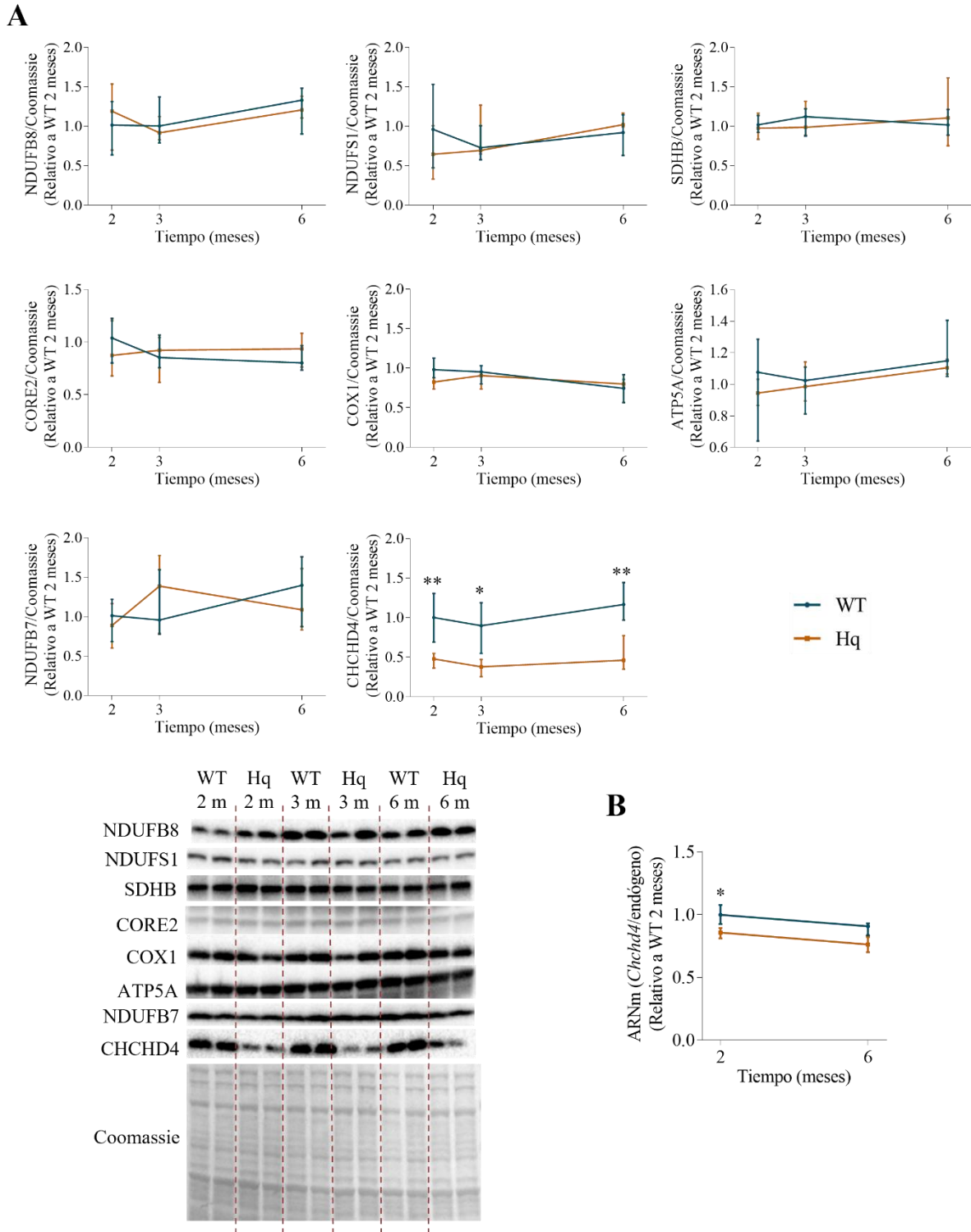


Figura 18. Proteínas implicadas en el sistema OXPHOS en corazón. (A) Niveles de diferentes subunidades representativas de los complejos OXPHOS, y de CHCHD4, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). (B) Niveles de ARNm de *Chchd4* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental ([A] n=8 ratones; [B] n=5-6 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses y, además, en (B) respecto a la expresión de genes endógenos. Estadística: *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

Resultados

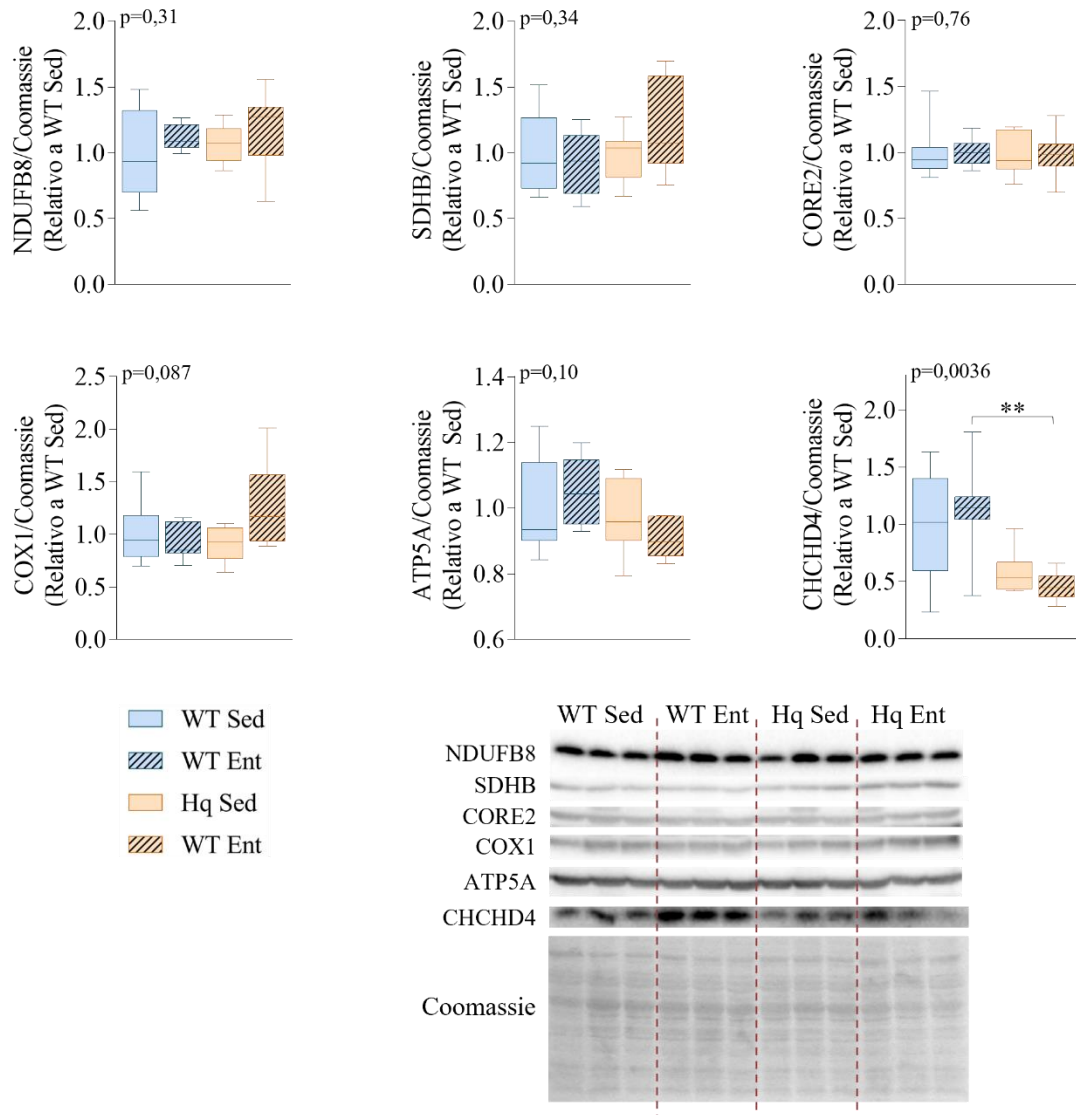


Figura 19. Efectos del entrenamiento sobre el sistema OXPHOS en corazón. Niveles de NDUFB8, SDHB, CORE2, COX1, ATP5A y CHCHD4, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones), se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en cada gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

3.4.3. Ensamblaje de los supercomplejos OXPHOS

A continuación, se estudió si la formación de supercomplejos del sistema OXPHOS podía estar afectada por la deficiencia de AIF, para lo que se separaron los distintos complejos y supercomplejos mediante BN-PAGE. Para ello, se prepararon fracciones enriquecidas en mitocondrias procedentes de tejido cardiaco de ratones de 6 meses de edad. Debido a la cantidad limitada de tejido disponible, este estudio se realizó con un *pool* de 8 fracciones mitocondriales de ratones Hq y otro de 8 fracciones de ratones WT. En primer lugar, se realizó una electroforesis en condiciones nativas en una primera dimensión (1D-BN-PAGE) y una posterior inmunodetección con anticuerpos de proteínas estructurales representativas de todos los complejos: NDUFB8, NDUFA9, NDUFB7, CORE2, COX1, ATP5A y

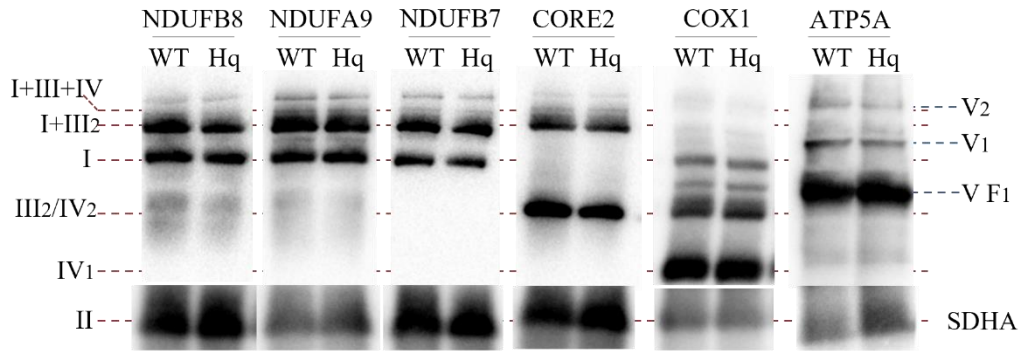
SDHA (**Fig.20A**). Puesto que los animales WT, así como los Hq, se analizaron de manera conjunta en un solo *pool*, no se pudo hacer un análisis estadístico de las diferencias observadas, pero el estudio se realizó en dos replicados técnicos distintos que mostraron los mismos hallazgos. Concretamente, todas las subunidades del CI detectadas —NDUFB8, NDUFA9 y NDUFB7— sugirieron unos niveles menores del complejo, tanto en la forma libre como formando parte del supercomplejo I+III₂ y del respirasoma (I+III₂+IV₁₋₄), en los ratones Hq respecto a los WT (**Fig.20B**). Además, se observó una tendencia a que los ratones Hq presentasen una menor cantidad de respirasoma que de CI libre, en comparación con los ratones WT. También se observaron niveles menores de la proteína CORE2 en los ratones Hq, tanto en forma del CIII libre como formando parte del supercomplejo I+III₂ y del respirasoma (**Fig.20B**). En el caso del CIV, la detección de COX1 sugirió niveles menores en ratones Hq, pero únicamente formando parte del respirasoma. Sin embargo, se produjo una acumulación del CIV en su forma libre monomérica y dimérica (**Fig.20B**). Por último, para la ATP sintasa, se encontraron niveles menores de la proteína ATP5A en los ratones Hq, en la forma monomérica (V₁) y dimérica (V₂), pero no se observaron diferencias en la subunidad F₁ del CV (**Fig.20B**).

A continuación, con el fin de calcular la ratio entre el respirasoma y el complejo libre de las subunidades del CI, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en una segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE) y posterior inmunodetección de las proteínas NDUFA9, NDUFS1 y NDUFB7 (**Fig.20C**). Así, se vio que los ratones Hq presentaron una menor ratio respirasoma/complejo libre respecto a los ratones WT, confirmando la tendencia observada en la 1D-BN-PAGE (**Fig.20D**). Por último, no se observó la acumulación de ningún intermediario de los complejos de bajo peso molecular para ninguna de las proteínas detectadas (**Fig.20C**).

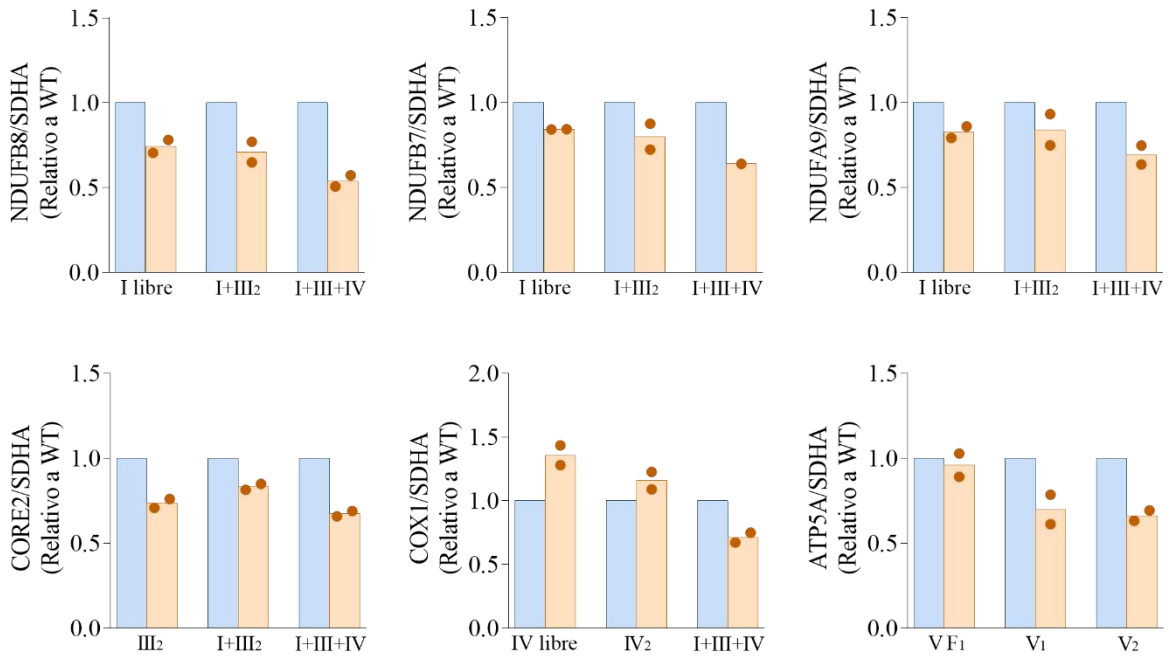
3.1.1. Actividad enzimática de los complejos del sistema OXPHOS.

Se llevó a cabo una determinación de la actividad enzimática de cada uno de los complejos de la CTE, de la ATP sintasa y de la proteína de matriz CS, en homogeneizados totales de corazón de ratones WT y Hq de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal. Debido a la limitación de muestra disponible, se prepararon *pools* por pares, a partir de 8 ratones de cada genotipo, obteniendo así 4 muestras Hq y 4 WT. Las medidas de actividad de los complejos fueron normalizadas por la actividad de CS, que refleja el contenido mitocondrial de cada muestra. Los datos no mostraron diferencias significativas en la actividad de ninguno de los complejos en los ratones Hq respecto a los WT (**Fig.21A**). A continuación, para tener una segunda confirmación de que no existían diferencias de actividad de los complejos CI y CIV —aquellos que se han descrito como afectados principalmente en otros tejidos por la deficiencia de AIF— se midió su actividad en fracciones mitocondriales de ratones de 6 meses de edad. Debido a la limitación de muestra disponible, se preparó un *pool* de fracciones mitocondriales procedentes de 8 ratones WT y otro de 8 ratones Hq. No se observaron diferencias en la actividad del CI y el CIV en los ratones Hq respecto a los WT (**Fig.21B**).

A 1D-BN-PAGE

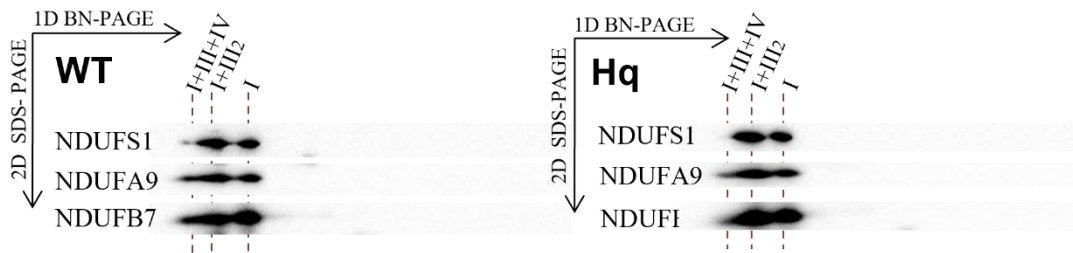


B



C

2D-BN/SDS-PAGE



D

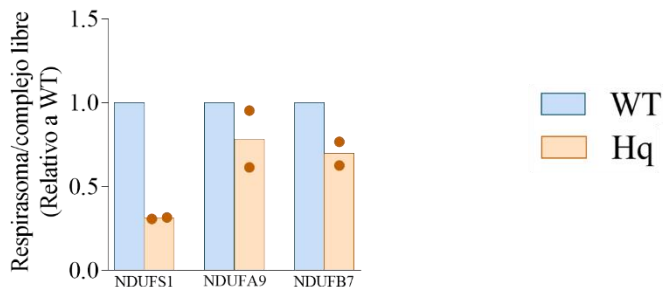
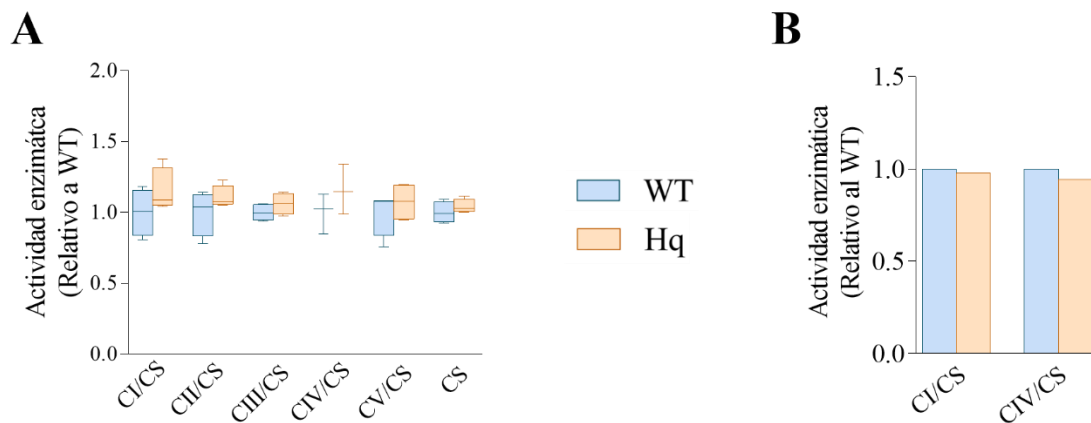


Figura 20. Ensamblaje de supercomplejos OXPHOS en corazón. (A) Electroforesis en condiciones nativas en primera dimensión (1D-BN-PAGE) y posterior inmunodetección con anticuerpos de proteínas representativas de todos los complejos (NDUFB8, NDUFA9, NDUFB7, SDHA, CORE2, COX1 y ATP5A) en fracciones enriquecidas en mitocondrias de corazones de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal. Se muestran las bandas correspondientes al CII, al CIV en su forma monomérica, al CIII y CIV en su forma dimérica, al CI en su forma monomérica, al supercomplejo CI+CIII₂ y al respirasoma (CI+CIII+CIV). (B) Cuantificación de los niveles de cada una de las bandas de la 1D-BN-PAGE. Se representan los datos y la mediana de las dos réplicas técnicas de la muestra Hq, relativizados respecto a la media del grupo WT (n=2 *pools* de 8 ratones cada uno). (C) Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE) y posterior inmunodetección con anticuerpos de las proteínas NDUFB7, NUDFS1 y NDUFA9. Se muestran las bandas correspondientes al CI en su forma monomérica, al supercomplejo CI+CIII₂ y al respirasoma. (D) Cuantificación de la ratio respirasoma/complejo libre de las bandas correspondientes a la detección de las proteínas del CI en la 2D-BN/SDS-PAGE. Se representan los datos y la mediana de las dos réplicas técnicas de la muestra Hq, relativizados respecto a la media del grupo WT (n=2 *pools* de 8 ratones cada uno).



3.1.2. Consumo de O₂ en cardiomiocitos neonatales.

Con el fin de terminar de dilucidar si la deficiencia de AIF causa algún tipo de defecto en la función del sistema OXPHOS en corazón del ratón Hq, se llevó a cabo un análisis del consumo de O₂ a tiempo real mediante respirometría de alta resolución. Para ello, se aislaron y cultivaron cardiomiocitos de ratones neonatales de 3 días de edad, tanto Hq como WT. Se midió el consumo de O₂ en tiempo real (OCR) de forma basal y tras inyecciones sucesivas de oligomicina, FCCP, y una mezcla de rotenona y antimicina A (Fig.22A). Los ensayos no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros calculados (tasa de consumo de O₂ basal, tasa de consumo de O₂ máxima, tasa de consumo de O₂ sensible a oligomicina, respiración no mitocondrial y escape de protones) entre las células Hq y WT (Fig.22B). Además, se midió la tasa de acidificación del medio de cultivo (ECAR), de forma basal y tras la adición de oligomicina y FCCP, sin encontrarse diferencias significativas entre los cardiomiocitos WT y Hq (Fig.22C). Por último, se midieron los niveles de la proteína GAPDH en los ratones del estudio de la

evolución temporal, y no se encontraron diferencias significativas entre los ratones Hq y WT de su misma edad, ni a 2, 3, ni a 6 meses (**Fig.22D**). Por tanto, los datos del ECAR y los niveles de GAPDH indicarían una capacidad glucolítica similar entre los ratones Hq y WT.

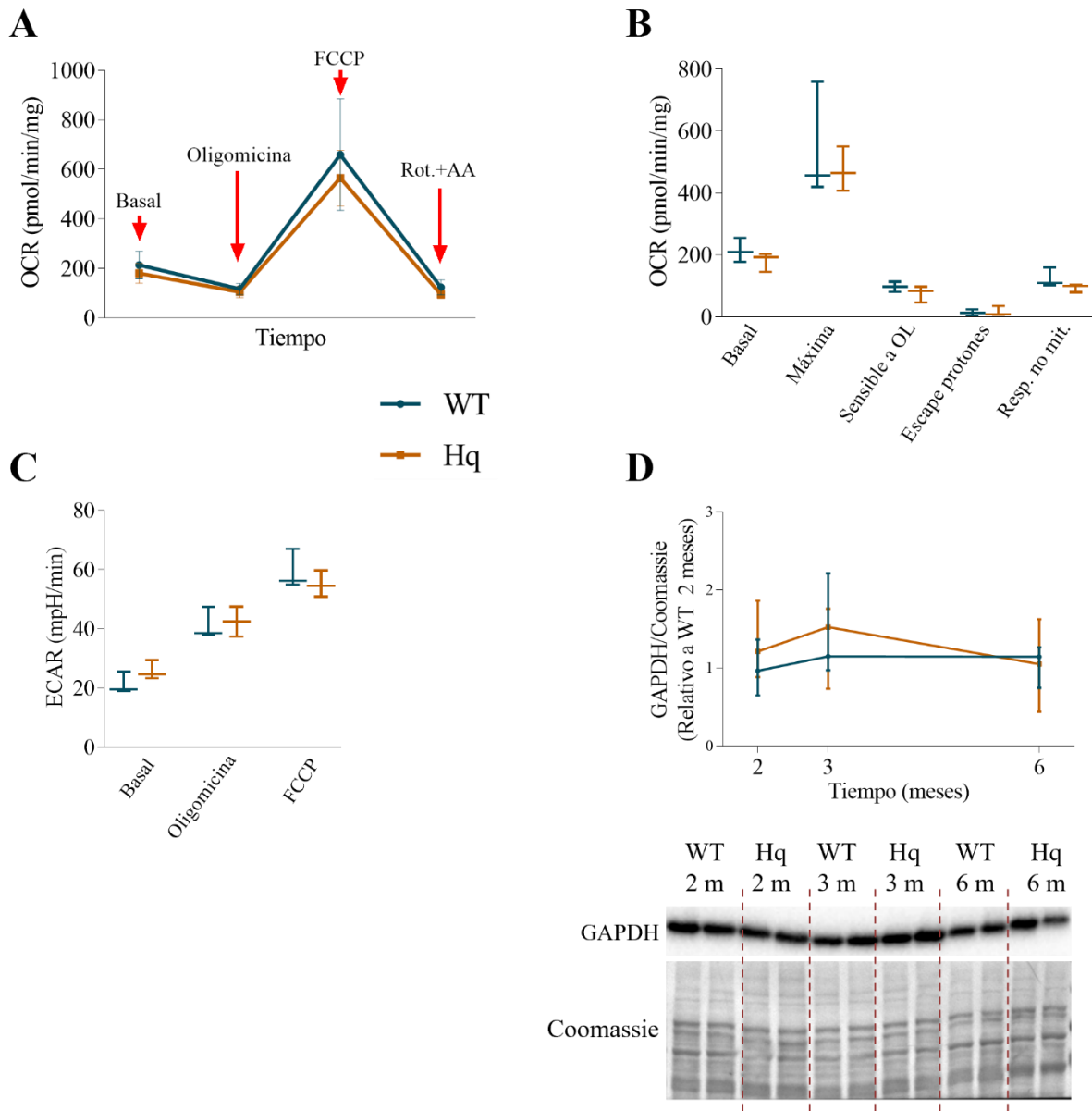


Figura 22. Consumo de oxígeno y acidificación del medio en cardiomiocitos. (A) Tasa de consumo de O₂ (OCR) basal y tras sucesivas inyecciones de oligomicina, FCCP, y rotenona y antimicina A, en cardiomiocitos *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) de ratones neonatales. (B) OCR basal, máxima y sensible a oligomicina (OL), escape de protones y respiración no mitocondrial. (C) Tasa de acidificación del medio (ECAR) basal y tras la adición de oligomicina y FCCP. Todos los parámetros fueron determinados con el Seahorse XF Analyzer, normalizados por la cantidad de proteína por pocillo y expresados como pmol O₂ consumido/min/mg (OCR) o mpH/min (ECAR). (D) Niveles de GAPDH, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: (A), (B) y (C) para cada grupo experimental (n=3 cultivos de cardiomiocitos de ratones diferentes) se representan la mediana, el valor mínimo y máximo. (D) Para cada grupo experimental (n=8 ratones) representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

En resumen, todos los datos obtenidos parecen indicar que no existe un defecto relevante en la síntesis de subunidades de los complejos OXPHOS. Sin embargo, sí se observó un fallo en el ensamblaje del CI y el CIII, tanto en su forma libre como formando parte del supercomplejo I+III₂ y del respirasoma. También parece existir un déficit en el ensamblaje de la ATP sintasa, tanto en su forma monomérica como dimérica. No obstante, este fallo en el ensamblaje de los complejos CI, CIII y CV no parece afectar de forma significativa a su actividad ni a la respiración mitocondrial, así como tampoco indujo un cambio hacia un metabolismo más glucolítico. Por otro lado, el protocolo de entrenamiento no produjo ninguna adaptación en los niveles de ninguna de las proteínas medidas para ninguno de los complejos de la CTE ni de la ATP sintasa.

3.2. Alteraciones en los niveles de aminoácidos y otros metabolitos.

Se midió la concentración de aminoácidos y otros metabolitos en homogeneizados totales de corazón de los ratones sedentarios del estudio de la intervención, mediante cromatografía líquida de alta eficacia. Se observaron niveles más altos en muchos de ellos en los ratones Hq respecto a los WT, siendo los aminoácidos treonina, serina, glicina, alanina, valina, leucina y lisina los que presentaron una mayor diferencia. Esta diferencia solamente resultó estadísticamente significativa en los casos de la treonina, serina, glicina y valina (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de aminoácidos y otros metabolitos presentes en tejido cardíaco de los ratones sedentarios del estudio de la intervención.

Metabolito	[WT] $\mu\text{mol/L}$	[Hq] $\mu\text{mol/L}$	p valor
Fosfoserina	11,5 \pm [8,5-12,0]	13,0 \pm [10,9-13,6]	0,095
Taurina	1549,9 \pm [1349,4-1678,8]	1747,9 \pm [1518,5-1803,5]	0,095
Fosfoetanolamina	20,9 \pm [13,2-23,3]	21,8 \pm [17,9-25,2]	0,548
Urea	206,7 \pm [144,2-245,5]	275,9 \pm [215,1-279,2]	0,095
Treonina	14,3 \pm [12,9-15,6]	22,3 \pm [19,5-25,5]	0,008 **
Serina	17,0 \pm [15,5-17,8]	22,4 \pm [20,1-24,9]	0,016 *
Asparagina	7,9 \pm [3,3-9,4]	9,2 \pm [6,9-11,4]	0,309
Glutamato	192,6 \pm [159,1-227,5]	211,4 \pm [191,5-252,9]	0,309
Glutamina	206,7 \pm [171,4-310,3]	294,9 \pm [234,9-303,3]	0,309
Sarcosina	955,1 \pm [783,3-1136,3]	1269,5 \pm [771,5-1400,0]	0,151
Glicina	24,4 \pm [20,6-26,2]	41,2 \pm [36,6-42,8]	0,007 **
Alanina	131,5 \pm [97,9-158,7]	170,5 \pm [135,3-209,2]	0,095
Citrulina	7,0 \pm [5,5-8,9]	7,1 \pm [6,3-8,0]	0,690
Valina	4,8 \pm [4,2-6,0]	10,4 \pm [7,4-10,5]	0,031 *
Metionina	4,1 \pm [2,9-4,6]	5,2 \pm [3,7-5,5]	0,222
Isoleucina	9,0 \pm [6,8-10,2]	11,6 \pm [9,6-12,2]	0,151
Leucina	13,6 \pm [8,2-13,9]	18,5 \pm [14,1-19,1]	0,056
Tirosina	4,9 \pm [4,2-6,3]	6,5 \pm [5,3-7,0]	0,309

Fenilalanina	5,8 ± [4,8-6,2]	5,2 ± [4,5-6,3]	0,690
Homocisteína	0,6 ± [0,5-0,7]	0,7 ± [0,6-0,8]	0,190
GABA	2,5 ± [1,5-2,7]	0,6 ± [0,4-3,7]	0,486
Amonio	313,9 ± [253,2-345,7]	336,9 ± [288,9-339,2]	>0,99
Ornitina	1,6 ± [0,8-2,3]	2,0 ± [1,5-2,6]	0,413
Lisina	24,4 ± [20,6-25,0]	27,9 ± [23,4-33,3]	0,095
Histidina	7,4 ± [6,7-10,2]	10,0 ± [8,6-11,3]	0,222
Arginina	16,2 ± [13,1-18,0]	17,8 ± [16,5-22,0]	0,309
N-leucina	6,9 ± [3,7-16,8]	12,6 ± [9,9-32,4]	0,393

Los datos se expresan como la mediana ± el rango intercuartílico de los distintos metabolitos para cada grupo experimental (n=5 ratones). Se muestra el p valor de cada comparación entre los grupos WT y Hq para cada metabolito (test U de Mann Whitney; * p<0,05; ** p<0,01).

3.3. Alteraciones del grupo hemo.

El análisis proteómico realizado en el corazón de los ratones del estudio de la intervención permitió detectar niveles alterados de algunas proteínas relacionadas con la biosíntesis y el transporte del grupo hemo en los animales Hq. Diferentes subunidades de la hemoglobina —concretamente las subunidades HBA-A1, HBA, HBB-B1, HBB-B2 y HBB-BS—mostraron unos niveles menores en los ratones Hq sedentarios que en los WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S4**). A la vista de estos datos, se decidió validar los niveles de hemoglobina β mediante *western blot*. Aunque las diferencias encontradas no resultaron significativas, se vio una tendencia (p=0,08 a 3 meses) a presentar unos niveles menores de hemoglobina β en los ratones Hq respecto a los WT a partir de los 3 meses de edad (**Fig.23A**). Además, se midieron los niveles de ARNm de la *Mioglobina* en ratones de 2 y 6 meses, encontrándose en ambos casos unos niveles menores en los ratones Hq respecto a los WT, aunque la diferencia únicamente resultó significativa a 6 meses (**Fig.23B**). Además, el estudio proteómico también indicó alteraciones en otras proteínas relacionadas con la biosíntesis y el transporte del grupo hemo y el hierro. Concretamente, se vieron unos niveles menores de ferroquelatasa (FECH), unos niveles mayores de hemopexina (HPX) y unos niveles mayores de serotransferrina (TF) en los ratones Hq sedentarios que en los WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S4**).

Por otro lado, el análisis proteómico de las modificaciones oxidativas realizado en ratones WT y Hq de 6 meses de edad permitió detectar algunas diferencias en los niveles de oxidación de cisteínas entre ambos grupos experimentales en algunas de estas proteínas. Concretamente, se observó mayor oxidación (detectada como carbamidometilación) de 7 residuos cisteína de la serotransferrina en los ratones Hq comparados con los WT, siendo la ratio de cambio de hasta 30 veces mayor en uno de los residuos en los ratones Hq (material suplementario, **Tabla S8**). Se encontraron también unos niveles mayores de oxidación en 3 residuos cisteína de la hemopexina, así como en un residuo cisteína de la ceruloplasmina, en los ratones Hq que en los WT (material suplementario, **Tabla S8**).

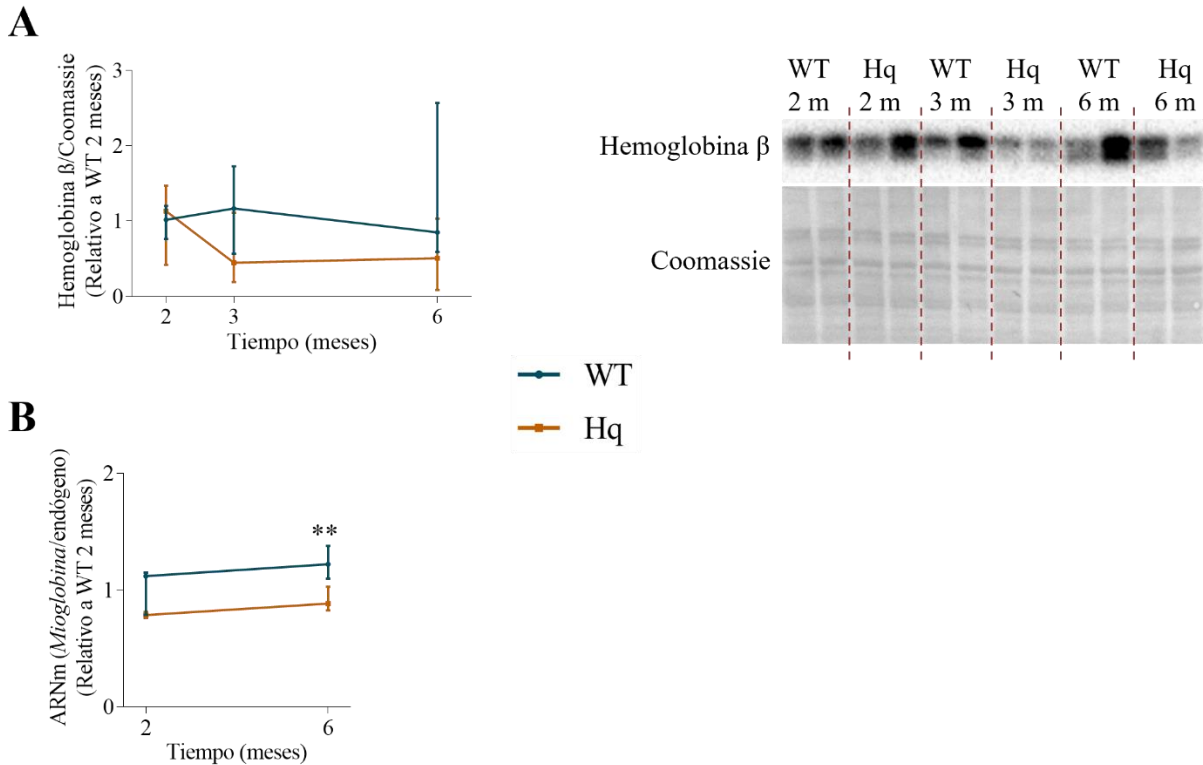


Figura 23. Alteraciones del grupo hemo. (A) Niveles de hemoglobina β medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). (B) Niveles de ARNm de *Mioglobina* medidos mediante QuantiGene Plex en corazón de ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total de su carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental ([A] n=8 ratones; [B] n=5-6 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses y, además, en (B) respecto a la expresión de genes endógenos. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

Por último, el estudio proteómico realizado en los ratones del estudio de la intervención sugirió que el ejercicio físico podría tener algún efecto sobre los niveles de las subunidades HBB-B1 y HBB-B2 de la hemoglobina. Concretamente, los ratones Hq entrenados mostraron unos niveles mayores de estas dos proteínas, en comparación con los Hq sedentarios, aproximándose así a los niveles de los ratones WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S4**). Sin embargo, se requiere una validación mediante otra técnica cuantitativa para confirmar esta posibilidad.

En conclusión, todos estos datos apuntan a que los ratones Hq sufren una disminución de los niveles de hemoglobina y mioglobina en corazón. Los niveles más bajos de ferroquelatasa en los ratones Hq sugieren un impedimento en la correcta formación del grupo hemo en la mitocondria, lo cual podría ser la causa de estas alteraciones. Por otro lado, el ejercicio físico podría tener un potencial efecto en el rescate de los niveles de la hemoglobina, como se observa para el caso de las subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ de la hemoglobina, aunque este efecto debe ser confirmado mediante análisis complementarios.

3.4. Estrés oxidativo.

La existencia de estrés oxidativo como consecuencia de la deficiencia de AIF, así como la posible función antioxidante de AIF, siguen siendo motivo de debate hoy en día. Existen datos muy variables en torno a si la deficiencia de AIF conduce a una mayor producción de ROS y/o estrés oxidativo, lo que parece depender, entre otras cosas, del modelo empleado y del tipo celular estudiado. Dada la divergencia en los datos, en esta tesis doctoral se estudió la posible presencia de estrés oxidativo en corazón del ratón Hq, así como los efectos que el ejercicio físico podría tener sobre éste.

3.4.1. Niveles de proteínas antioxidantes.

Gracias al estudio proteómico realizado en los ratones del estudio de la intervención, se observaron algunas proteínas antioxidantes —concretamente las peroxirredoxinas 1, 3, 5 y 6; y la SOD2— cuyos niveles eran moderadamente mayores en los ratones Hq sedentarios que en los WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S5**).

Para validar alguno de los cambios observados en la proteómica, se midieron por *western blot* los niveles de SOD1, SOD2, PRDX6 y catalasa en los ratones del estudio de la evolución temporal. No se encontraron diferencias significativas entre los ratones Hq y WT en los niveles de catalasa, SOD1 y SOD2 a 2, 3 y 6 meses de edad (**Fig.24A**). Sin embargo, sí se observaron unos niveles mayores de PRDX6 en los ratones Hq que en los WT, siendo estadísticamente significativa la diferencia a 3 meses de edad (**Fig.24A**). Además, en el estudio proteómico de las modificaciones oxidativas en cisteínas, se detectó un aumento en la oxidación del residuo Cys47 de la PRDX6 en los animales Hq —localizada en el sitio catalítico y que es crítica para la actividad enzimática (196)—, que implicaría un mayor grado de oxidación de la misma (material suplementario, **Tabla S9**). Además, se observaron en los ratones Hq unos niveles superiores de albúmina (material suplementario, **Tabla S5**) —principal proteína de la sangre, que es capaz de oxidarse cuando hay un exceso de ROS, evitando así que éstas oxiden a otras proteínas—, así como de oxidación en múltiples residuos de cisteínas de la albúmina (material suplementario, **Tabla S9**). Por otro lado, se midieron los niveles de ARNm de *Nrf2*, factor de transcripción que regula la expresión de proteínas antioxidantes, y no se encontraron diferencias entre los ratones Hq y WT ni a 2 ni a 6 meses de edad (**Fig.24B**).

3.1.1. Actividad catalasa.

Puesto que las peroxirredoxinas funcionan como sensores de peróxidos lipídicos y H_2O_2 , un aumento en los niveles de PRDX6 en corazón Hq podría estar indicando la presencia de una mayor cantidad de H_2O_2 . Por esta razón, se midió la actividad de la catalasa —principal enzima que descompone el H_2O_2 — en homogeneizados totales de corazón de ratones Hq y WT de 6 meses. Los resultados mostraron unos niveles significativamente menores de actividad catalasa en los ratones Hq respecto a los WT (**Fig.25A**).

Resultados

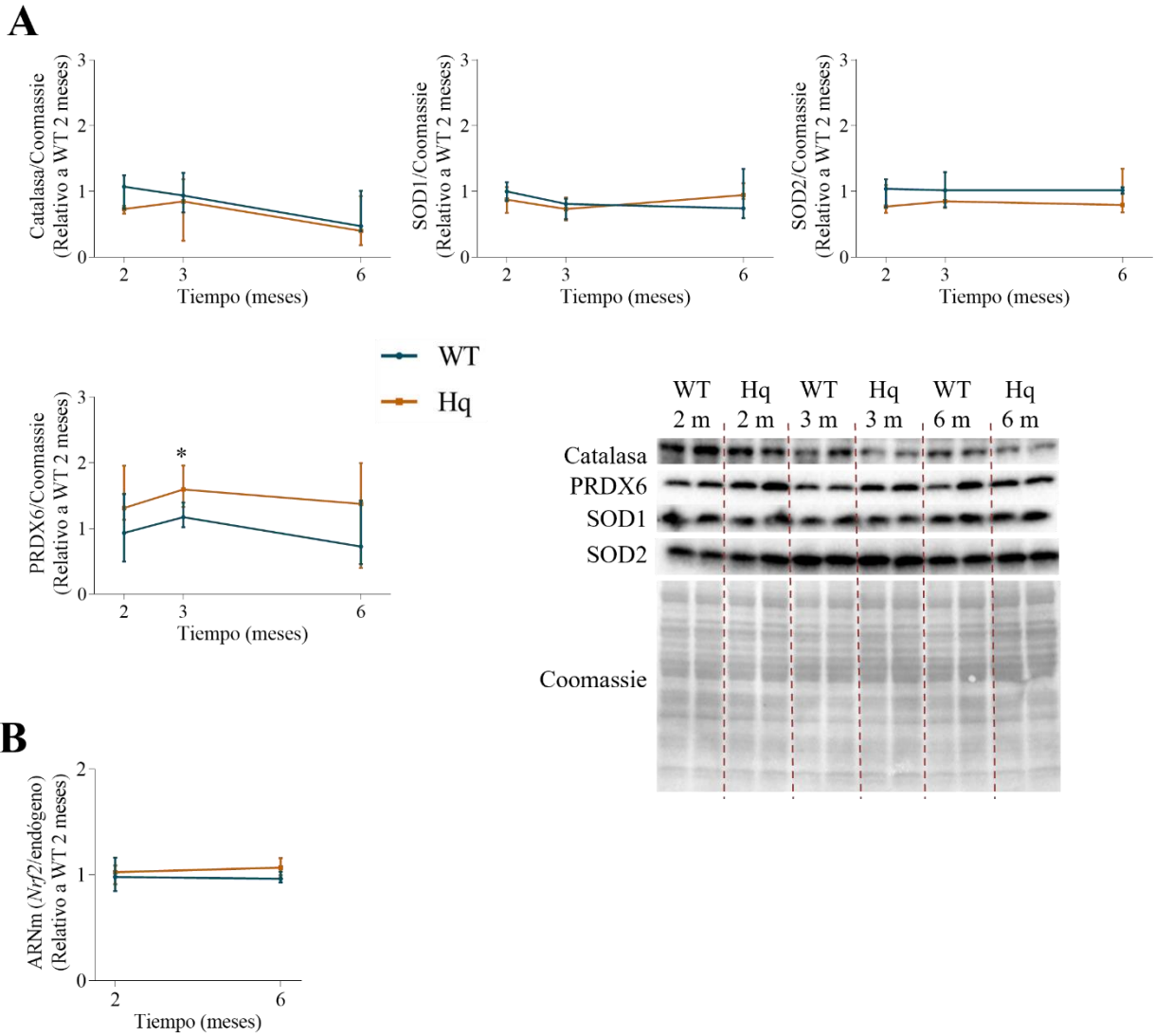


Figura 24. Proteínas antioxidantes en corazón. (A) Niveles de catalasa, SOD1, SOD2 y PRDX6 medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). **(B)** Niveles de ARNm de *Nrf2* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total de su carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (**[A]** n=8 ratones; **[B]** n=5-6 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses y, además, en **(B)** respecto a la expresión de genes endógenos. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

Resultados

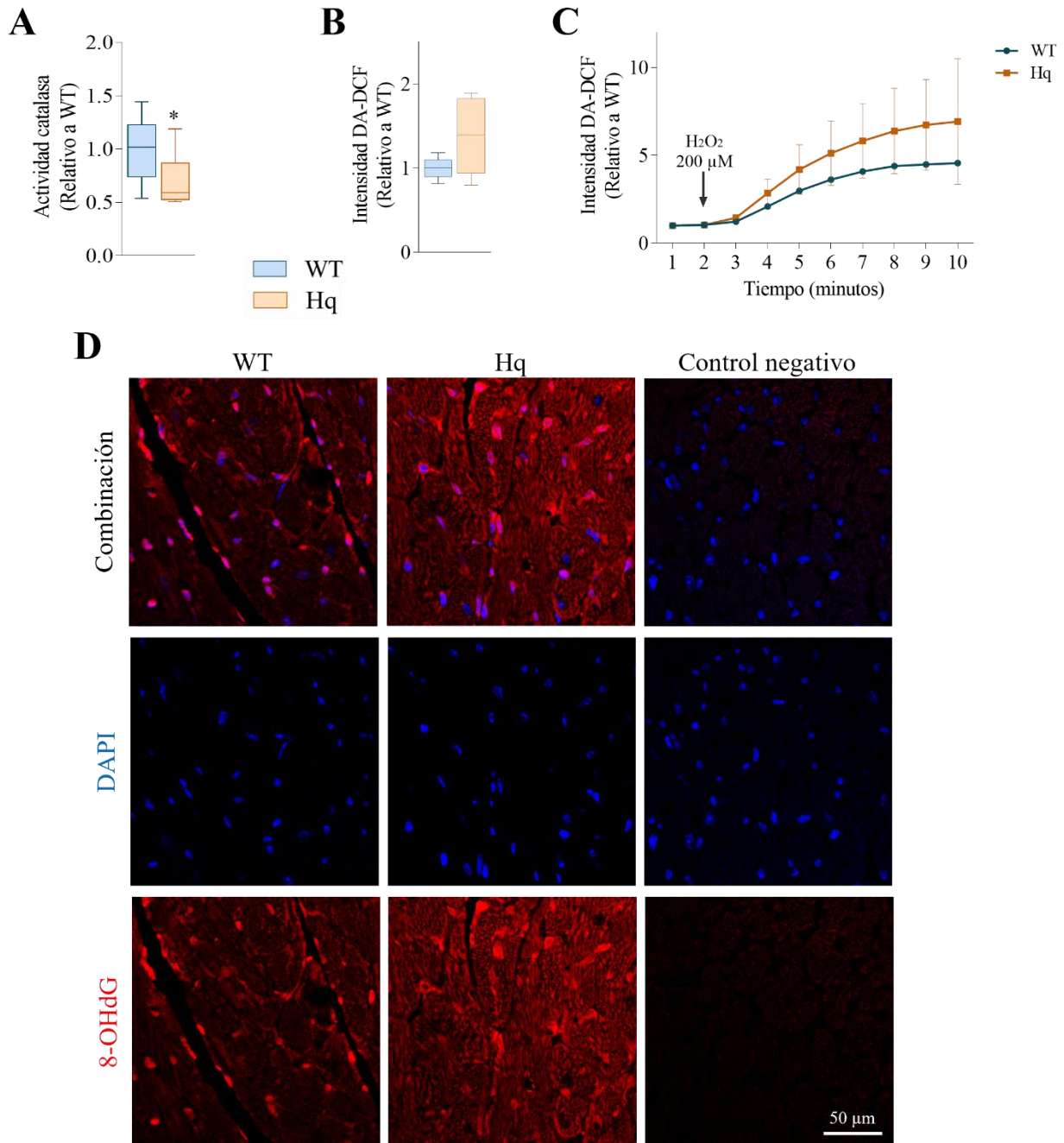


Figura 25. Actividad catalasa y niveles de ROS en corazón. (A) Actividad catalasa en homogeneizados de corazón de ratones WT y Hq de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal. (B) Intensidad de fluorescencia de la sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DA-DCF) en cardiomiocitos en cultivo de ratones neonatales Hq y WT de 3 días de edad, medida mediante microscopía confocal con el *software* ImageJ (objetivo 40x). (C) Intensidad de fluorescencia media de DA-DCF en cardiomiocitos tras la adición de H₂O₂ medida mediante microscopía confocal con el *software* Zen Zeiss Lite (objetivo 40x). (D) Detección de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), mediante inmunofluorescencia, y núcleos (DAPI, azul), en cortes de tejido cardíaco de ratones WT y Hq sedentarios del estudio de la intervención (objetivo 40x). **Datos:** (A) y (B) para cada grupo experimental ([A] n=8 ratones; [B] n=5 cultivos de cardiomiocitos de ratones diferentes) se representan la mediana y el rango intercuartílico. (C) para cada grupo experimental (n=5 cultivos de cardiomiocitos de ratones diferentes) se representan la media y la desviación estándar. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT. **Estadística:** *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

3.1.2. Detección de ROS en cardiomiocitos.

Para poder observar si los corazones de ratones Hq contenían una mayor cantidad de ROS que los WT, se añadió la sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DA-DCF, que emite fluorescencia cuando es oxidada por las ROS) en cultivos de cardiomiocitos aislados de ratones neonatales, y se midió la fluorescencia emitida por la sonda en el microscopio confocal. No se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia basal entre los cardiomiocitos WT y Hq (**Fig.25B**). A continuación, con el objetivo de forzar la actividad de las enzimas antioxidantes, se añadió H₂O₂ 200 µM y se midió la fluorescencia emitida por la sonda oxidada durante 8 minutos. Se observó una tendencia en los cardiomiocitos Hq a presentar una mayor intensidad de fluorescencia que los WT, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa (**Fig.25C**). Esta tendencia sugirió que las enzimas antioxidantes en los cardiomiocitos Hq podrían tener una menor capacidad de eliminar ROS que las de cardiomiocitos WT, lo cual apoyaría los menores niveles de actividad catalasa encontrados en corazones de ratones Hq.

3.1.3. Estrés oxidativo en el ADN.

Se llevó a cabo la detección de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), que indica la presencia de estrés oxidativo en el ADN, mediante inmunofluorescencia en tejido cardíaco de ratones WT y Hq de 6 meses de edad. No se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia presente en los núcleos celulares. Sin embargo, sí se observó una mayor intensidad de fluorescencia localizada fuera de los núcleos celulares en los ratones Hq respecto a los WT, que podría sugerir un mayor estrés oxidativo en el ADN mitocondrial (**Fig.25D**).

3.1.4. Efectos del entrenamiento sobre el estrés oxidativo.

El estudio proteómico no mostró diferencias notables por efecto del entrenamiento en los niveles de las proteínas antioxidantes mencionadas anteriormente, ni en el caso de los ratones Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios, ni en el de los WT entrenados respecto a los WT sedentarios (material suplementario, **Tabla S5**). Para confirmar que el ejercicio físico no producía ningún efecto sobre el nivel de estrés oxidativo en el corazón, se midieron los niveles de catalasa, PRDX6, SOD1 y SOD2 en los ratones del estudio de la intervención. No se observaron cambios significativos entre los ratones entrenados y sedentarios, ni en el caso de los Hq ni en el de los controles, para ninguna de las proteínas analizadas (**Fig.26A**). Únicamente se detectaron niveles significativamente más altos de PRDX6 en ambos grupos de animales Hq respecto a los WT sedentarios, similar a lo que se había observado en el estudio de la evolución temporal a los 6 meses de edad.

Resultados

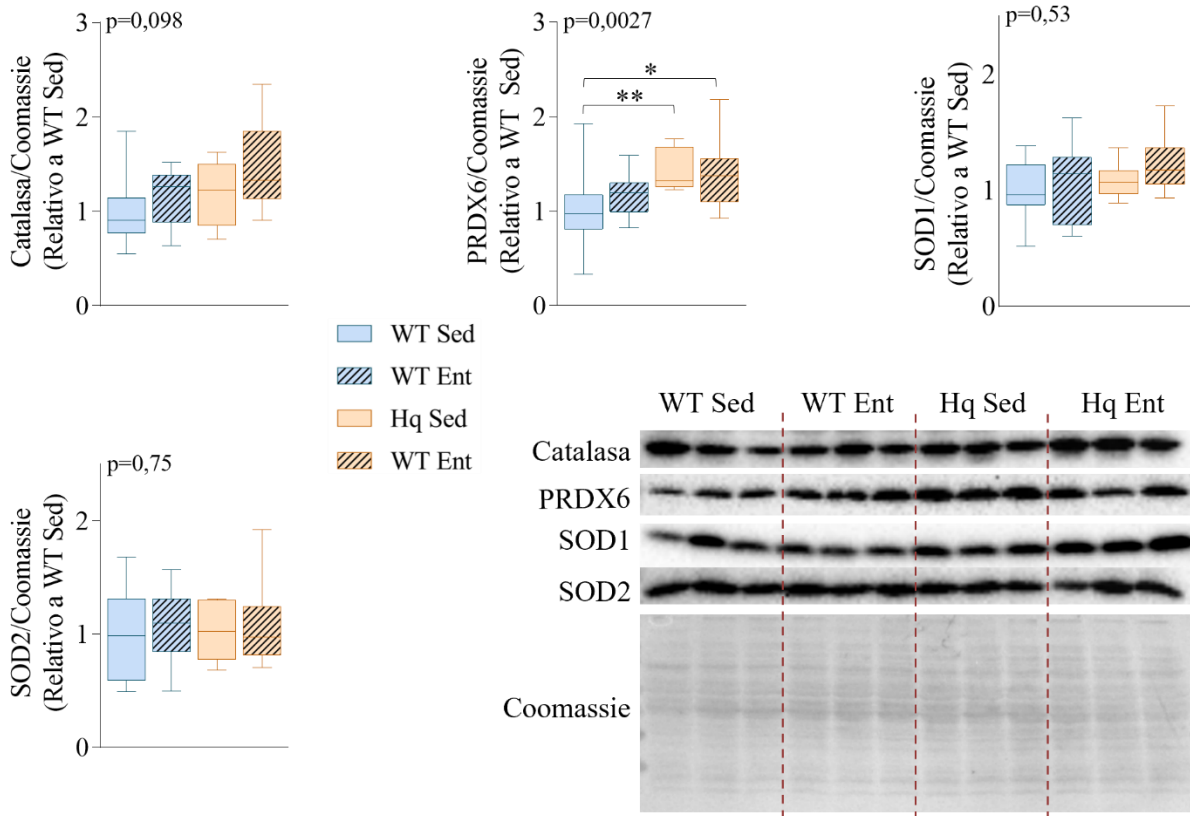


Figura 26. Efectos del entrenamiento sobre el estrés oxidativo en corazón. Niveles de catalasa, PRDX6, SOD1 y SOD2 medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en cada gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

En conclusión, los ratones Hq presentaron unos niveles mayores de PRDX6 en corazón, y una mayor oxidación de su centro activo. Esto, junto a la tendencia a una mayor oxidación de la sonda diclorofluoresceína en cardiomiocitos tratados con H₂O₂, la menor actividad de la enzima catalasa, el mayor nivel de oxidación de la albúmina en numerosos residuos de cisteína, y la mayor intensidad de fluorescencia de 8-OHdG en las mitocondrias, apuntaría hacia la existencia de estrés oxidativo en el corazón Hq. Por último, el entrenamiento no indujo cambios sobre los niveles de las enzimas antioxidantes en ninguno de los genotipos, por lo que se puede descartar que favorezca el estrés oxidativo del corazón en el modelo.

3.2. Fenotipo de la maquinaria contráctil cardiaca.

A partir del estudio proteómico realizado en los ratones del estudio de la intervención, se pudieron identificar alteraciones en diversas proteínas relacionadas con la estructura y función de los sarcómeros en la contracción cardiaca, entre las que se encontraban diferentes actinas, miosinas y troponinas. Todas ellas mostraron unos niveles considerablemente menores en los ratones Hq sedentarios respecto a los WT sedentarios. Por otro lado, los niveles detectados en ratones entrenados respecto a los sedentarios de su mismo genotipo no sugirieron ningún efecto del entrenamiento (material suplementario, **Tabla S6**).

Para validar alguno de los cambios detectados en el estudio proteómico, se midieron por *western blot* los niveles de tres proteínas de los sarcómeros (MYL3 [isoforma 3 de la cadena ligera de la miosina, *myosin light chain 3*], TNNI3 [troponina I cardiaca, *troponin I cardiac muscle*] y TNNC1 [troponina C1 cardiaca y de músculo lento, *troponin C, slow skeletal and cardiac muscles*]) en los ratones del estudio de la intervención. En los tres casos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el test estadístico principal (p valor = 0,0006; 0,0002; y 0,0071, respectivamente) entre los grupos experimentales. Además, el test estadístico *post hoc* indicó unos niveles menores en los ratones Hq sedentarios respecto a los WT sedentarios en el caso de las troponinas I y C1. Por otro lado, el entrenamiento no produjo ningún cambio significativo de los niveles de estas proteínas en los ratones Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios, aunque se detectó menos MYL3 y troponina C1 en corazón de los ratones Hq entrenados frente a ambos grupos de ratones WT. Además, se observaron unos niveles menores en los ratones WT entrenados respecto a los WT sedentarios para la troponina I (**Fig.27A**).

Sorprendentemente, cuando se midieron los niveles de estas mismas proteínas en el grupo de ratones del estudio de la evolución temporal, los hallazgos encontrados fueron distintos para la troponina C1 y la troponina I. A los 2 meses de edad, los niveles de troponina C1 y troponina I eran similares en los ratones Hq y en los WT. En cambio, a los 3 meses de edad, los ratones Hq presentaron unos niveles significativamente mayores de estas proteínas que los WT de su misma edad. Esta diferencia se mantuvo a los 6 meses, aunque no resultó estadísticamente significativa (**Fig.27B**). Por último, los niveles de MYL3 sí resultaron ser menores en los ratones Hq respecto a los WT a todas las edades, tal y como se había visto en los ratones del estudio de la intervención, aunque la diferencia fue significativa únicamente a 3 meses (**Fig.27B**).

En resumen, los ratones Hq mostraron alteraciones en algunas proteínas relacionadas con la estructura y la función de los sarcómeros durante la contracción cardiaca. Sin embargo, dichas alteraciones fueron diferentes en los ratones del estudio de la intervención y de la evolución temporal. Así, en los primeros se observó un déficit en las proteínas MYL3, troponina I y troponina C1; mientras que en los segundos se encontró un déficit de MYL3 y un aumento de troponina I y troponina C1. Por otro lado, el entrenamiento no indujo ningún cambio significativo en los niveles de estas proteínas en los ratones Hq.

Resultados

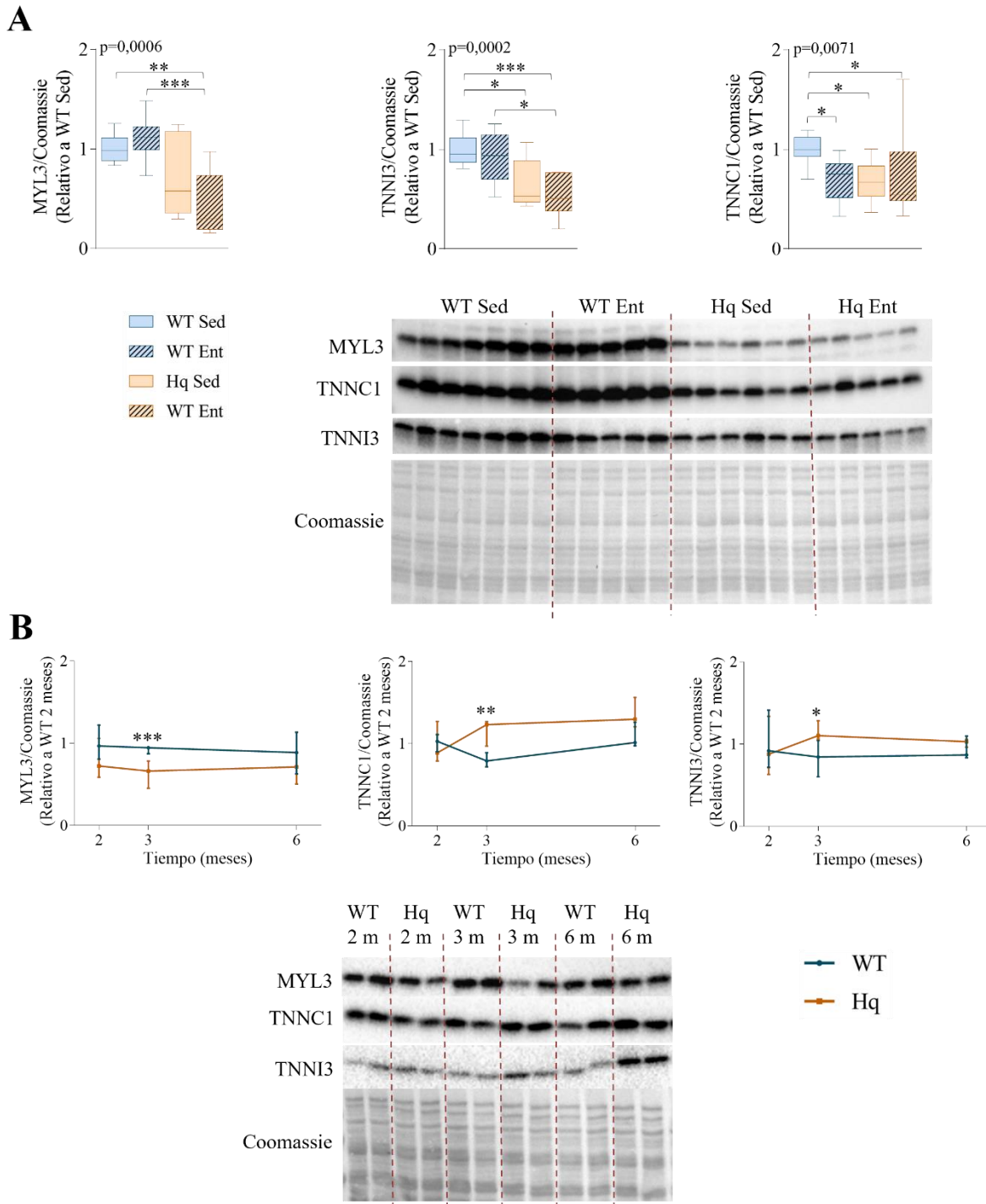


Figura 27. Proteínas de la maquinaria contráctil cardíaca. (A) Niveles de MYL3, TNNC1 y TNNI3, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. (B) Niveles de MYL3, TNNC1 y TNNI3, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). **Densitometría:** el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. **Datos:** (A) para cada grupo experimental (n=10-12) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. (B) para cada grupo experimental (n=8 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed (A) o WT de 2 meses (B). **Estadística:** (A) se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en cada gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ para pares significativamente distintos). (B) * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

3.3. Estudio de los flujos de Ca^{2+} intracelular.

3.3.1. Manejo del Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos ventriculares adultos.

Con el fin de averiguar si los cardiomiocitos ventriculares adultos de los ratones Hq podían presentar alteraciones en el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción (E-C), se realizó un estudio del manejo del Ca^{2+} intracelular en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratones WT y Hq de 6 meses de edad. Este estudio fue llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Dra. Gema Ruiz Hurtado, del laboratorio de Investigación Traslacional en Hipertensión y Enfermedad Cardiorrenal del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre.

En primer lugar, para estudiar si existían alteraciones durante la sístole o contracción de los cardiomiocitos, se midió la liberación transitoria de Ca^{2+} intracelular en los cardiomiocitos marcados con la sonda Fluo-3AM y tras ser estimulados eléctricamente a una frecuencia de 2 Hz. Tras el análisis de las imágenes de las ondas transitorias de Ca^{2+} obtenidas mediante microscopía confocal, no se observaron diferencias en la liberación transitoria del Ca^{2+} intracelular entre los cardiomiocitos Hq y WT (**Fig.28A**). Además, se midió la constante de tiempo de recaptación del Ca^{2+} de nuevo hacia el RS (parámetro *Tau*) a través del análisis de la caída de la fluorescencia tras la estimulación eléctrica, y se observó un aumento significativo de ésta, lo que indica que la recaptación del Ca^{2+} hacia el RS estaba teniendo lugar de forma más lenta en los cardiomiocitos Hq, en comparación a los WT, si bien la diferencia fue moderada (**Fig.28B**). A continuación, para determinar la capacidad máxima de almacenar Ca^{2+} que posee el RS (también conocida como la carga total de Ca^{2+} del RS), los cardiomiocitos se perfundieron con cafeína 10 mM, con el fin de promover la liberación máxima de Ca^{2+} por los RYRs al deplecionar el RS de Ca^{2+} . Tras el análisis de las imágenes obtenidas, se determinó una cantidad total de Ca^{2+} dentro del RS significativamente menor en los cardiomiocitos Hq, en comparación con los WT (**Fig.28C**). Este hallazgo, que indicaría una menor carga de Ca^{2+} en el interior del RS, podría deberse a un incremento de la fuga de Ca^{2+} desde el RS durante la diástole a través de los RYRs.

Para estudiar la actividad de los RYRs durante la diástole o en el estado de relajación de los cardiomiocitos, se registraron los *sparks* de Ca^{2+} (eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} que ocurren de forma rápida, breve y localizada, a través de los RYRs) en los cardiomiocitos en reposo (**Fig.28D**). Se observó que los cardiomiocitos Hq presentaban una frecuencia significativamente mayor de *sparks* de Ca^{2+} que los WT (**Fig.28E**). A continuación, se infirió la cantidad total de Ca^{2+} que se libera en cada célula mediada por *sparks*, a partir de los datos de la frecuencia de *sparks*, así como sus características biofísicas (amplitud, duración y anchura de los *sparks*). Se observó que los cardiomiocitos Hq liberaban una cantidad significativamente mayor de Ca^{2+} que los WT (**Fig.28F**). Esto podría estar indicando, bien un mayor número de agrupaciones de RYRs liberando Ca^{2+} , bien un aumento de la propensión de las agrupaciones de RYRs a liberar Ca^{2+} de forma repetitiva, o ambos. Por lo tanto, se analizaron los sitios de liberación de Ca^{2+} y se observó que los cardiomiocitos Hq presentaban una cantidad significativamente mayor de sitios de disparo o, lo que es lo mismo, donde tienen lugar los *sparks*,

comparados con los cardiomiocitos WT (**Fig.28G**). Además, la probabilidad de que estos sitios se abran más veces y liberen más *sparks* —debido a que poseen agrupaciones de RYRs más activas— fue mayor en los cardiomiocitos Hq que en los WT (**Fig.28H**). En este sentido, se midió el máximo número de *sparks* que se producen en el mismo sitio y se observó que era significativamente mayor en los cardiomiocitos Hq que en los WT (**Fig.28I**).

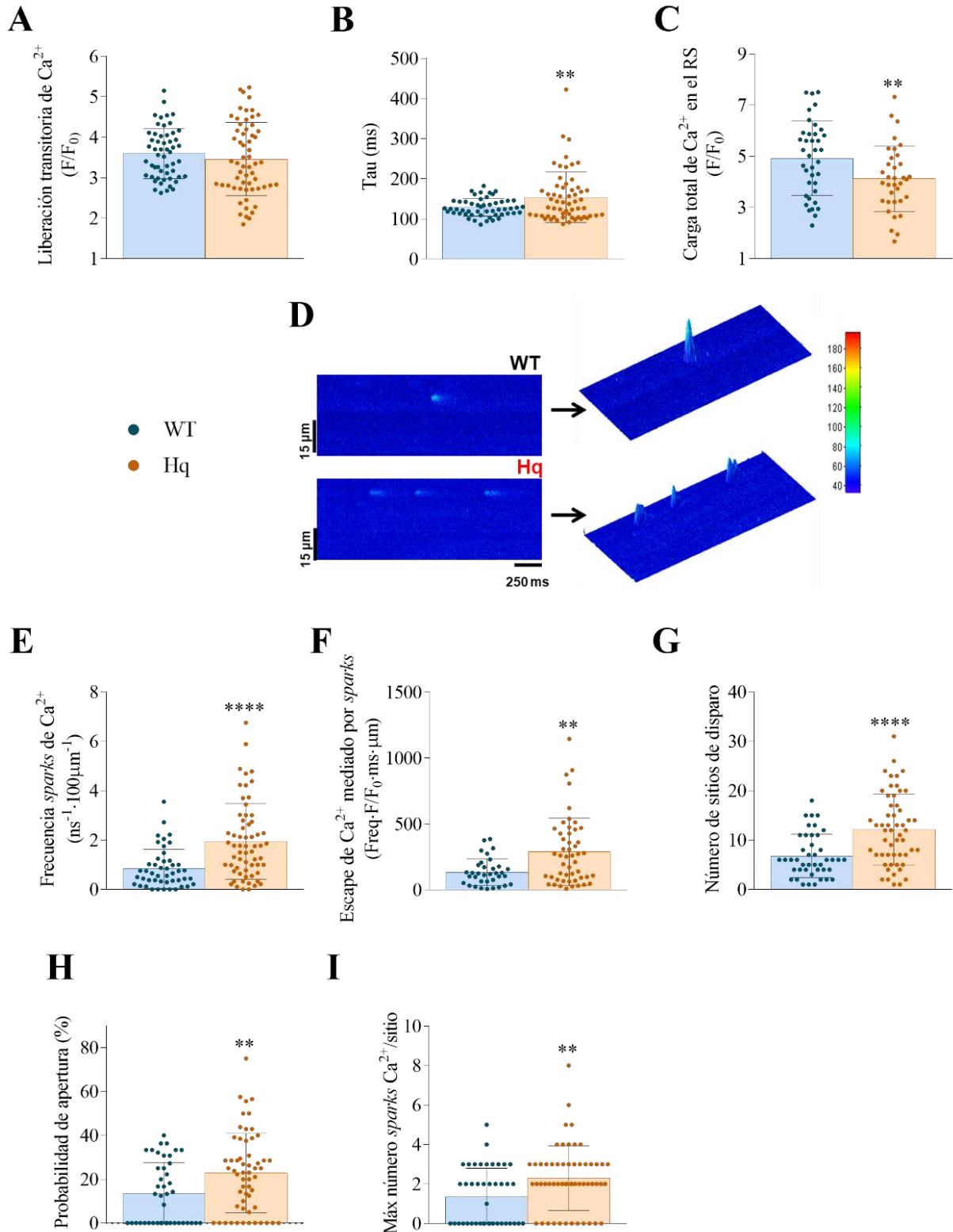


Figura 28. Manejo del Ca^{2+} en cardiomiocitos ventriculares adultos *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq). (A) Valores de amplitud de la liberación de Ca^{2+} intracelular transitoria tras un estímulo eléctrico de 2 Hz. (B) Constante de caída de la fluorescencia (Tau) medida como tiempo de recaptación del Ca^{2+} citosólico al interior del retículo sarcoplásmico en milisegundos (ms). (C) Valores de amplitud de la liberación de Ca^{2+} intracelular tras perfundir con cafeína 10 mM los cardiomiocitos. (D) Imágenes representativas que muestran los *sparks* de Ca^{2+} (a la izquierda) registrados en cardiomiocitos en reposo sin estimulación, y sus correspondientes proyecciones tridimensionales en gráficos de superficie (a la derecha). (E) Frecuencia de *sparks* de Ca^{2+} en cardiomiocitos en reposo. (F) Cantidad total de Ca^{2+} que se libera en cada célula mediada por *sparks*, a partir de los datos de frecuencia, amplitud, duración y anchura de los *sparks*. (G) Número de sitios en los que fueron registrados *sparks* de Ca^{2+} en un mismo cardiomiocito y durante el mismo periodo de tiempo. (H) Probabilidad de apertura repetitiva de los sitios de disparo de *sparks* de Ca^{2+} en cada cardiomiocito. (I) Máximo número de *sparks* de Ca^{2+} registrados en el mismo sitio de disparo. Datos: cada punto representa un cardiomiocito. En total, se midieron 47 células de 4 ratones WT y 62 células de 4 ratones Hq de 6 meses de edad. Estadística: se utilizó el test t de Student para comparar cada grupo experimental con su control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ Hq significativamente distinto del grupo WT.

3.3.2. Niveles de proteínas implicadas en los flujos de Ca^{2+} intracelular.

Con el fin de apoyar los resultados obtenidos en el estudio del manejo de Ca^{2+} intracelular implicado en el acoplamiento E-C, se midieron por *western blot* los niveles de algunas proteínas relacionadas con este proceso en los ratones del estudio de la evolución temporal. Se cuantificaron los niveles de RYR2 (isoforma predominante del RYR en corazón) y se comprobó que éstos eran mayores en los ratones Hq respecto a los WT a todas las edades, siendo estadísticamente significativa la diferencia únicamente a 3 meses de edad (**Fig.29A**). Además, para verificar si estos receptores estaban en un estado más activo, se midieron los niveles de RYR2 fosforilado en el residuo Ser2814, sitio específico de fosforilación de la CaMKII (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II*). Se encontraron mayores niveles de RYR2 fosforilado en los ratones Hq respecto a los WT, siendo estadísticamente significativa la diferencia a 2 y 6 meses de edad (**Fig.29A**). Asimismo, se midieron los niveles de ARNm de *Ryr2* y se vio que eran menores en los ratones Hq respecto a los WT a 2 y 6 meses de edad, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa en ningún caso (**Fig.29B**). Por otro lado, se determinaron los niveles de FKBP12 (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP12*), un regulador positivo de RYR2, y se observó que eran mayores en los ratones Hq que en los WT, siendo estadísticamente significativa la diferencia únicamente a 2 meses de edad (**Fig.29A**).

La diástole se produce mayoritariamente gracias a la recaptación de Ca^{2+} de nuevo al RS a través de la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP, SERCA2 (*Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*). Se midieron los niveles de SERCA2 y se encontró que eran mayores en los ratones Hq respecto a los WT a todas las edades, siendo estadísticamente significativa la diferencia a 2 meses de edad y disminuyendo a lo largo del tiempo (**Fig.29A**). Sin embargo, los niveles de ARNm de *Serca2* a 2 y 6 meses de edad resultaron ser menores en los ratones Hq respecto a los WT, siendo estadísticamente significativa la diferencia solo a 2 meses (**Fig.29B**). Por último, se llevó a cabo una medida de la actividad enzimática de SERCA2 en homogeneizados proteicos de ratones de 6 meses de edad, y se comprobó que la actividad era significativamente mayor en los ratones Hq que en los WT (**Fig.29C**).

Por otro lado, en el estudio proteómico realizado en los ratones del estudio de la intervención, se detectaron algunas proteínas relacionadas con el manejo de Ca^{2+} durante la contracción cardiaca, cuyos niveles sugerían una posible alteración en los ratones Hq. Concretamente, en ratones Hq se encontraron

mayores niveles de calsequestrina (CASQ2), sorcina (SRI), S100A11 y calreticulina (CALR); y unos menores niveles de juntofilina 2 (FPH2) (material suplementario, **Tabla S7**).

Por último, gracias al estudio proteómico de las modificaciones oxidativas postraduccionales, se observaron mayores niveles de oxidación en cisteínas de algunas proteínas implicadas en el manejo de Ca^{2+} en los ratones Hq respecto a los WT. En concreto, se observaron niveles mayores de oxidación en 2 residuos de cisteína en la calnexina (CANX, chaperona con funciones en el plegamiento y control de proteínas en el RS); en 2 residuos de cisteína en la calreticulina; y en 2 residuos de cisteína en la sarcalumenina (SRL, proteína que actúa como un tampón de Ca^{2+} en el RS) (material suplementario, **Tabla S10**). Finalmente, se detectó aproximadamente la mitad de tioles reducidos (detectados como modificación por n-etilmaleimida) en el residuo Cys498 de la proteína SERCA 2 en los ratones Hq respecto a los WT, lo que equivaldría a un mayor nivel de oxidación en este residuo (material suplementario, **Tabla S10**).

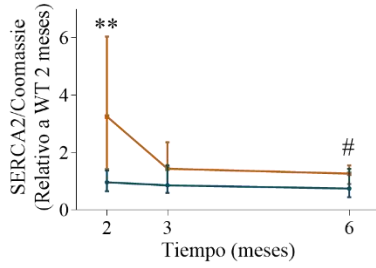
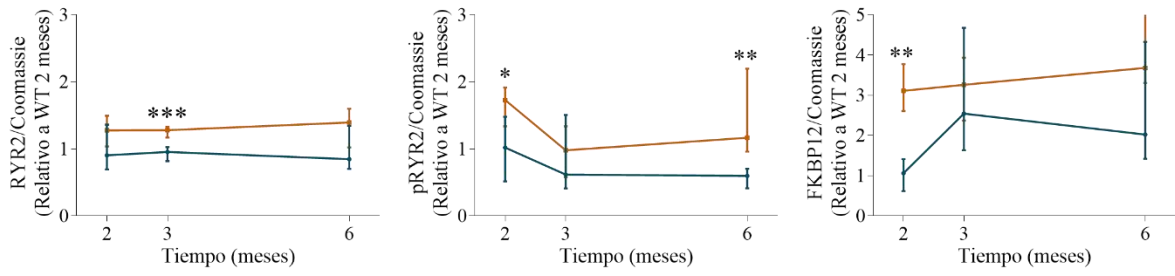
3.1.1. Efectos del entrenamiento sobre el manejo de Ca^{2+} .

Por último, con el objetivo de saber si el ejercicio físico ejercía algún efecto sobre los niveles de proteínas relacionadas con el manejo de Ca^{2+} en el ratón Hq, se midieron por *western blot* los niveles de RYR2 y SERCA2 en los ratones del estudio de la intervención. En ambos casos, el análisis estadístico principal mostró diferencias significativas entre los grupos (p valor = 0,028 y 0,048, respectivamente). No obstante, el análisis *post hoc* no indicó diferencias significativas entre los ratones sedentarios y entrenados, ni en el caso de los Hq ni en el de los controles, aunque sí se pudo apreciar una tendencia a aumentar los niveles en los ratones entrenados respecto a los sedentarios (**Fig.29D**).

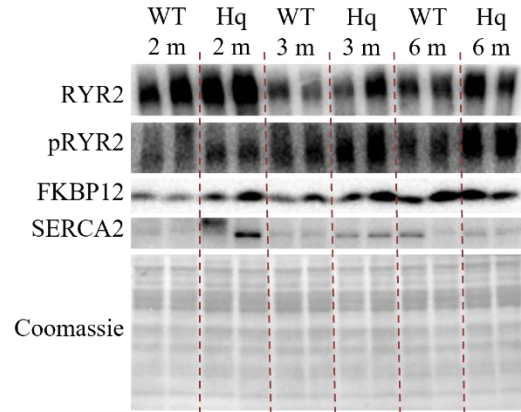
El conjunto, los datos obtenidos estarían indicando que el corazón de los ratones Hq no presenta alteraciones en la liberación de Ca^{2+} del RS en la fase de contracción cardiaca. Sin embargo, sí presentaría alteraciones en el manejo de Ca^{2+} durante la relajación, debido a una mayor frecuencia de sparks de Ca^{2+} , causadas por un mayor número de RYRs activos y con mayor probabilidad de apertura repetitiva, quizás por una mayor activación dependiente de la CaMKII. Estos cambios funcionales se acompañarían de mayores niveles de RYR2. Además, habría alteraciones en el mecanismo de relajación dependiente de SERCA2, ya que el corazón Hq tardaría un tiempo ligeramente mayor en recaptar todo el Ca^{2+} durante la diástole, pese a un posible aumento compensatorio de los niveles de proteína y actividad in vitro.

Resultados

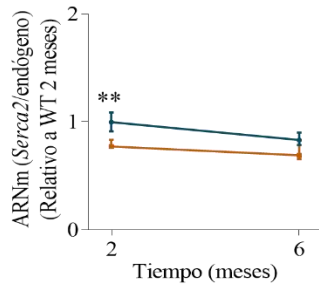
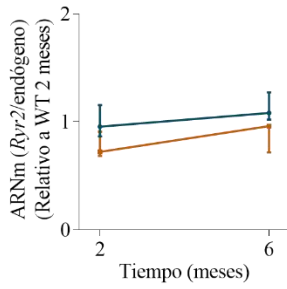
A



— WT
— Hq

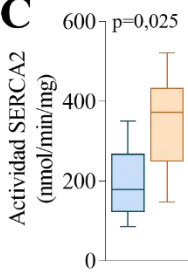


B



■ WT Sed
▨ WT Ent
■ Hq Sed
▨ WT Ent

C



D

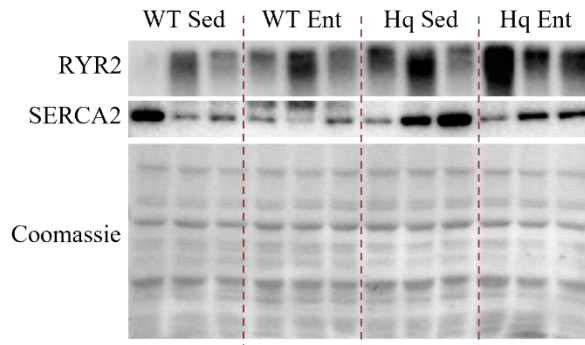
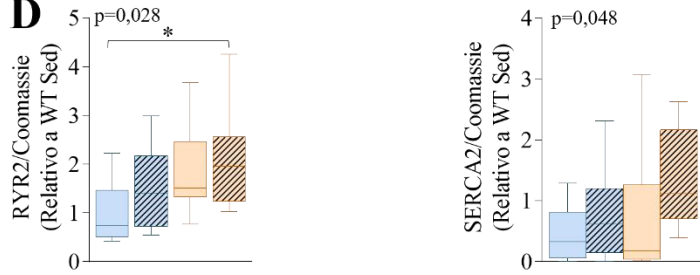


Figura 29. Proteínas implicadas en los flujos de Ca^{2+} en corazón. (A) Niveles de RYR2, RYR2 fosforilado en el residuo Ser2448 (pRYR2), FKBP12 y SERCA2, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). (B) Niveles de ARNm de *Ryr2* y *Serca2* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). (C) Actividad enzimática de SERCA2 en ratones WT y Hq de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal. (D) Análisis de los niveles de RYR2, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones WT y Hq, sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: (A) y (B) para cada grupo experimental ([A] n=8 ratones; [B] n=5-6 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y la línea de evolución temporal para cada genotipo. (C) y (D) para cada grupo experimental ([C] n=6-9 ratones; [D] n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses en (A) y en (B); WT en (C); y WT Sed en (D); además, en (B) respecto a la expresión de genes endógenos. Estadística: (A), (B) y (C) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad; #p<0,05 Hq 6 meses significativamente distinto de Hq 2 meses (test U de Mann-Whitney). (D) se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

3.2. Autofagia.

En los últimos años se ha demostrado el papel fundamental que juega la autofagia en la fisiología muscular como mecanismo de eliminación de elementos celulares sobrantes o dañados. Además, en diversos modelos de enfermedad mitocondrial, se han descrito alteraciones en esta vía que pueden jugar un papel en la fisiopatología de estas enfermedades. Dada la enorme importancia de este proceso en corazón, en esta tesis doctoral se estudió la relación entre la deficiencia de AIF y la autofagia en corazón.

3.2.1. Niveles de marcadores de autofagia.

Para comprobar si existía alguna alteración en esta vía, en primer lugar, se midieron por *western blot* los niveles de proteínas representativas de las distintas fases de la autofagia, en los ratones del estudio de la evolución temporal.

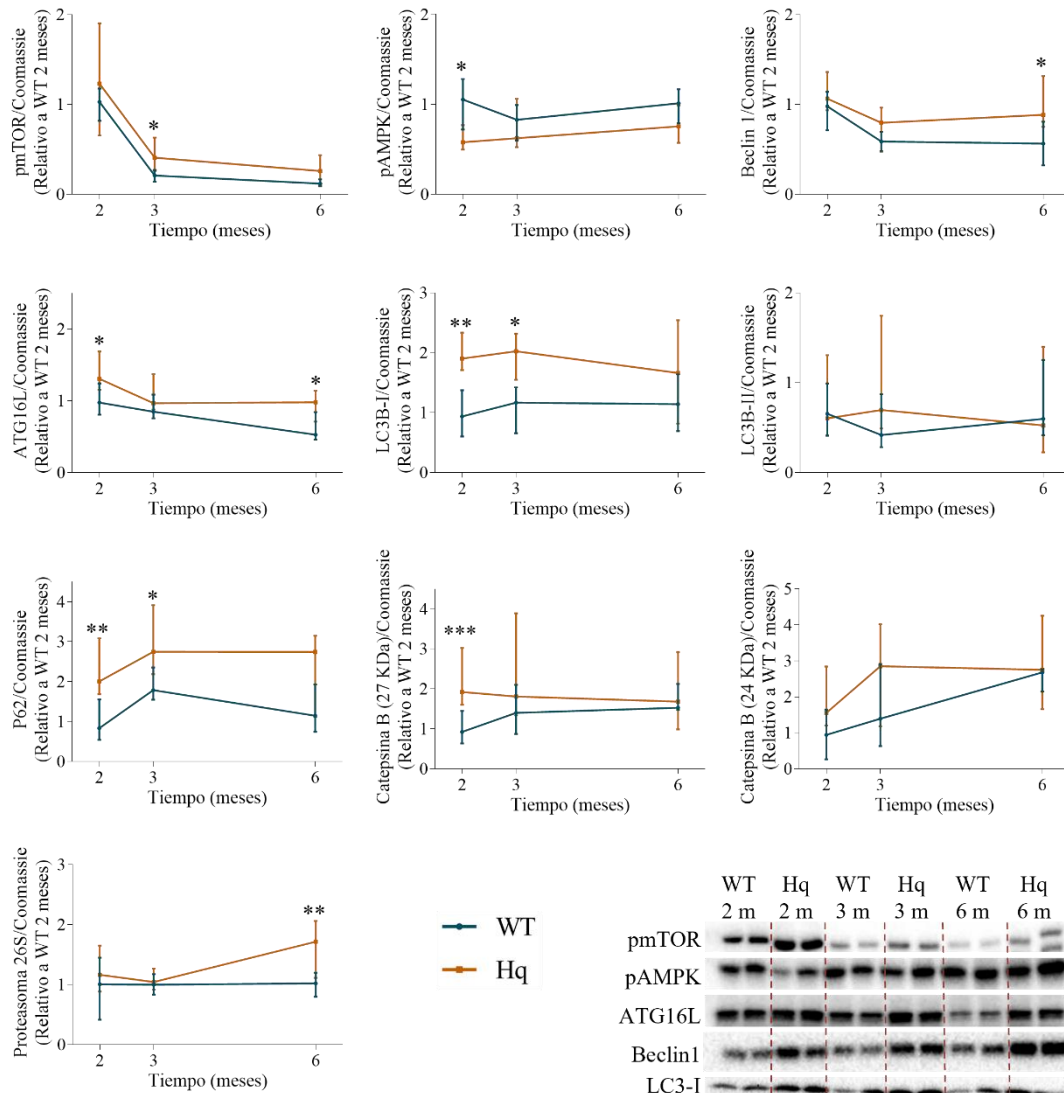
Para ello, se determinaron los niveles de los principales reguladores de la autofagia. Por un lado, mTOR, en su forma fosforilada en el residuo Ser2448, y por tanto activa. Se observaron unos niveles mayores de esta variable en los ratones Hq respecto a los WT a todas las edades, resultando la diferencia estadísticamente significativa únicamente a 3 meses de edad (**Fig.30A**). También se midieron los niveles del principal sensor de la energía celular, AMPK, fosforilado en el residuo Thr172, lo cual está asociado un estado de activación de esta proteína en respuesta a una baja disponibilidad de energía celular. Se observaron unos menores niveles de en los ratones Hq respecto a los WT, siendo la diferencia significativa únicamente a 2 meses de edad (**Fig.30A**). Posteriormente, se midieron los niveles de dos proteínas que participan en las primeras etapas de la formación del fagóforo: beclin1 y ATG16L. Se encontraron niveles mayores de beclin1 en los ratones Hq que en los WT. Aunque esta diferencia mostraba una tendencia a 2 y 3 meses, fue a 6 meses de edad cuando resultó estadísticamente significativa (**Fig.30A**). También se vieron mayores niveles de ATG16L en los ratones Hq que en los WT a todas las edades, siendo la diferencia estadísticamente significativa a 2 y 6 meses (**Fig.30A**).

El complejo del que forma parte ATG16L facilita la unión de la proteína LC3-I a la fosfatidiletanolamina para la formación de LC3-II, la cual participa en la elongación y cierre del fagóforo. Por ello, se midieron los niveles tanto de LC3B-I como de LC3B-II. Se encontraron niveles mayores de LC3B-I en los ratones

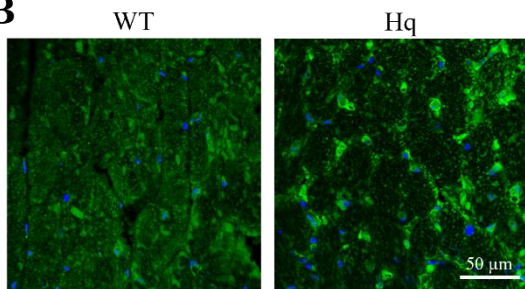
Resultados

Hq que en los WT a todas las edades, siendo estadísticamente significativa la diferencia a 2 y 3 meses de edad (**Fig.30A**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en LC3B-II entre los ratones Hq y WT a ninguna edad (**Fig.30A**). Además, se llevó a cabo una inmunofluorescencia en cortes de tejido cardiaco para detectar LC3B. Se observó que, en el caso de los ratones WT, la cantidad de LC3B presente se encontraba distribuida de forma homogénea en el tejido. Sin embargo, en el caso de los ratones Hq, se observó una mayor intensidad de fluorescencia de LC3B, así como una distribución mayoritariamente en forma de agregados perinucleares (**Fig.30B**).

A



B



LC3B + DAPI

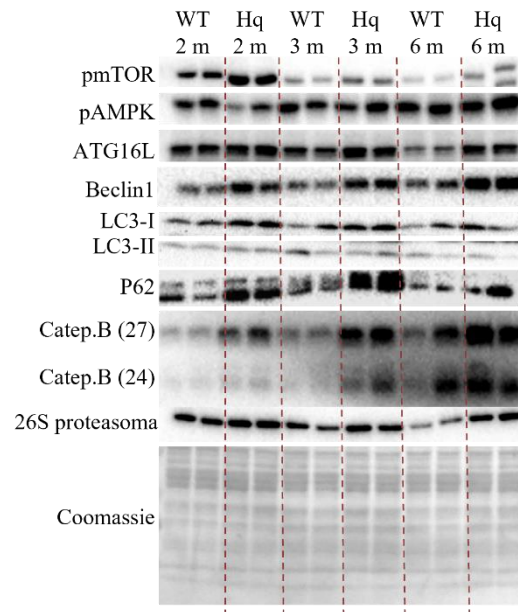


Figura 30. Proteínas de la ruta de autofagia en corazón. (A) Niveles de mTOR fosforilado en el residuo Ser2448 (pmTOR), AMPK fosforilada en el residuo Thr172 (pAMPK), beclin1, ATG16L, LC3B-I, LC3B-II, P62, catepsina B y proteasoma 26S, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2, 3 y 6 meses, m). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=8 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y para cada genotipo la línea de evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT de 2 meses. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney). (B) Detección de LC3B (verde), mediante inmunofluorescencia, y núcleos (DAPI, azul) en tejido cardíaco de ratones WT y Hq sedentarios del estudio de la intervención (objetivo 40x).

A continuación, se midieron los niveles de la proteína P62, la cual se une a proteínas ubiquitinadas, para ser degradadas por autofagia y dirigir las a los autofagosomas. Se observaron unos niveles mayores en ratones Hq que en los controles a todas las edades, siendo significativa la diferencia a 2 y 3 meses (**Fig.30A**). Además, puesto que P62 también es capaz de unir las proteínas ubiquitinadas al proteasoma para su degradación por esta vía, se midieron los niveles del complejo 26S del proteasoma, observando que eran mayores en los ratones Hq que en los WT a 6 meses de edad (**Fig.30A**). Por último, para comprobar si había un mayor contenido lisosomal en los ratones Hq, se cuantificaron los niveles de la proteasa lisosomal Catepsina B. Se observaron unos niveles más altos de la forma madura de esta proteína (que presenta bandas a 24 y 27 KDa) en los ratones Hq que en los WT, si bien la diferencia resultó significativa únicamente en el caso de la banda de 27 KDa a 2 meses (**Fig.30A**).

3.2.2. Análisis del flujo autofágico.

Para evaluar si la acumulación de proteínas de la vía de autofagia, como P62, podía obedecer a un fallo en el flujo autofagosoma-lisosoma y no a una activación de la autofagia, se estudió el flujo autofágico, para lo que se trataron animales WT y Hq de 3 meses con leupeptina —inhibidor de cisteína, serina y treonina peptidasas presentes en los lisosomas— y se midieron los niveles de algunas proteínas de la ruta. El análisis estadístico principal mostró diferencias significativas en los niveles de beclin1, P62 y LC3B-II (p=0,0038, p=0,014 y p=0,015, respectivamente), observándose en general valores más altos de las tres variables en los animales tratados que en los animales sin tratar (**Fig.31**), lo que indicaría la efectividad del tratamiento y un flujo autofágico normal tanto en ratones Hq como WT, y podría apuntar a un mayor marcaje de proteínas para su degradación por la vía lisosomal por efecto de la enfermedad en los ratones Hq.

Puesto que parecía haber un mayor marcaje de proteínas para degradar en los animales Hq, para discriminar si podía deberse a una mayor degradación de proteínas mitocondriales, y quizá de mitofagia, se midieron los niveles de algunas proteínas mitocondriales representativas. Los resultados obtenidos respecto a los niveles de NDUFB8, VDAC1 y TOM20 no mostraron diferencias significativas entre los ratones tratados y sin tratar con leupeptina. Sin embargo, sí se observaron unos niveles significativamente mayores de la proteína ATP5A en los ratones tratados con leupeptina respecto a los ratones sin tratar, aunque ocurrió tanto en el caso de los Hq como en los controles (**Fig.31**).

Finalmente, se llevó a cabo una inmunofluorescencia para detectar LC3 en cardiomiocitos WT y Hq aislados de ratones neonatales tratados con cloroquina (que bloquea la unión de los autofagosomas y los

Resultados

lisosomas) durante 24 horas. El test estadístico principal indicó que existían diferencias entre los grupos ($p=0,036$), aunque el análisis *post hoc* no encontró diferencias entre pares de grupos. Aun así, se observó una tendencia a una mayor intensidad de la fluorescencia de LC3 en los cardiomiocitos Hq tratados con cloroquina respecto a los cardiomiocitos Hq sin tratar, siendo esta diferencia mayor que la observada entre los cardiomiocitos WT tratados y sin tratar, lo que estaría indicando un flujo autofágico más activo en las células Hq (Fig.32).

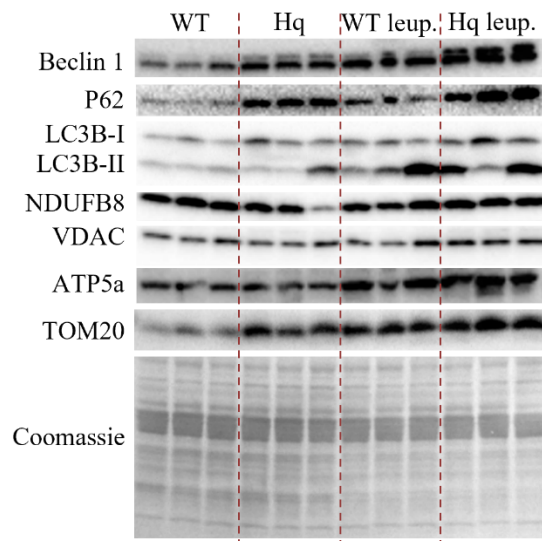
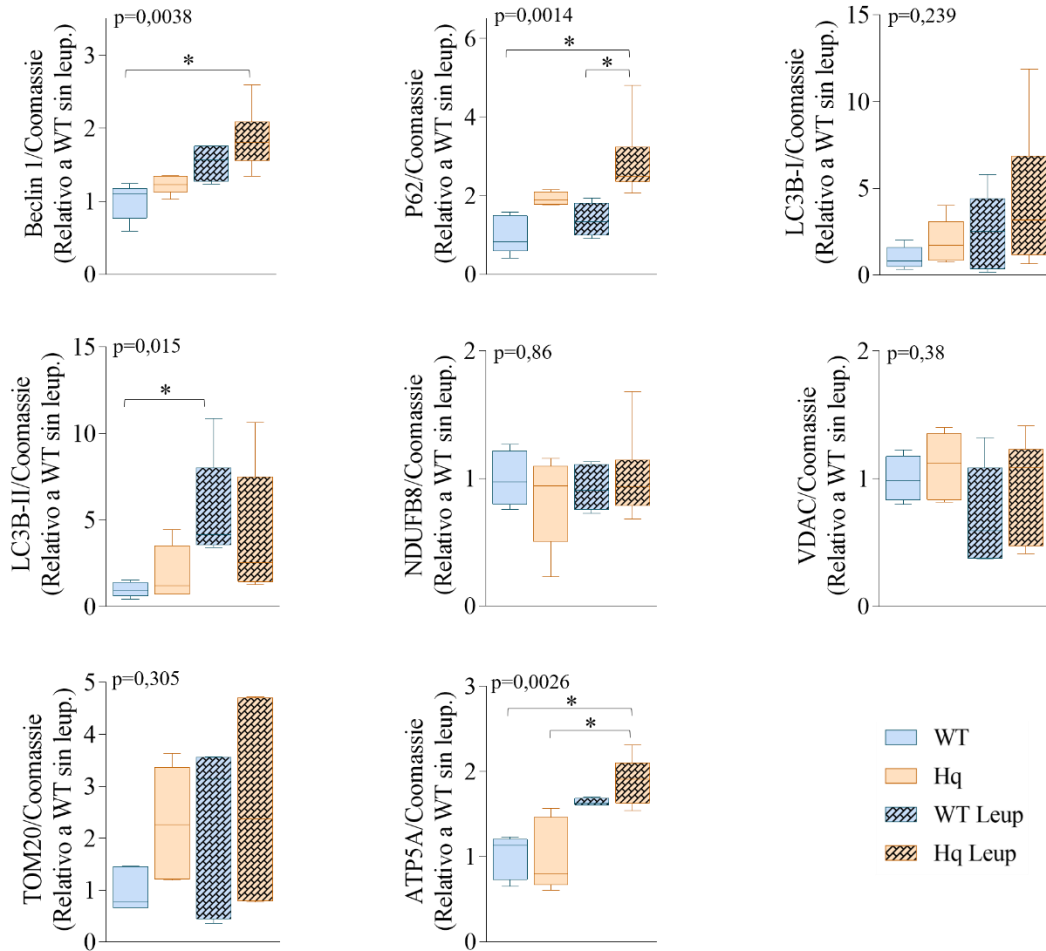


Figura 31. Análisis del flujo autofágico cardiaco. Niveles de beclin1, P62, LC3B-I, LC3B-II, NDUFB8, VDAC1, ATP5A y TOM20, medidos por *western blot* en homogenizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) de 3 meses, tratados y sin tratar con leupeptina. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=5-6 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT sin tratar. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

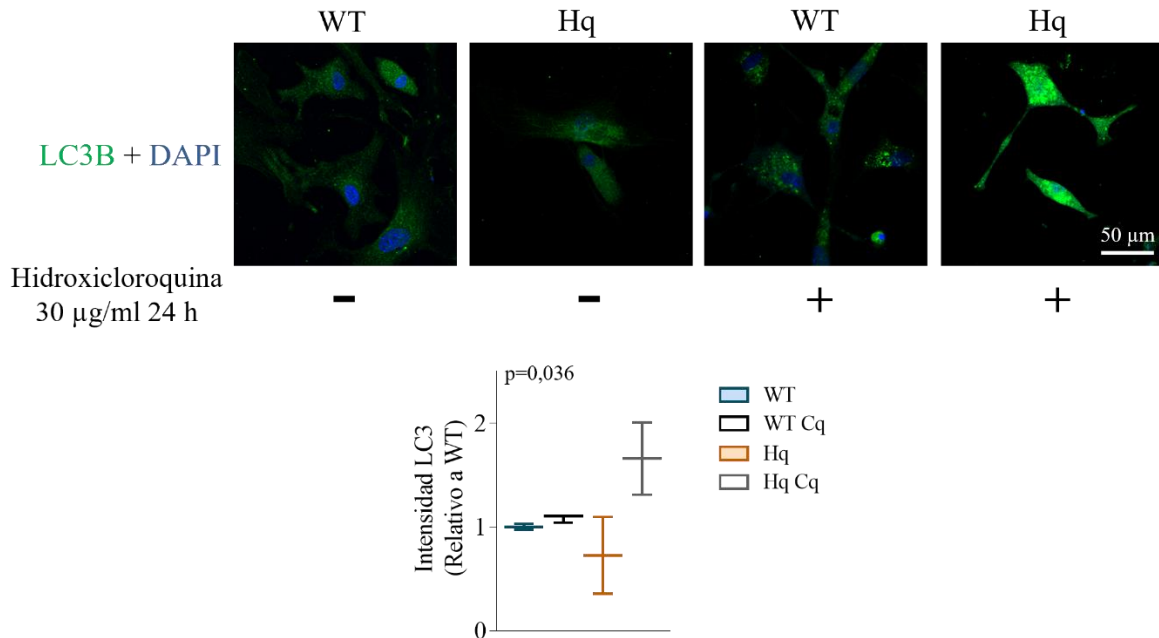


Figura 32. Flujo autofágico en cardiomiocitos. (A) Detección de LC3B (verde), mediante inmunofluorescencia, y núcleos (DAPI, azul) en cardiomiocitos neonatales de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) tratados con hidroxiquina (Cq) y sin tratar (objetivo 40x). (B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de LC3B de los cardiomiocitos. Datos: para cada grupo experimental (n=3 ratones WT sin tratar, n=3 ratones WT tratados con Cq, n=2 ratones Hq sin tratar y n=2 ratones Hq tratados con Cq) se representan la mediana y el rango intercuartílico. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT sin tratar. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

3.2.3. Efectos del entrenamiento sobre la autofagia.

Para saber si el entrenamiento ejercía algún efecto sobre la autofagia en los ratones Hq, que pudiera explicar las mejoras observadas en el rendimiento aeróbico de estos ratones, se midieron por *western blot* algunas proteínas marcadoras de autofagia en los ratones del estudio de la intervención. Los resultados mostraron que el entrenamiento no produjo diferencias significativas en ninguna de las proteínas medidas (pAMPK, pmTOR, beclin1, ATG16L, LC3B-I, LC3B-II P62 y Catepsina B) en los ratones entrenados respecto a los ratones sedentarios, ni en caso de los Hq ni en el de los WT (**Fig.33**). Además, se pudieron corroborar los resultados obtenidos previamente respecto a las diferencias significativas entre los ratones WT y Hq sedentarios en las variables ATG16L y beclin1. En este caso, además, sí se alcanzó la significación estadística en las diferencias entre los ratones Hq y WT sedentarios para LC3I y II, pmTOR, P62 y catepsina B (27 KDa). Asimismo, estos ratones mostraron ausencia de cambios en pAMPK entre los ratones Hq y WT sedentarios, contrariamente a lo que parecían indicar los niveles en los ratones del grupo de la evolución temporal (**Fig.33**).

Resultados

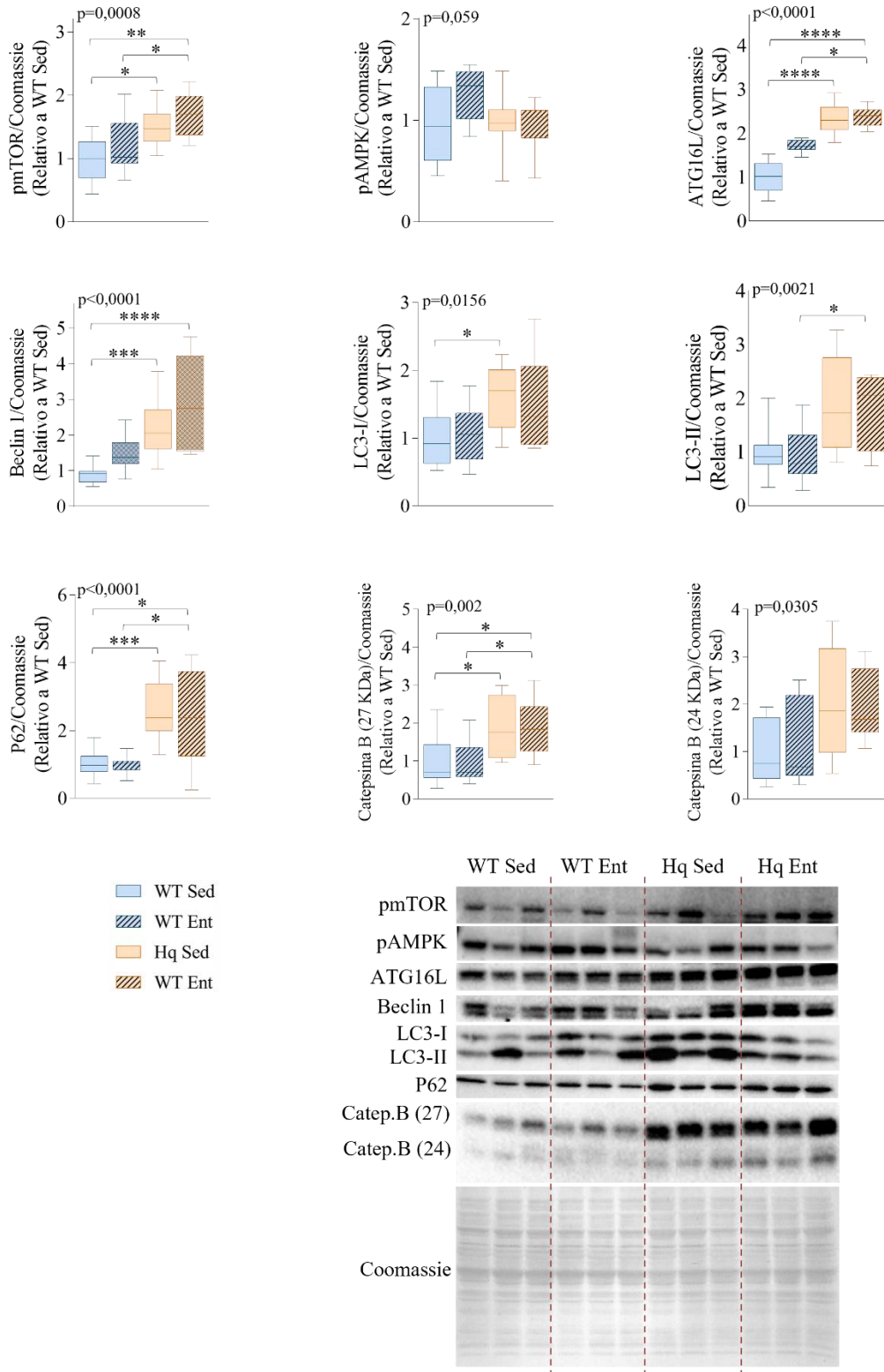


Figura 33. Efectos del entrenamiento sobre la autofagia en corazón. Niveles de mTOR fosforilado en el residuo Ser2448 (pmTOR), AMPK fosforilada en el residuo Thr172 (pAMPK), beclin1, ATG16L, LC3B-I, LC3B-II, P62 y catepsina B, medidos por *western blot* en homogeneizados de corazón de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

En definitiva, el miocardio de los ratones Hq presentó unos niveles mayores de varias proteínas marcadoras de distintas fases de la ruta de la autofagia en corazón (ATG16L, beclin1, LC3-I, P62 y Catepsina B), diferencias que no parecen ser atribuibles a un fallo en el flujo autofágico ni a un aumento de la mitofagia. Sin embargo, de manera paralela, se observó una mayor activación del represor de autofagia mTOR y una menor activación de AMPK. Además, el miocardio de los ratones Hq también mostró un aumento en los niveles de la vía de degradación del proteasoma 26S. Por último, no se observó ningún efecto del entrenamiento sobre los niveles de ninguno de los marcadores de autofagia, ni en los ratones Hq ni en los controles.

4. Manifestaciones de la deficiencia de AIF en músculo esquelético; efectos del programa de entrenamiento.

El análisis de las manifestaciones de la deficiencia de AIF en músculo esquelético se llevó a cabo principalmente en los ratones del estudio de la intervención con entrenamiento (de 5 meses y medio de edad): WT Sed, WT Ent, Hq Sed y Hq Ent. A diferencia del estudio de la deficiencia de AIF en corazón, en músculo esquelético no se pudo llevar a cabo el análisis de la evolución temporal de las alteraciones a 2 y 3 meses de edad, por lo que se trata de un estudio parcial. Además, debido a la limitación de las muestras (principalmente atribuida a la atrofia muscular que sufren los ratones Hq), se utilizaron diferentes músculos de las patas traseras para las distintas técnicas experimentales. Sin embargo, todos los músculos utilizados presentan una proporción similar de fibras rápidas tipo II: tibial anterior (94% de fibras IIB/X y 6% de fibras IIA) (197); bíceps femoral (93% de fibras IIB/X, 6% de fibras IIA y 1% de fibras I) (197); y cuádriceps (aproximadamente 90% de fibras II) (198).

4.1. Análisis del perfil proteómico y las modificaciones oxidativas postraduccionales.

Del mismo modo que en el corazón, se llevó a cabo en primer lugar un análisis del perfil proteómico mediante marcaje iTRAQ 8 plex y posterior identificación por espectrometría de masas, en bíceps femoral de los ratones del estudio de la intervención. A partir de los cambios en los niveles de distintas proteínas (mostrados en el material suplementario), algunos de los cuales se validaron posteriormente, se pudieron dilucidar algunos procesos celulares alterados en el músculo esquelético por efecto de la enfermedad, que se irán detallando en los siguientes apartados.

Además, se llevó a cabo un análisis proteómico de las modificaciones oxidativas postraduccionales en residuos de cisteína de proteínas, mediante marcaje iTRAQ 6 plex y posterior identificación por espectrometría de masas, en cuádriceps de ratones WT y Hq sedentarios de 6 meses de edad.

4.2. AIF y su función como inductora de muerte celular.

4.2.1. Niveles de AIF.

Se midieron los niveles de AIF por *western blot* en cuádriceps de los ratones del estudio de la intervención, encontrándose una caída de aproximadamente el 95% en los ratones Hq respecto a los WT, y la ausencia de efectos del entrenamiento sobre los mismos (**Fig.34A**).

A continuación, para analizar la localización de AIF en las fibras musculares, se llevó a cabo su detección, junto con la de ATP5A, por inmunofluorescencia en cortes de tejido de tibial anterior. Se observó que, tal y como se había visto en los cardiomiocitos, en el caso de los ratones WT, AIF se localizaba preferentemente siguiendo un patrón similar al del marcaje mitocondrial (ATP5A), mientras que en los ratones Hq AIF se encontraba mayoritariamente en los núcleos (**Fig.34B**).

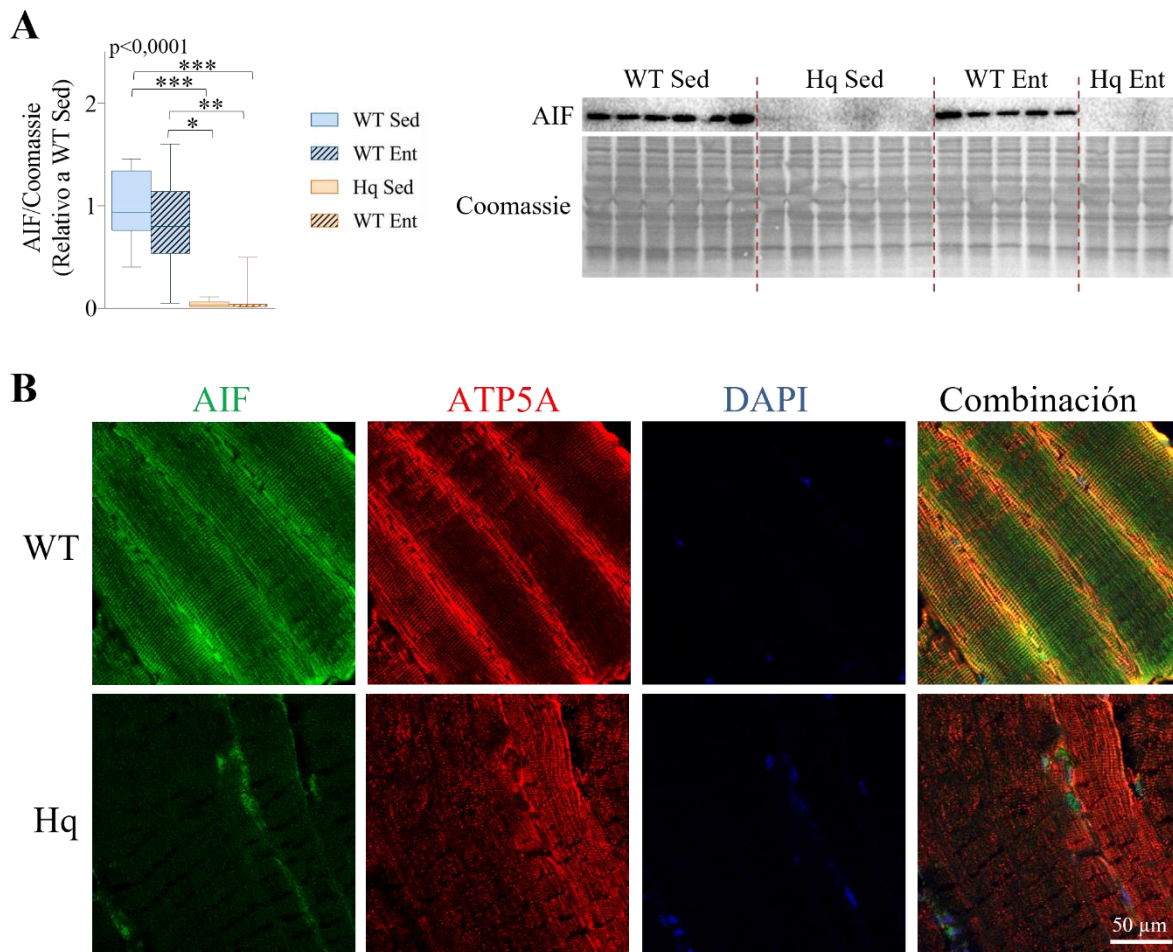


Figura 34. AIF y efectos del entrenamiento en músculo esquelético. (A) Niveles de AIF medidos por *western blot* en homogeneizados de cuádriceps de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos). **(B)** Detección de AIF (verde), ATP5A (rojo) y núcleos (DAPI, azul), mediante inmunofluorescencia en cortes de tibial anterior de ratones WT y Hq Sed del estudio de la intervención (objetivo 40x).

4.2.2. Muerte celular.

Con el fin de averiguar si, en el caso del músculo esquelético, la presencia de AIF en los núcleos podía estar induciendo la muerte de los miocitos, se realizó un marcaje mediante TUNEL en cortes de tejido de tibial anterior de los ratones del estudio de la intervención. No se detectó la presencia de núcleos marcados en los ratones Hq sedentarios, así como tampoco en los WT sedentarios. Asimismo, tampoco se encontró un efecto del entrenamiento en la inducción de la muerte celular en los ratones Hq ni en los controles (Fig.35).

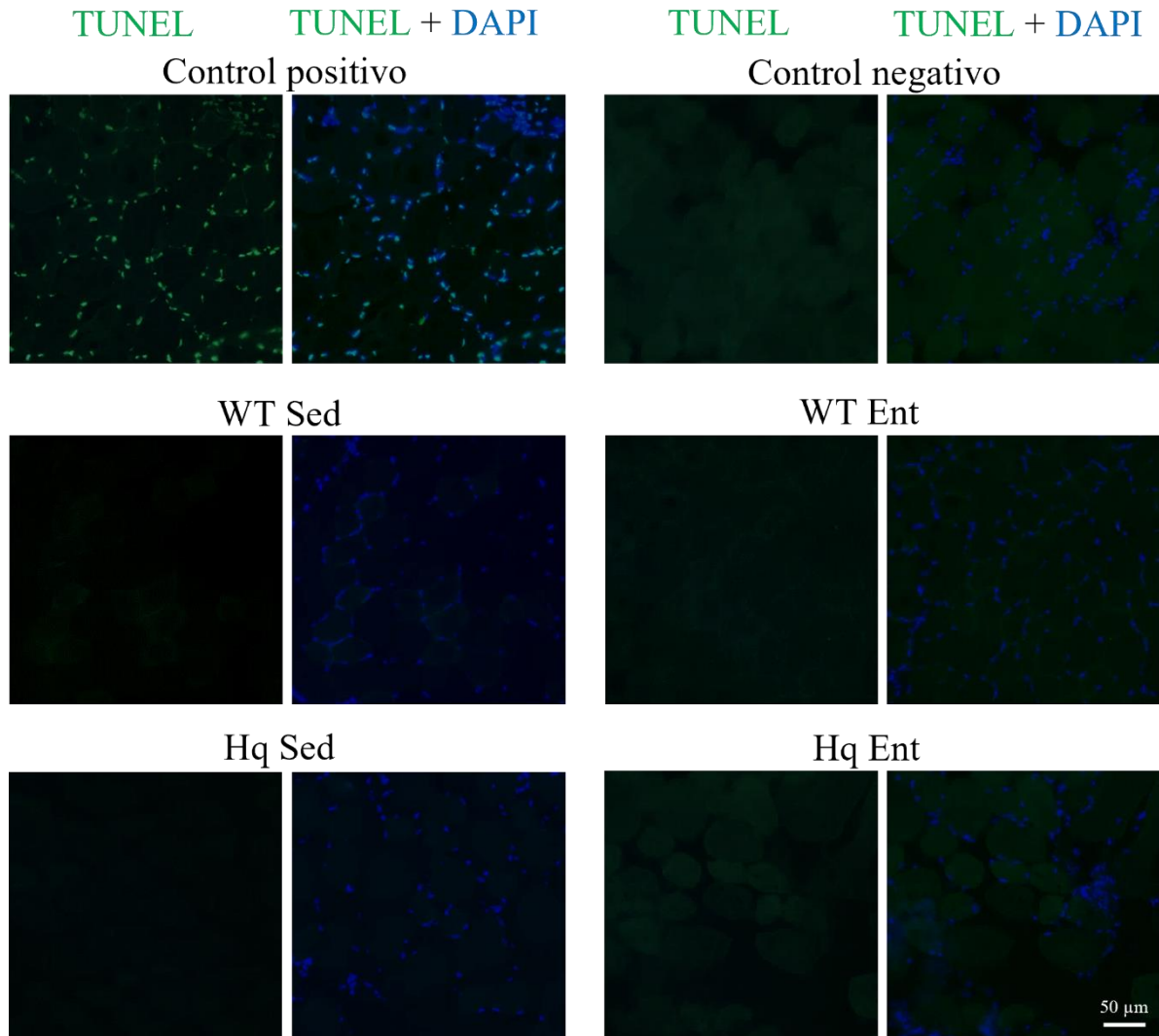


Figura 35. Apoptosis en músculo esquelético. Detección de núcleos apoptóticos mediante TUNEL (verde) y núcleos vivos (DAPI, azul) en cortes de tibial anterior de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención (objetivo 20x).

En conclusión, el músculo esquelético del ratón Hq presentó una caída en los niveles de AIF de aproximadamente un 95%, encontrándose la proteína residual mayoritariamente en los núcleos celulares. Sin embargo, la presencia de AIF en los núcleos no indujo la apoptosis de las células musculares. Además, el entrenamiento no produjo ningún cambio en los niveles de AIF ni indujo la apoptosis en el músculo.

4.3. Fenotipo mitocondrial.

4.3.1. Ultraestructura mitocondrial.

Del mismo modo que en corazón, se realizó un análisis de las mitocondrias intermiofibrilares a partir de imágenes tomadas mediante microscopía electrónica en cuádriceps de ratones WT y Hq sedentarios de 6 meses de edad (**Fig.36A**), y se midieron diferentes parámetros para su caracterización.

Teniendo en cuenta únicamente las medidas promedio de cada ratón ($n=3$), no se observaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros medidos entre los ratones WT y Hq (número de mitocondrias/área de tejido, contenido mitocondrial/área de tejido, área mitocondrial, perímetro mitocondrial, circularidad mitocondrial, redondez mitocondrial y diámetro de Feret mitocondrial) (**Fig.36B**). Sin embargo, realizando el análisis estadístico con el número total de mitocondrias analizadas por grupo experimental ($n=300$), se encontraron diferencias significativas en los siguientes parámetros: un mayor número de mitocondrias/área de tejido en los ratones WT ($p=0,017$); un área mitocondrial ligeramente mayor en los ratones Hq ($p=0,039$); un perímetro mitocondrial mayor en los ratones Hq ($p=0,0008$); una redondez mitocondrial ($p<0,0001$) y una circularidad mitocondrial ($p<0,0001$) mayores en los ratones WT; y un diámetro de Feret mitocondrial mayor en los ratones Hq ($p<0,0001$).

Por otro lado, se realizó un análisis PCA y se observó que, a diferencia del corazón (donde los ratones WT y Hq conformaban dos grupos claramente diferenciados), en el músculo esquelético el solapamiento entre los ratones WT y Hq fue mayor, lo que indicaría que existe una mayor variabilidad en este tejido, siendo necesario aumentar el número de ratones analizados para una mayor potencia estadística (**Fig.36C**).

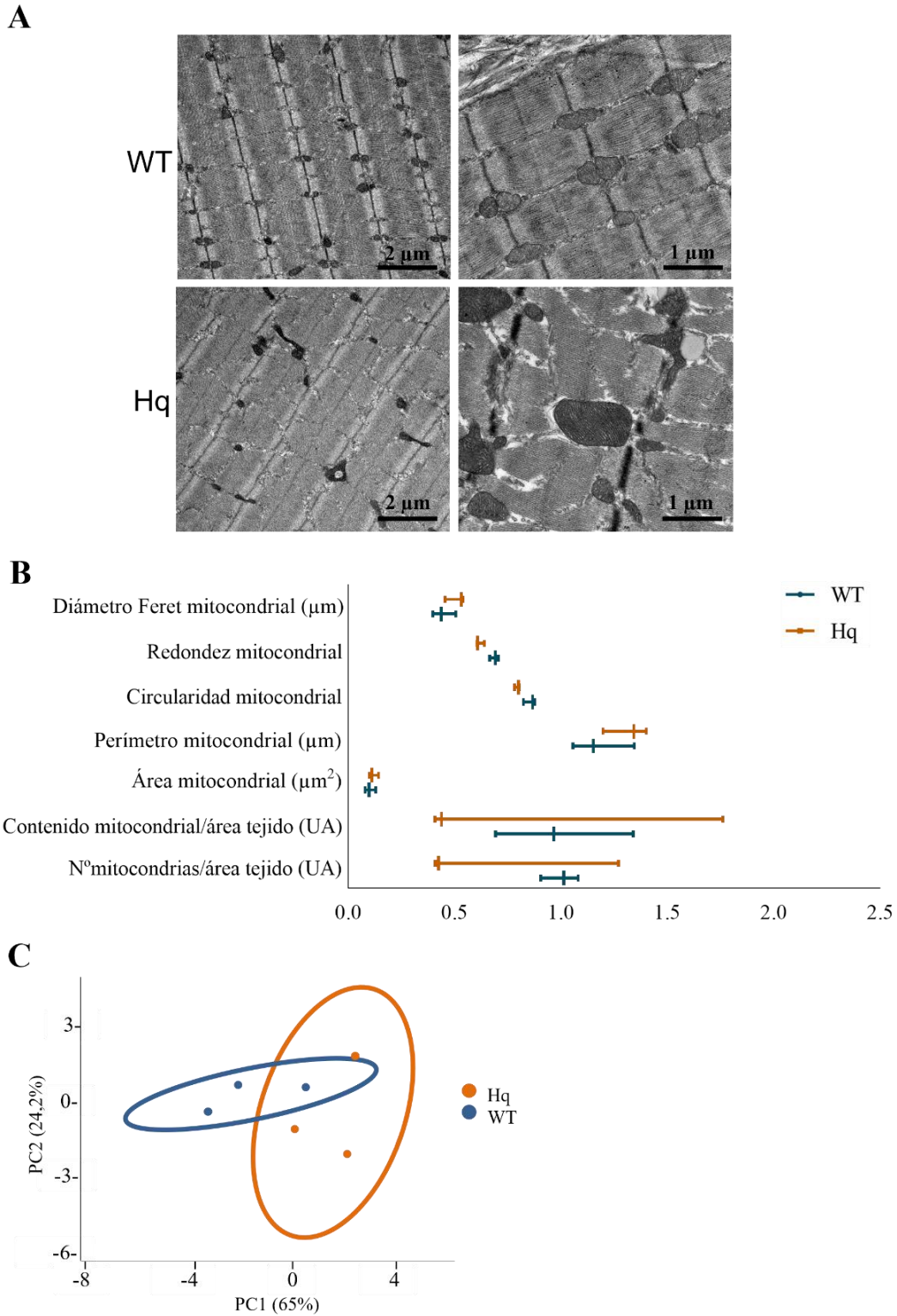


Figura 36. Ultraestructura mitocondrial en músculo esquelético. (A) Imágenes representativas de las mitocondrias intermiofibrilares de cuádriceps de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) de 6 meses, tomadas en el microscopio electrónico de transmisión a distintos aumentos (10000x). (B) Parámetros relativos a la ultraestructura mitocondrial de cuádriceps de ratones WT y Hq de 6 meses de edad, medidos con el *software* ImageJ a partir de imágenes de microscopía electrónica. Los parámetros medidos fueron: número y contenido mitocondrial/área de tejido; contenido mitocondrial/área de tejido; área, perímetro, circularidad, redondez y diámetro de Feret mitocondrial. Datos: para cada grupo experimental (n=3 ratones) se representan la mediana y los valores mínimo y máximo. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney). (C) Análisis por componentes principales realizado a partir de todos los parámetros medidos en la gráfica B.

4.4. Sistema OXPHOS.

4.4.1. Niveles de los complejos OXPHOS y efectos del entrenamiento.

Gracias al análisis proteómico llevado a cabo en bíceps femoral de los ratones del estudio de la intervención, se pudieron identificar algunas proteínas relacionadas con el sistema OXPHOS — pertenecientes al CI, CIII, CIV y la ATP sintasa— cuyos niveles resultaban ligeramente menores en los ratones Hq que en los WT (material suplementario, **Tabla S11**).

Con el fin de confirmar si los ratones Hq presentaban alteraciones en los niveles de proteínas del sistema OXPHOS, se midieron por *western blot* los niveles de algunas proteínas pertenecientes a cada uno de los complejos de la CTE y la ATP sintasa (NDUFB8, NDUFB7, NDUFS1, SDHA, CORE2, COX5A y ATP5A) en cuádriceps de los ratones del estudio de la intervención. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ninguna de ellas entre los ratones Hq sedentarios y los WT sedentarios, aunque el test principal fue casi significativo en el caso de NDUFS1 ($p=0,076$), con niveles más bajos en ambos grupos de ratones Hq (**Fig.37A**). En cuanto a los efectos del entrenamiento, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones entrenados y sedentarios, para ninguna de las proteínas medidas, ni en el caso de los ratones Hq ni en el de los controles (**Fig.37A**). Respecto a CHCHD4, no fue posible detectar esta proteína por *western blot*, por lo que se midieron los niveles de ARNm en cuádriceps de animales sedentarios de 2 y 6 meses de edad, observando una caída moderada en los ratones Hq de 2 meses respecto a los WT, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa (**Fig.37B**).

3.1.1. Ensamblaje de los supercomplejos de la CTE.

Para averiguar si, en el caso del músculo esquelético, la deficiencia de AIF podía estar afectando a la formación de supercomplejos de la CTE, éstos se separaron mediante BN-PAGE a partir de extractos enriquecidos en mitocondrias de cuádriceps de ratones sedentarios de 6 meses de edad, estando cada muestra experimental formada por un *pool* de 8 ratones. En primer lugar, se llevó a cabo una 1D-BN-PAGE (**Fig.38A**). La cuantificación de las bandas correspondientes a los distintos complejos y supercomplejos mostró unos niveles menores de las proteínas del CI —NDUFA9, NDUFB8 y NDUFS1— en la forma del CI libre, así como formando parte del supercomplejo I+III₂ en el caso de NDUFA9 y NDUFS1, en la muestra Hq respecto a la WT (**Fig.38B**). En cuanto al CIII, los niveles de CORE2 sugirieron un leve descenso en la muestra Hq respecto a la WT, principalmente formando parte del supercomplejo I+III₂ (**Fig.38B**). En el caso del CIV, los niveles de COX5A indicaron un aumento en la muestra Hq, especialmente en el caso del complejo libre en su forma dimérica (**Fig.38B**). En ninguna de las proteínas detectadas de los complejos CI, CIII y CIV se detectó con suficiente claridad la banda correspondiente al respirasoma, por lo que no se pudo cuantificar. Por último, respecto al CV, los niveles de ATP5A mostraron un aumento del mismo en su forma monomérica en la muestra Hq respecto a la WT (**Fig.38B**).

Posteriormente se llevó a cabo una 2D-BN/SDS-PAGE y se detectaron las proteínas del CI (NDUFA9, NDUFS1 y NDUF7), con el fin de calcular la ratio entre el respirasoma y el complejo libre de las subunidades del CI (**Fig.38C**). Así, se vio que los ratones Hq presentaron una menor ratio respirasoma/complejo libre respecto a los ratones WT para las tres proteínas estudiadas, tal y como se había observado en el caso del corazón (**Fig.38D**). Por último, tampoco se encontró una acumulación de ningún intermediario de los complejos, de menor peso molecular, en el músculo esquelético del ratón Hq (**Fig.38C**).

3.1.1. Actividad enzimática de los complejos de la CTE.

Se midió la actividad enzimática de cada uno de los cuatro complejos de la CTE, así como de la CS, en homogeneizados de cuádriceps de los ratones del estudio de la intervención. Las medidas de actividad de la CS sugirieron un aumento en los niveles de los ratones Hq respecto a los WT, aunque el test estadístico principal no alcanzó la significación estadística ($p=0,08$) (**Fig.39A**). Puesto que este aumento podría estar indicando una tendencia a un mayor contenido mitocondrial en los ratones Hq, las medidas del resto de complejos de la CTE se normalizaron por la actividad de CS. De esta manera, se observó un menor nivel de actividad del CI en ambos grupos de ratones Hq respecto a los WT sedentarios, aunque el test *post hoc* mostró únicamente diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Hq entrenados y WT sedentarios (**Fig.39A**). En el caso del CII, inesperadamente se detectó un menor nivel de actividad en los ratones Hq respecto a los WT, a pesar de que el test estadístico *post hoc* no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos (**Fig.39A**). Por último, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el caso de las actividades del CIII y CIV (**Fig.39A**).

Por último, se midieron por *western blot* los niveles de GAPDH en los ratones del estudio de la intervención (**Fig.39B**), sin observarse diferencias significativas entre los grupos experimentales, lo que sugiere que el déficit de actividad del CI no estaría dando lugar a una mayor activación del metabolismo glucolítico como vía alternativa para producir ATP.

En resumen, el conjunto de datos sugirió que no existe un defecto relevante en la síntesis de subunidades de los complejos, pero sí un fallo moderado en el ensamblaje del CI, tanto en su forma libre como formando parte del supercomplejo I+III₂ y el respirasoma. Este fallo de ensamblaje podría ser responsable de la deficiencia en la actividad enzimática del CI, que no parecería producir una mayor activación del metabolismo glucolítico. Por último, el programa de entrenamiento no tuvo ningún efecto relevante sobre la cantidad de complejos de la CTE ni su actividad.

Resultados

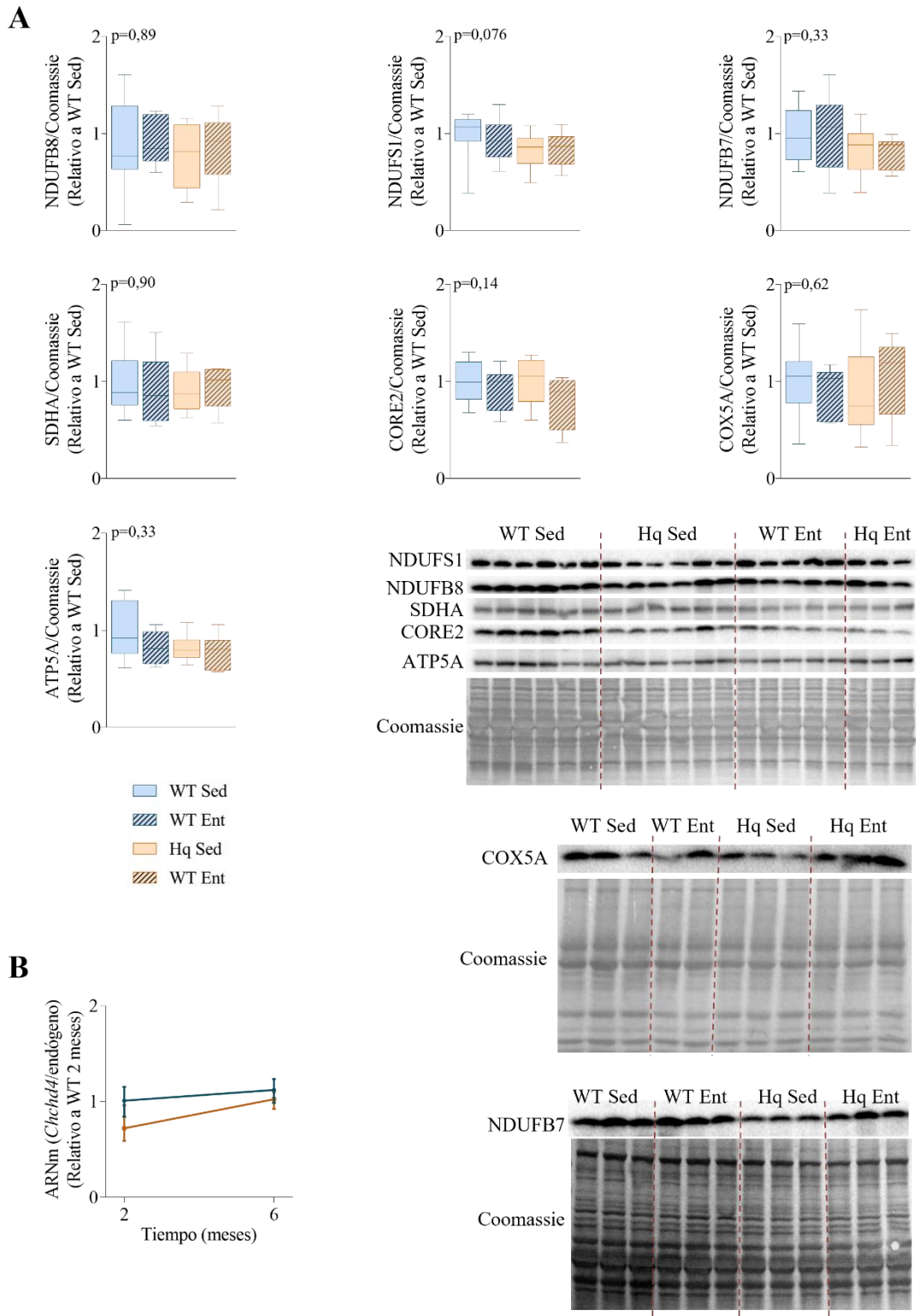


Figura 37. Efectos del entrenamiento sobre el sistema OXPHOS en músculo esquelético. (A) Niveles de NDUFB8, NDUFS1, NDUFB7, SDHA, CORE2, COX5A y ATP5A medidos por *western blot* en homogeneizados de cuádriceps de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. **(B)** Niveles de ARNm de *Nrf2* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed y, además, en **(B)** respecto a la expresión de genes endógenos. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ para pares significativamente distintos).

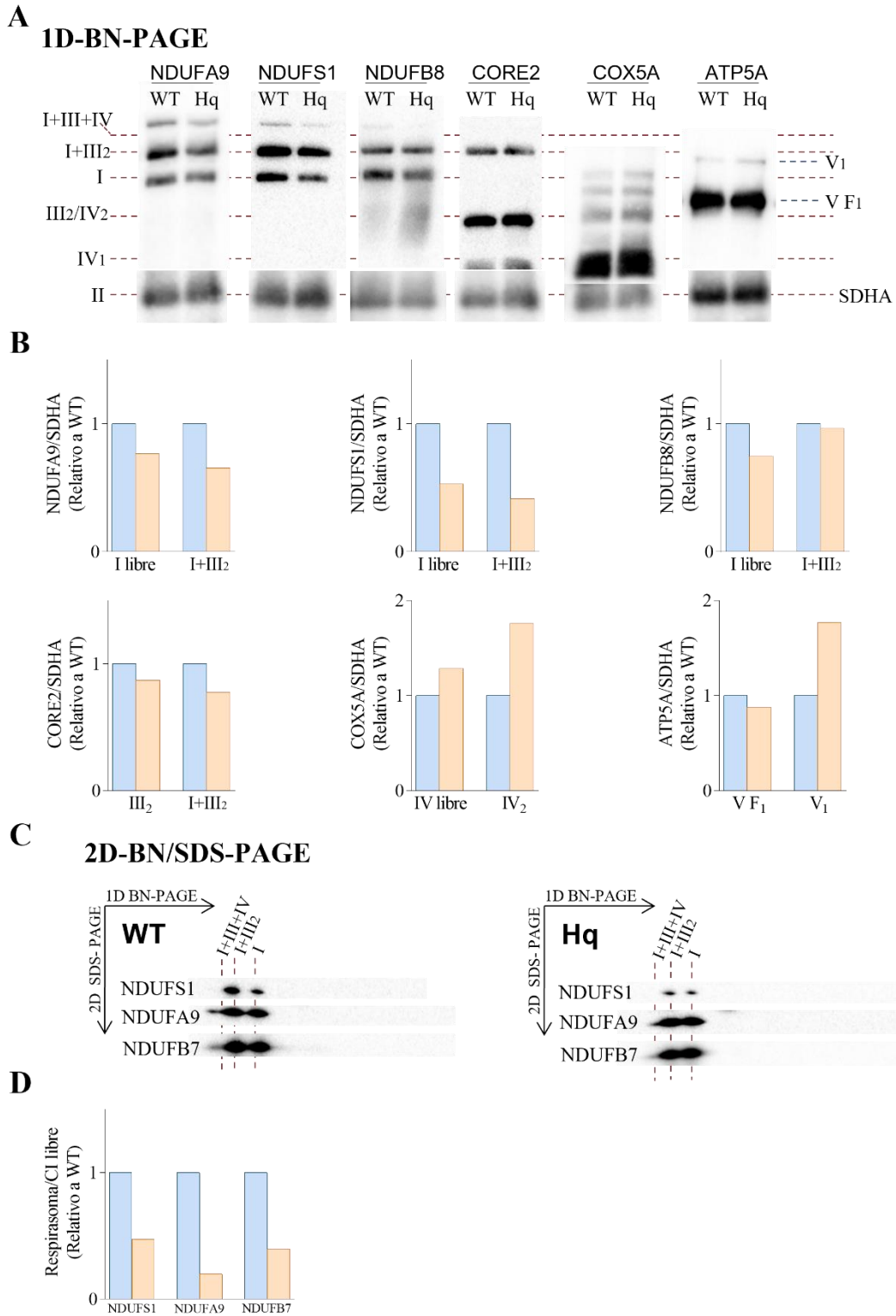


Figura 38. Ensamblaje de supercomplejos de la CTE en músculo esquelético. (A) Electroforesis en condiciones nativas en primera dimensión (1D-BN-PAGE) e inmunodetección con anticuerpos de proteínas de todos los complejos (NDUFB8, NDUFA9, NDUFS1, SDHA, CORE2, COX5A y ATP5A) en fracciones enriquecidas en mitocondrias de cuádriceps de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) de 6 meses de edad del estudio de la evolución temporal. Se muestran las bandas correspondientes al CII, al CIV en su forma monomérica, al CIII y CIV en su forma dimérica, al CI en su forma monomérica, al supercomplejo CI+CIII₂ y al respirasoma (CI+CIII+CIV). **(B)** Cuantificación de cada una de las bandas de la 1D-BN-PAGE (n=1 *pool* de 8 ratones). **(C)** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en segunda dimensión (2D-BN/SDS-PAGE) y posterior inmunodetección con anticuerpos de las proteínas NDUFB7, NUDFS1 y NDUFA9. Se muestran las bandas correspondientes al CI en su forma monomérica, al supercomplejo CI+CIII₂ y al respirasoma. **(D)** Cuantificación de la ratio respirasoma/complejo libre de las bandas correspondientes a la detección de las proteínas del CI en la 2D-BN/SDS-PAGE.

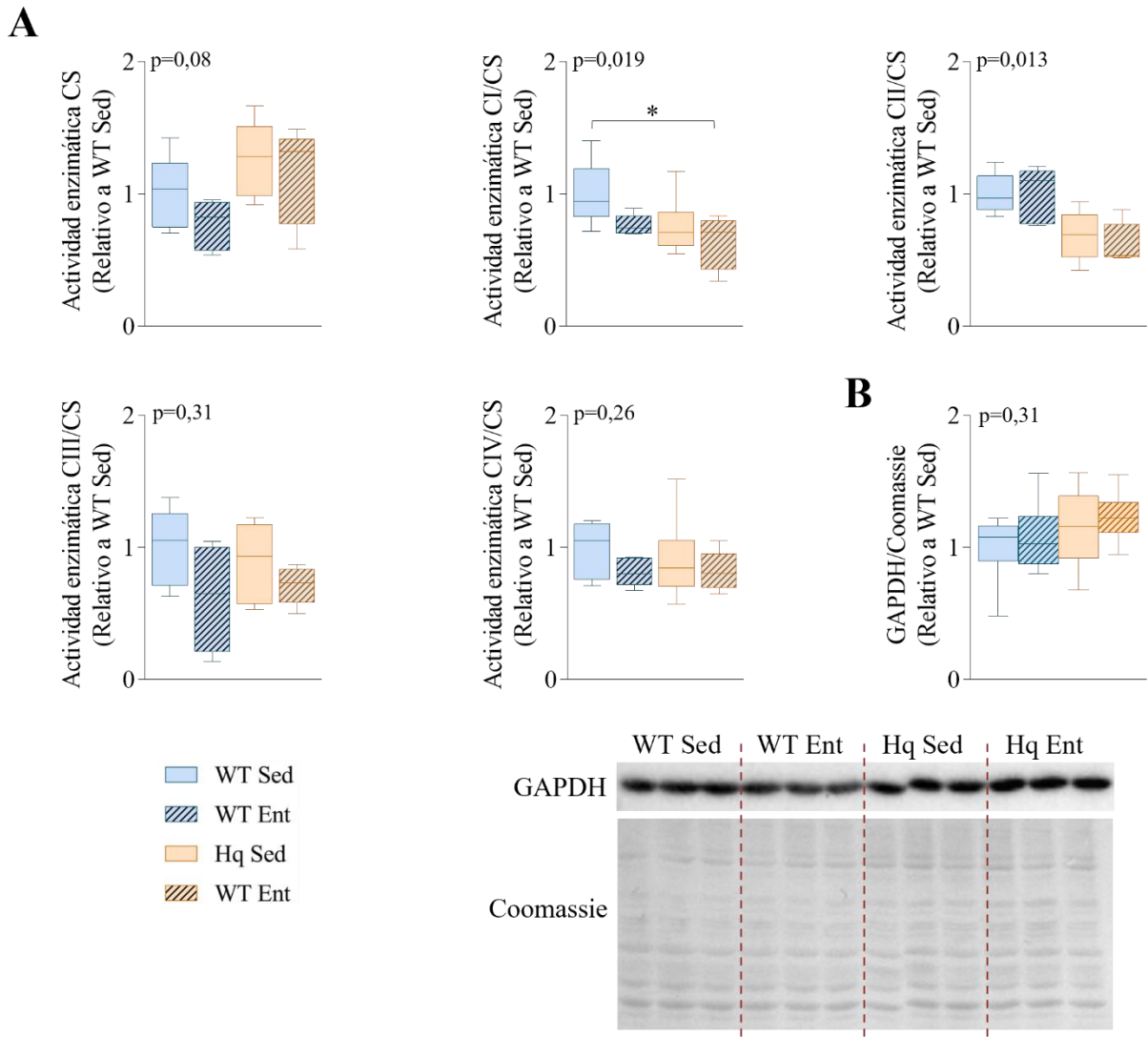


Figura 39. Actividad enzimática de los complejos del sistema OXPHOS en músculo esquelético. (A) Niveles de actividad enzimática de los complejos de la CTE y CS, medidos en homogeneizados proteicos totales de cuádriceps de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. (B) Niveles de GAPDH medidos por *western blot* en homogeneizados de cuádriceps de ratones wild WT y Hq, Sed y Ent, del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron con respecto al WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ para pares significativamente distintos).

3.2. Alteraciones en la distribución de lípidos.

A partir del análisis proteómico de los ratones del estudio de la intervención, se pudo observar que los niveles de las proteínas de unión a ácidos grasos, FABP3 y FABP4, eran superiores en bíceps femoral de los ratones Hq respecto a los animales WT (material suplementario, **Tabla S12**), mientras que el entrenamiento no parecía producir ningún efecto sobre estas proteínas. Para validar este resultado, se midió la expresión de ARNm de *Fabp4* en cuádriceps de ratones sedentarios WT y Hq sedentarios de 2 y 6 meses de edad, observándose una expresión significativamente mayor en los ratones Hq a ambas edades (**Fig.40A**).

Por otro lado, gracias a la visualización, mediante microscopía electrónica, de cuádriceps de ratones sedentarios de 6 meses de edad, se pudo cuantificar el número de gotas lipídicas presentes en el tejido. En los 3 ratones WT analizados apenas se encontraron gotas lipídicas en el tejido. Sin embargo, en los 3 ratones Hq se observó un mayor número de gotas lipídicas respecto a los WT, siendo considerablemente mayor la cantidad de gotas lipídicas en uno de ellos (**Fig.40B y C**).

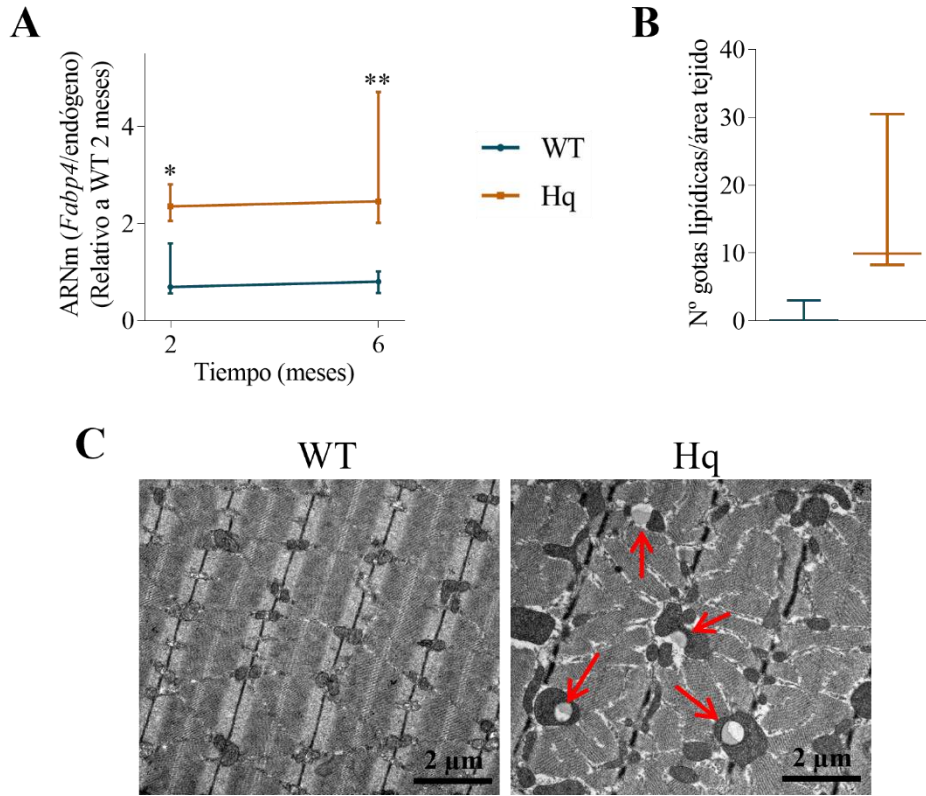


Figura 40. Distribución de lípidos en músculo esquelético. (A) Niveles de ARNm de *Fabp4* medidos mediante QuantiGene Plex en cuádriceps de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq) del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). (B) Número promedio de gotas lipídicas/área de tejido en cuádriceps de ratones WT y Hq, medido a partir de imágenes tomadas con el microscopio electrónico de transmisión. (C) Imágenes representativas de cuádriceps de ratones WT y Hq, tomadas a través del microscopio electrónico de transmisión. Las flechas rojas indican gotas lipídicas. Datos: para cada grupo experimental ([A] n=5-6 ratones; [B] n=3 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico, y en (A) la línea de la evolución temporal. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT y, además, en (A) respecto a la expresión de los genes endógenos. Estadística: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

3.3. Alteraciones en los niveles de aminoácidos y otros metabolitos.

Se midió la concentración de aminoácidos y otros metabolitos en homogeneizados totales de cuádriceps de los ratones del estudio de la intervención, mediante cromatografía líquida de alta eficacia. Se encontraron niveles mayores de prácticamente todos ellos en los ratones Hq respecto a los WT, siendo estadísticamente significativa la diferencia para la valina, el ácido α -aminoadípico, la ornitina, la lisina, la arginina y la N-leucina. En cambio, no se vieron diferencias en los niveles de citrulina entre ratones Hq y WT; y se observaron unos niveles menores de anserina y carnosina en los ratones Hq respecto a los controles (**Tabla 6**).

Tabla 6. Concentración de aminoácidos y otros metabolitos presentes en cuádriceps de los ratones del estudio de la intervención.

Metabolito	[WT] $\mu\text{mol/L}$	[Hq] $\mu\text{mol/L}$	p valor
Fosfoserina	23,6 \pm [23,1-23,8]	24,2 \pm [23,6-24,4]	0,309
Taurina	2357,5 \pm [2308,5-2382,5]	2424,6 \pm [2361,9-2442,4]	0,055
Fosfoetanolamina	25,1 \pm [23,5-33,0]	32,3 \pm [30,3-38,1]	0,095
Urea	784,7 \pm [624,9-815,8]	727,9 \pm [651,4-1115,4]	0,690
Treonina	38,2 \pm [36,5-44,7]	44,7 \pm [44,1-62,5]	0,095
Serina	47,6 \pm [34,9-65,5]	58,7 \pm [47,3-82,4]	0,420
Asparagina	5,6 \pm [4,8-7,3]	6,6 \pm [5,8-13,1]	0,548
Glutamato	56,5 \pm [48,4-72,9]	66,2 \pm [57,3-131,2]	0,151
Glutamina	165,3 \pm [143,4-202,1]	204,3 \pm [181,8-235,5]	0,095
α -aminoadípico	82,5 \pm [78,7-88,1]	103,0 \pm [98,8-116,7]	0,008 **
Glicina	205,3 \pm [170,3-311,2]	282,1 \pm [235,1-334,4]	0,222
Alanina	348,7 \pm [277,4-371,1]	379,4 \pm [354,5-475,1]	0,095
Citrulina	13,6 \pm [12,3-16,2]	15,6 \pm [10,1-18,2]	>0,999
Valina	24,7 \pm [23,1-25,9]	31,1 \pm [29,3-39,1]	0,008 **
Metionina	9,9 \pm [9,4-10,4]	12,1 \pm [8,2-13,8]	0,690
Cistina	8,3 \pm [7,9-8,4]	8,6 \pm [7,8-9,4]	0,151
Isoleucina	17,9 \pm [15,8-18,8]	21,3 \pm [18,7-23,3]	0,055
Leucina	23,6 \pm [22,9-25,5]	33,7 \pm [25,7-38,3]	0,095
Tirosina	16,2 \pm [13,2-16,3]	16,6 \pm [14,5-18,5]	0,222
Fenilalanina	11,5 \pm [11,2-13,1]	15,7 \pm [11,5-17,3]	0,095
Amonio	575,3 \pm [573,5-600,0]	569,0 \pm [555,1-598,5]	0,421
Ornitina	4,4 \pm [4,1-5,1]	8,3 \pm [6,2-12,8]	0,008 **
Lisina	53,6 \pm [44,9-58,3]	66,8 \pm [63,4-84,5]	0,008 **
Histidina	14,8 \pm [12,9-18,7]	18,0 \pm [14,9-21,5]	0,309
Anserina	696,4 \pm [583,4-776,2]	528,0 \pm [460,9-539,6]	0,055
Carnosina	393,2 \pm [300,8-428,4]	305,1 \pm [216,5-424,9]	0,548
Arginina	25,0 \pm [18,7-25,7]	34,1 \pm [27,9-46,4]	0,008 **
Hidroxiprolina	11,7 \pm [10,5-14,2]	14,6 \pm [12,3-16,1]	0,222
Prolina	34,4 \pm [16,7-37,3]	36,7 \pm [28,9-57,8]	0,309
N-leucina	23,3 \pm [13,6-28,5]	38,5 \pm [33,6-40,9]	0,032 *

Los datos se expresan como la mediana \pm el rango intercuartílico de los distintos metabolitos para cada grupo experimental. Se muestra el p valor de cada comparación entre los grupos WT y Hq para cada metabolito (test U de Mann Whitney; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.4. Estrés oxidativo.

3.4.1. Niveles de proteínas antioxidantes.

Para estudiar la posible presencia de estrés oxidativo en músculo esquelético del ratón Hq, se midieron mediante *western blot* los niveles de catalasa, SOD1, SOD2 y PRDX6 en cuádriceps de los ratones del estudio de la intervención. Únicamente se observaron diferencias significativas entre los grupos en los niveles de catalasa; el análisis estadístico *post hoc* mostró unos niveles significativamente mayores en los ratones Hq sedentarios respecto a los WT sedentarios, así como en los Hq entrenados respecto a los WT entrenados. Además, el entrenamiento no alteró esta variable en los ratones entrenados respecto a los sedentarios de su mismo genotipo (**Fig.41A**). En cambio, no se detectaron diferencias en los niveles de SOD1, SOD2 y PRDX6 entre ninguno de los grupos (**Fig.41A**). Puesto que se habían observado mayores niveles de catalasa en los ratones Hq, se midieron los niveles de su actividad en cuádriceps de ratones sedentarios WT y Hq de 6 meses de edad, pero no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (**Fig.41B**). Por otro lado, se midió el nivel de ARNm de *Nrf2* en ratones sedentarios de 2 y 6 meses de edad, y no se observó ningún cambio significativo en los niveles de expresión entre los ratones Hq y WT de su misma edad (**Fig.41C**). Por último, el análisis proteómico y de las modificaciones oxidativas postraduccionales mostraron, igual que en el corazón, un aumento en los niveles de albúmina, así como de oxidación de múltiples sus residuos de cisteína, en los ratones Hq respecto a los WT (material suplementario, **Tabla S13 y S16**).

3.1.1. Estrés oxidativo en el ADN.

Se llevó a cabo la detección de 8-OHdG, mediante inmunofluorescencia, en cortes de tibial anterior de los ratones del estudio de la intervención. Puesto que el ensayo se llevó a cabo en un solo ratón de cada grupo experimental, no se pudo realizar estadística de la cuantificación. Sin embargo, teniendo en cuenta el número de imágenes analizadas (n=5), los datos sugirieron una tendencia ($p < 0,0001$) a una mayor intensidad de fluorescencia de 8-OHdG en los ratones Hq respecto a los WT. Sin embargo, los datos no sugirieron diferencias entre los ratones entrenados respecto a los sedentarios para ninguno de los genotipos (**Fig.42 A y B**).

En definitiva, el músculo esquelético del ratón Hq presentó unos mayores niveles de catalasa, aunque no de su actividad, lo que podría sugerir una mayor cantidad de H_2O_2 en las células. Además, mostró una mayor cantidad de daño por ROS en el ADN y unos mayores niveles de albúmina que en los ratones control. Por otro lado, el ejercicio físico no ejerció ningún efecto notable sobre el estrés oxidativo en el ratón Hq.

Resultados

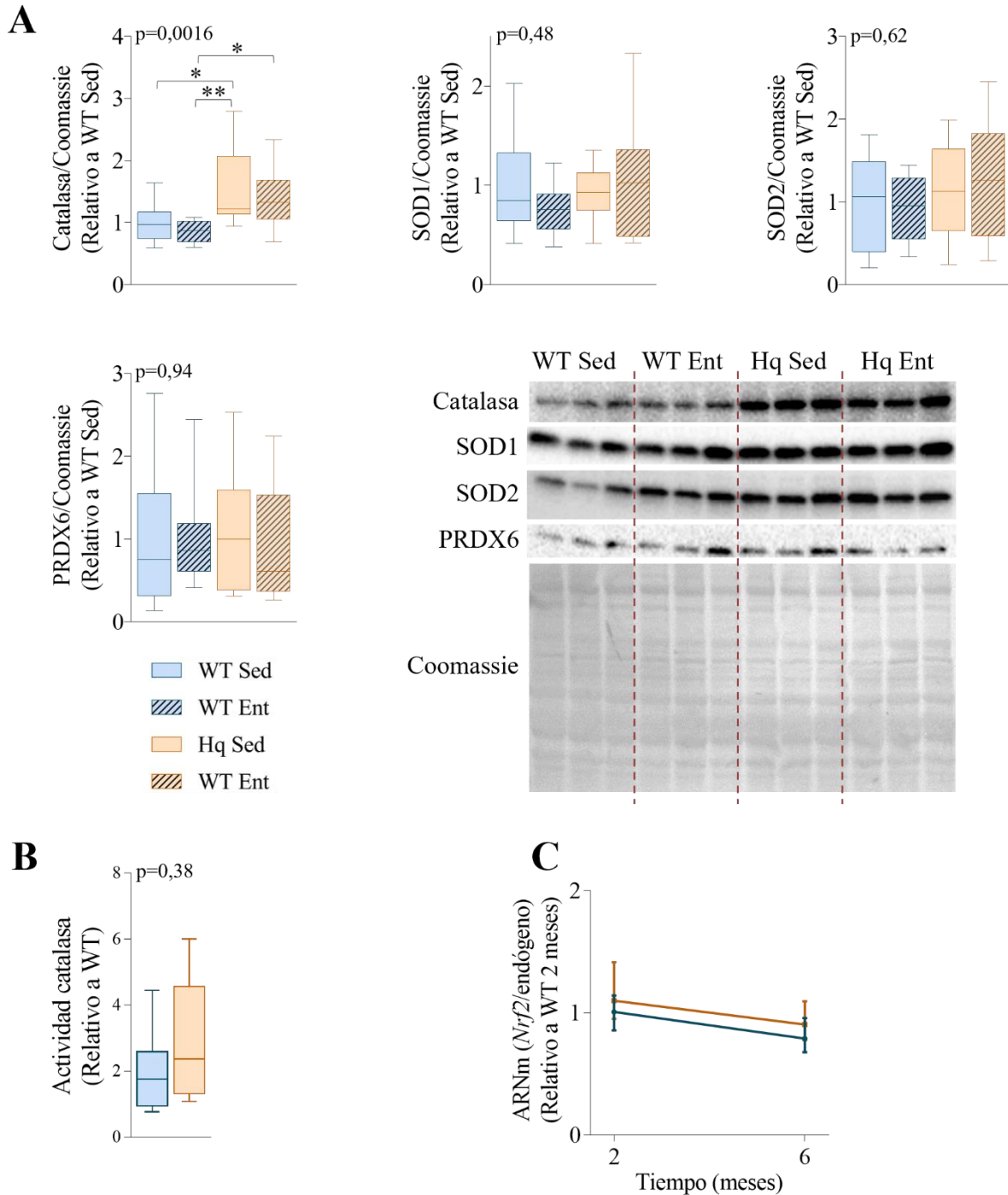


Figura 41. Estrés oxidativo en músculo esquelético. (A) Niveles de catalasa, PRDX6, SOD1 y SOD2, medidos por *western blot* en homogeneizados de cuádriceps de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. (B) Actividad catalasa en homogeneizados de cuádriceps de ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (6 meses de edad). (C) Niveles de ARNm de *Nrf2* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. Datos: (A) y (B) para cada grupo experimental ([A] $n=10-12$ ratones; [B] $n=5$ ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. (C) para cada grupo experimental ($n=5-6$ ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed y, además, en (B) respecto a la expresión de genes endógenos. Estadística: (A) se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn ($*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$; $****p<0,0001$ para pares significativamente distintos). (B) y (C) $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$; $****p<0,0001$ significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

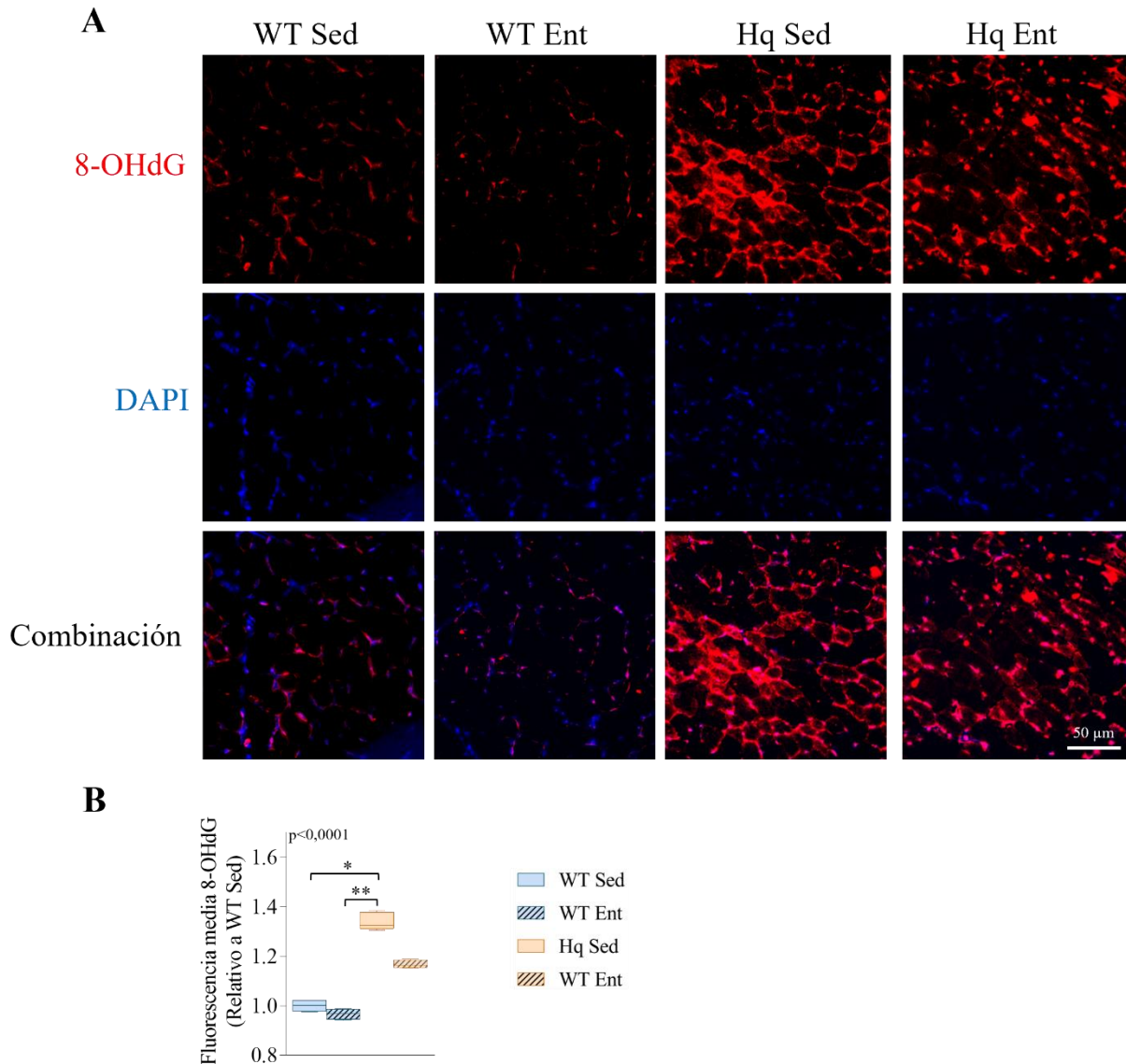


Figura 42. ROS en el ADN. (A) Detección de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), mediante inmunofluorescencia, en cortes de tibial anterior de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención (**objetivo 40x**). (B) Cuantificación de la fluorescencia media de 8-OHdG de las imágenes de (A) con el *software* ImageJ. Datos: para cada grupo experimental (n= 5 imágenes de 1 ratón) se representan la mediana, el rango intercuartílico y el valor mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

3.2. Fenotipo de la maquinaria contráctil muscular.

En primer lugar, se analizó el área de la sección transversal de las fibras musculares en cortes de tibial anterior de los animales del estudio de la intervención, marcadas con un anticuerpo contra la proteína MyHC-2b (*myosin heavy chain type IIB*). El ensayo se realizó en un solo ratón de cada grupo experimental; sin embargo, teniendo en cuenta todas las fibras medidas (n=30-60), se pudo observar una tendencia a que las fibras musculares de los ratones Hq presentasen un área menor que las fibras de los ratones WT (p=0,0016) (**Fig.43A**), lo que estaría sugiriendo un proceso de atrofia. Además, se cuantificó el número de núcleos por fibra; teniendo en cuenta el número de fibras analizadas (n=400-900), el

análisis estadístico principal mostró diferencias significativas entre grupos ($p=0,0036$), sugiriendo un menor número de núcleos/célula en los ratones Hq que en los WT (**Fig.43B**). Por otro lado, en imágenes de microscopía electrónica de cortes longitudinales de cuádriceps de ratones WT y Hq sedentarios de 6 meses de edad, se midió la distancia longitudinal entre líneas Z de los sarcómeros, sin observarse diferencias significativas entre los grupos (**Fig.43B**).

En el estudio proteómico realizado en los ratones del estudio de la intervención se identificaron varias proteínas relacionadas con la estructura y función de los sarcómeros, cuyos niveles estaban alterados en los ratones Hq (material suplementario, **Tabla S14**). Entre ellas, se encontró MyHC-2b, cuyos niveles en ratones Hq fueron aproximadamente la mitad que los de ratones WT. Además, se observaron menores niveles en los ratones Hq de la cadena ligera de la miosina reguladora o fosforilable de fibras rápidas (*myosin regulatory light chain 2 skeletal muscle*, MYL2B), de la cadena ligera esencial de la miosina (*myosin light chain 1/3 skeletal muscle*, MYL1), de la troponina C de fibras rápidas (*troponin C fast skeletal type*, TNNC2), de la troponina T de fibras rápidas (*troponin T fast skeletal type*, TNNT3), de la troponina I de fibras rápidas (*troponin I fast skeletal type*, TNNI2) y de la α -actina muscular (*actin alpha 1 skeletal muscle*, ACTA1). Por último, se vieron unos niveles mayores de PDLIM3 (*PDZ and LIM domain protein 3*) —proteína localizada en los discos Z, que favorece la unión entre la actina y la α -actinina2— en los ratones Hq que en los WT. Sin embargo, se cuantificaron los niveles de ARNm de la α -actina muscular y de la cadena pesada de la miosina rápida IIB (*Myh4*) en cuádriceps de ratones sedentarios de 2 y 6 meses, sin observarse diferencias significativas entre animales WT y Hq (**Fig 43D**).

Por último, en el cuádriceps de 1 de los 3 ratones Hq de 6 meses, visualizado en el microscopio electrónico de transmisión, se detectaron numerosas zonas en las que los sarcómeros de las fibras musculares se encontraban desorganizados y con espacios entre ellos (**Fig.43E**), lo que podría indicar un proceso de degeneración de las fibras.

En resumen, los datos obtenidos en el estudio proteómico de bíceps femoral sugirieron una pérdida de las isoformas rápidas de las proteínas contráctiles en el músculo esquelético de los ratones Hq, coherente con la atrofia muscular ya conocida en el modelo, y con la pérdida de mionúcleos. Dichas alteraciones incluyen a las cadenas esencial y reguladora de la miosina, la α -actina, y los tres componentes del complejo de la troponina: troponinas T, C e I. La ausencia de cambios en los niveles de ARNm de algunas de ellas señalaría hacia fenómenos de degradación de proteínas, y no a alteraciones en la expresión génica, hipótesis que en todo caso deberá comprobarse en estudios futuros.

Resultados

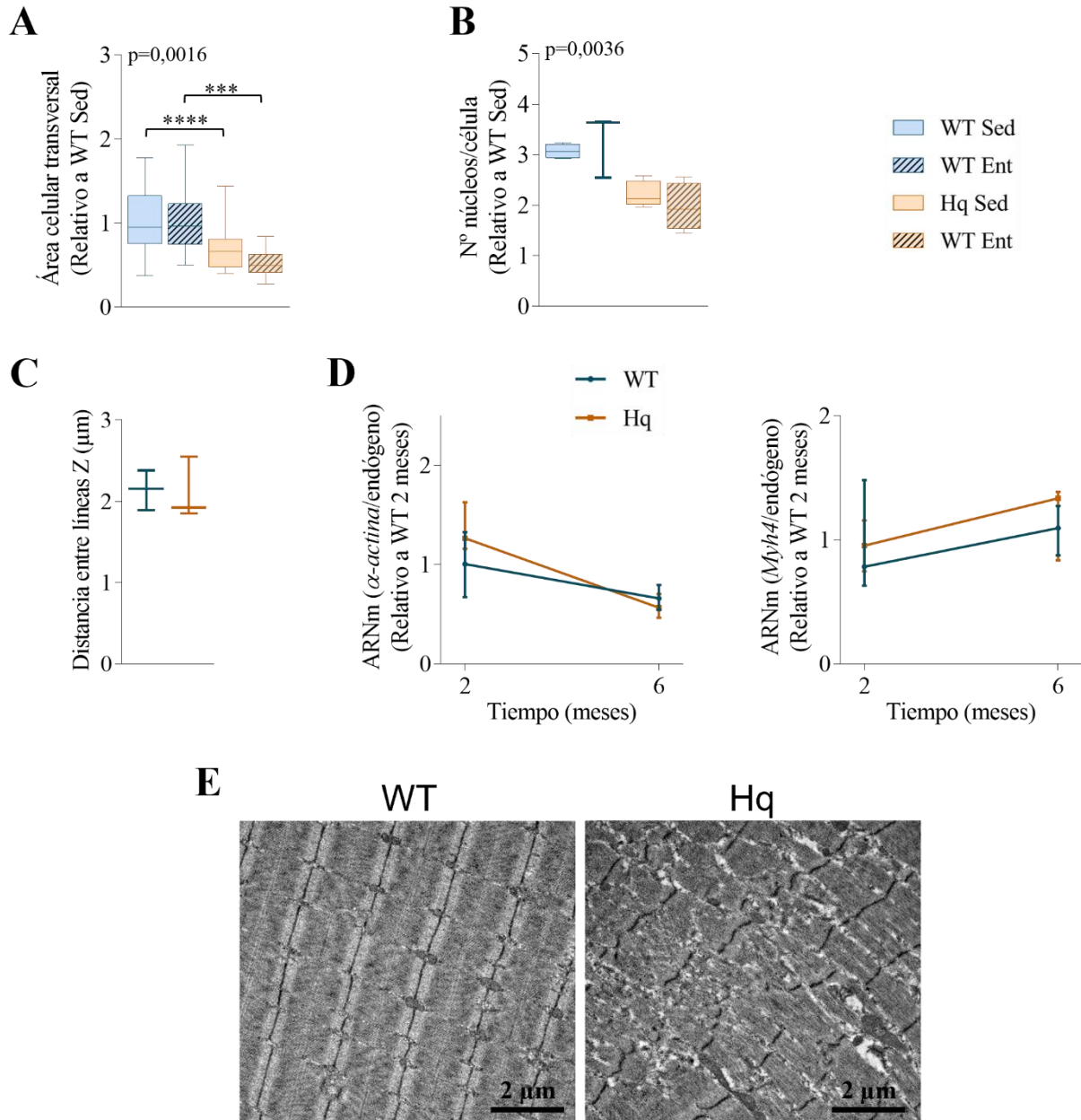


Figura 43. Fenotipo de la maquinaria contráctil muscular. (A) Área de la sección transversal celular y, (B) número de núcleos/célula en cortes transversales de fibras musculares de tibial anterior de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. (C) Distancia entre líneas Z de cuádriceps de ratones WT y Hq sedentarios de 6 meses de edad (D) Niveles de ARNm de α -actina y *Myh4* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). (E) Imágenes representativas de cuádriceps de ratones WT y Hq de 6 meses de edad (5000x). Datos: (A) y (B) para cada grupo experimental ([A] n= 30-60 fibras de 1 ratón; [B] 400-900 fibras de 1 ratón) se representan la mediana, el rango intercuartílico y el valor máximo y mínimo; (C) y (D) para cada grupo experimental ([C] n= 3 ratones; [D] n= 5-6 ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico. Estadística: (A) y (B) se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos). (C) y (D) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad (test U de Mann-Whitney).

3.3. Proteínas implicadas en el manejo de Ca^{2+} intracelular durante la contracción muscular.

En el análisis proteómico realizado en bíceps femoral de los ratones del estudio de la intervención se detectaron algunas proteínas relacionadas con el manejo de Ca^{2+} intracelular durante la contracción muscular, cuyos niveles sugerían una alteración en los ratones Hq (material suplementario, **Tabla S15**). Tal fue el caso del RYR1 (isoforma de músculo esquelético), para el que se observaron unos niveles levemente menores que en los ratones WT. Además, se encontraron niveles inferiores de SERCA1 (isoforma de fibras rápidas) en los ratones Hq. Sin embargo, se observaron unos niveles superiores de SERCA2 (isoforma cardiaca y de fibras lentas) expresándose en los ratones Hq. También se detectaron unos niveles ligeramente menores de calsecuestrina (CASQ1) en los ratones Hq, así como de la proteína TMEM38A (*trimeric intracellular cation channel type A*).

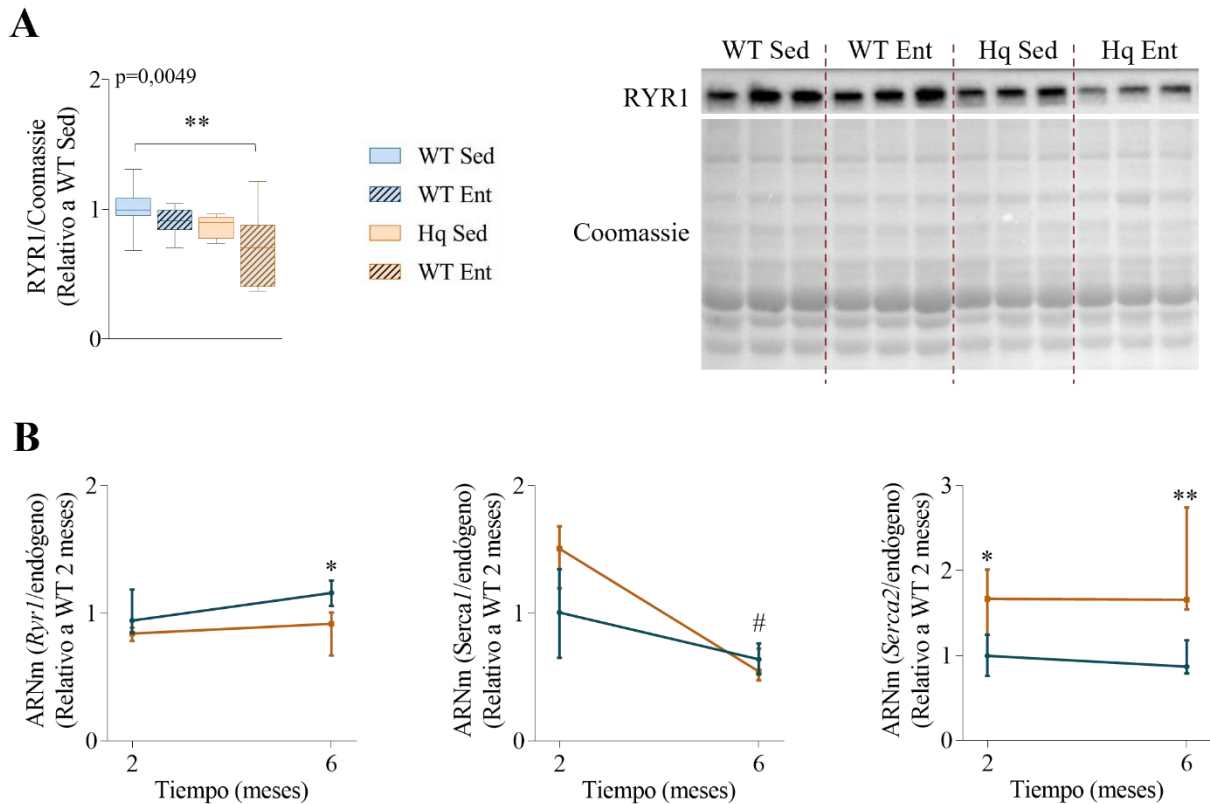


Figura 44. Proteínas implicadas en el manejo de Ca^{2+} intracelular en músculo esquelético. (A) Niveles de RYR1 medidos por *western blot* en homogeneizados de bíceps femoral de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (ent), del estudio de la intervención. (B) Niveles de ARNm de *RyR1*, *Serca1* y *Serca2* medidos mediante QuantiGene Plex en ratones WT y Hq del estudio de la evolución temporal (2 y 6 meses). **Densitometría:** el valor de cada banda fue normalizado por la proteína total del carril estimada por tinción con Azul de Coomassie. **Datos:** (A) para cada grupo experimental ($n=10-12$ ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron con respecto al WT Sed. (B) para cada grupo experimental ($n=5-6$ ratones) se representan la mediana y el rango intercuartílico. Los valores se relativizaron con respecto al WT de 2 meses. **Estadística:** (A) se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ para pares significativamente distintos). (B) * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ Hq significativamente distinto del grupo WT de su edad; # $p<0,05$ Hq 6 meses significativamente distinto de Hq 2 meses (test U de Mann-Whitney).

A partir de lo observado en el análisis proteómico, se decidió validar por *western blot* los niveles de RYR1 en bíceps femoral de los ratones del estudio del entrenamiento, encontrando diferencias significativas entre ellos. Concretamente, se vieron menores niveles en los ratones Hq que en los WT, aunque el análisis *post hoc* solo mostró diferencias significativas entre los grupos de ratones Hq entrenados y WT sedentarios (**Fig.44A**). Además, los datos de los ratones entrenados podrían sugerir un leve descenso de los niveles de RYR1 respecto a los ratones sedentarios, tanto en el caso de los Hq como de los WT (**Fig.44A**), si bien las diferencias no fueron significativas. Por otro lado, se midieron los niveles de expresión de *Ryr1* en cuádriceps de ratones WT y Hq sedentarios de 2 y 6 meses de edad, encontrándose un descenso en los ratones Hq, que fue significativo a 6 meses de edad (**Fig.44B**). En estos mismos ratones, se midieron los niveles de expresión de *Serca1*, y se observó una disminución en los niveles de los ratones Hq de 6 meses respecto a los de 2 meses, aunque en ningún caso se encontraron diferencias significativas respecto a los controles de su misma edad (**Fig.44B**). Por último, se midieron los niveles de expresión de la isoforma cardíaca *Serca2*, los cuales fueron significativamente mayores en los ratones Hq que en los WT, tanto a 2 como a 6 meses de edad (**Fig.44B**).

Los hallazgos obtenidos en esta sección sugirieron una alteración en la expresión de las proteínas relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} y el acoplamiento excitación-contracción muscular en el ratón Hq, consistentes en un menor contenido en calsecuestrina, RYR1, TMEM38A y SERCA1, compensado con la expresión aumentada de la isoforma típica de fibras lentas SERCA2. En cualquier caso, todas estas posibles alteraciones deberían ser confirmadas con estudios funcionales y la validación de todos los cambios que no ha podido ser realizada en esta memoria.

3.4. Autofagia.

Para comprobar si la autofagia podía estar alterada en músculo esquelético, y si el entrenamiento podía tener algún efecto sobre este proceso, se midieron por *western blot* los niveles de diferentes proteínas representativas de distintas fases de la autofagia, en bíceps femoral de los ratones del estudio de la intervención.

Se midieron los niveles totales de la proteína AMPK y se observó que éstos eran significativamente mayores en los ratones Hq respecto a los WT sedentarios (**Fig.45**). Sin embargo, los niveles de AMPK fosforilada en el residuo Thr172 no mostraron diferencias entre ratones WT y Hq (**Fig.45**). Además, en ninguno de los grupos experimentales el entrenamiento produjo un efecto significativo sobre los niveles AMPK total ni fosforilada (**Fig.45**).

Resultados

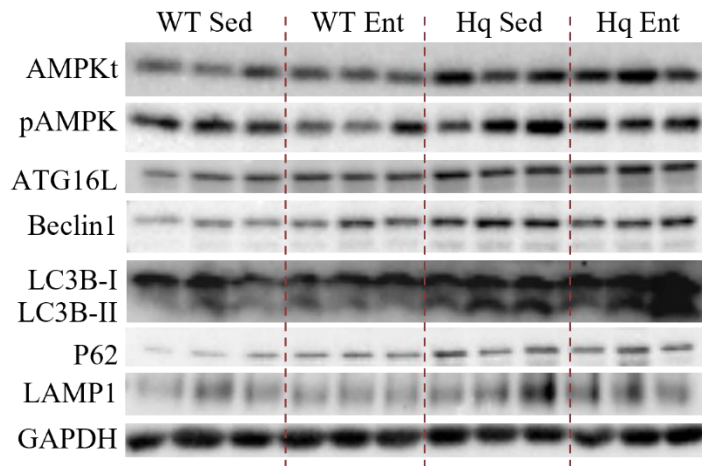
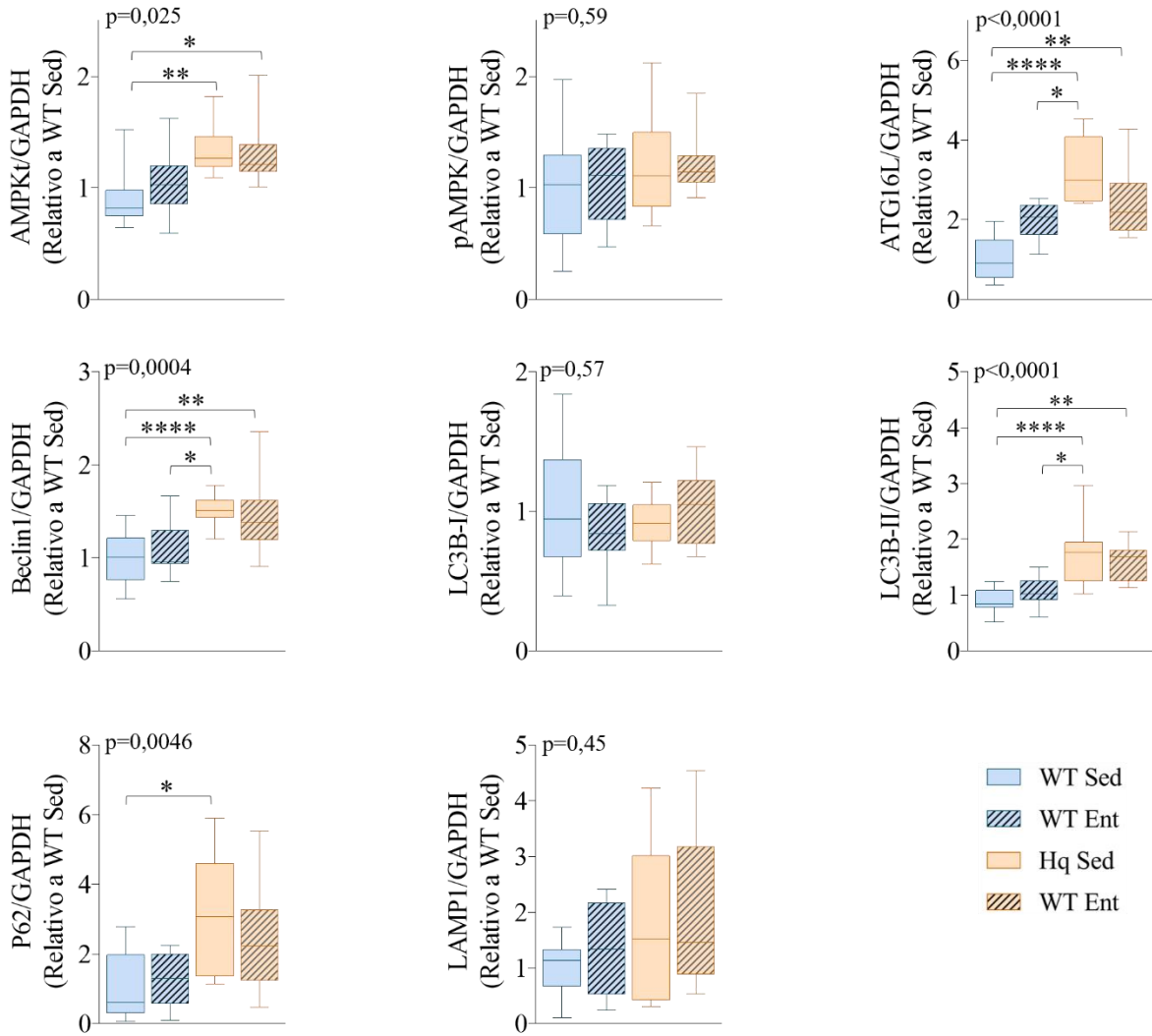


Figura 45. Autofagia en músculo esquelético. Niveles de AMPK total (AMPKt), AMPK fosforilada en el residuo Thr172 (pAMPK), ATG16L, beclin1, LC3B-I, LC3B-II, P62 y LAMP1 medidos por *western blot* en homogeneizados de bíceps femoral de ratones *wild type* (WT) y *Harlequin* (Hq), sedentarios (Sed) y entrenados (Ent), del estudio de la intervención. Densitometría: el valor de cada banda fue normalizado por la de GAPDH de su carril. Datos: para cada grupo experimental (n=10-12 ratones) se representan la mediana, el rango intercuartílico y los valores mínimo y máximo. Los valores se relativizaron respecto al promedio del grupo WT Sed. Estadística: se utilizó el test principal de Kruskal-Wallis (cuyo p valor se indica en la gráfica), y las diferencias entre pares de grupos se determinaron con el test *post hoc* de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 para pares significativamente distintos).

En cuanto a las proteínas que participan en la formación del fagóforo, ATG16L y beclin1, se observaron en ambos casos unos niveles significativamente mayores en los ratones Hq respecto a los WT sedentarios (**Fig.45**). En ninguna de ellas el entrenamiento produjo ningún efecto significativo en ninguno de los grupos experimentales entrenados en comparación a los sedentarios (**Fig.45**). Respecto a LC3B-I, no se observó ninguna diferencia entre los grupos (**Fig.45**). Sin embargo, se encontraron unos niveles de LC3B-II significativamente superiores en los ratones Hq respecto a los WT sedentarios, sin observarse ningún efecto del entrenamiento para ninguno de los genotipos (**Fig.45**). Por último, se cuantificaron los niveles de P62 y LAMP1. En el caso de P62, se vieron niveles significativamente superiores en los ratones Hq sedentarios respecto a los WT sedentarios, y ningún efecto significativo del entrenamiento en ninguno de los grupos (**Fig.45**). En el caso de LAMP1, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos experimentales (**Fig.45**).

Las evidencias obtenidas indicaron que en el bíceps femoral de los ratones Hq se produce una acumulación de marcadores de las distintas fases de la autofagia, así como un acúmulo de proteínas marcadas por p62 para su degradación, que podría contribuir a la miopatía del modelo, y que el programa de entrenamiento utilizado no fue capaz de paliar.

DISCUSIÓN

1. AIF y su función como inductora de muerte celular.

En primer lugar, en el presente trabajo se comprobó que la caída de los niveles de AIF en corazón y músculo esquelético de los ratones Hq era de aproximadamente el 95% —ligeramente mayor al 80% descrito en la literatura (199)—. Tanto en cardiomiocitos aislados de ratones Hq neonatales, como en cortes de tejido de tibial anterior de ratones Hq adultos, se observó que la cantidad residual de AIF se encontraba predominantemente localizada en los núcleos celulares y no en las mitocondrias. En la literatura, se considera la translocación de AIF al núcleo un proceso que desencadena la muerte celular (200–202). Sin embargo, en esta tesis no se detectaron núcleos apoptóticos en cardiomiocitos o en células musculoesqueléticas de ratones Hq, ni una activación de las caspasas ni indicios de muerte tipo *parthanatos*. Previamente se ha descrito que AIF sólo es capaz de interactuar con el ADN cuando la concentración de AIF y la ratio AIF/ADN son elevadas (203), por lo que es posible que esta bajísima cantidad residual de AIF no sea suficiente para inducir la degradación del ADN. Además, AIF presenta una lisina cuya ubiquitinación bloquea su unión al ADN y, por tanto, la degradación de éste (204, 205). Aunque en la presente tesis no se ha analizado esa posible ubiquitinación, dicho fenómeno podría estar teóricamente activo en el modelo, evitando la cromatinolisis.

Inesperadamente, pese a no haber encontrado un mayor nivel de muerte celular en los cardiomiocitos Hq, sí se observó un mayor número de núcleos marcados con TUNEL en las células mesoteliales del epicardio, el cual constituye la capa de células más externa que envuelve el corazón. Pese a su importante papel durante el desarrollo embrionario (206), en individuos adultos el epicardio se encuentra en un estado inactivo, aunque puede ser activado en respuesta al daño en el corazón, estimulando la regeneración de cardiomiocitos, y manteniendo la estructura cardíaca y las propiedades electrofisiológicas (207). Por tanto, un mayor nivel de muerte en las células del epicardio del ratón Hq podría afectar a su capacidad regenerativa, contribuyendo al desarrollo de una cardiomiopatía.

2. Ultraestructura, dinámica y biogénesis mitocondrial.

Gracias al análisis de la ultraestructura de las mitocondrias intermiofibrilares realizado en el corazón, se observó que los ratones Hq presentaban un menor número de mitocondrias; sin embargo, puesto que éstas tenían una mayor área y perímetro, el contenido mitocondrial total apenas cambió entre los ratones Hq y WT. Además, las mitocondrias de los corazones Hq presentaron una morfología más alargada (menor redondez y mayor diámetro de Feret) y un mayor número de contactos entre ellas. Puesto que se observaron unos niveles mayores de la proteína de fusión MFN2 en los ratones Hq a 2 y 6 meses de edad, y de OPA1 en los ratones Hq sedentarios del estudio de la intervención, el conjunto de hallazgos sugirió un aumento del proceso de fusión mitocondrial en los ratones Hq, fenómeno que se ha descrito recientemente en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en AIF (208). Sin embargo, sería necesario llevar a cabo ensayos de fusión y fisión para poder confirmar este hallazgo. En este sentido, se ha propuesto la fusión mitocondrial como un mecanismo de rescate que permite el intercambio de material entre mitocondrias funcionales y dañadas, compensándose los defectos funcionales, restableciendo la integridad de la red mitocondrial entera y potenciando la síntesis de ATP (209, 210).

Por tanto, un aumento de la fusión mitocondrial en el corazón de los ratones Hq supondría un mecanismo de compensación para diluir el daño mitocondrial, mejorando así la funcionalidad general de toda la red y la producción de energía. Además, se ha propuesto la fusión como un mecanismo que previene la activación de la mitofagia (211), lo que estaría apoyado por el hecho de que no se haya observado un mayor nivel de mitofagia en el corazón de los ratones Hq.

Por otro lado, los hallazgos respecto al contenido mitocondrial en corazón fueron contradictorios, con un mayor nivel de VDAC1 a 6 meses de edad, junto a unos niveles invariables de HSP60 y CS en los ratones Hq. Esto, sumado a que el nivel de ARNm de PGC1 α fue menor en los ratones Hq de 6 meses, y a que la actividad de CS en homogenizados totales no cambió, llevó a descartar un proceso de biogénesis mitocondrial que aumentase el contenido mitocondrial en corazón de ratones Hq sedentarios. VDAC es la proteína más abundante de la MME, y regula el transporte de numerosos metabolitos, nucleótidos e iones a través de la MME (212). Además, juega un importante papel regulando la apoptosis, por ejemplo, modulando la salida de AIF al citosol (213). Por ello, los mayores niveles de VDAC1 podrían estar relacionados con la migración del AIF residual de las mitocondrias al núcleo en los ratones Hq, y no ser un reflejo real de la cantidad de mitocondrias en el tejido.

Por último, en el músculo esquelético del ratón Hq, el análisis de la ultraestructura mitocondrial también sugirió la presencia de un menor número de mitocondrias, siendo éstas de mayor área y perímetro, más alargadas, y menos redondas y circulares. Aunque los datos mostraron una mayor variabilidad que en corazón, y no se llevó a cabo un estudio de la dinámica y biogénesis mitocondrial, los hallazgos de la ultraestructura apuntaron en la misma dirección que lo observado en corazón.

3. Alteraciones del metabolismo lipídico.

Tanto en corazón como en cuádriceps de los ratones Hq, se detectó un mayor número de gotas lipídicas respecto a los animales WT. Las gotas lipídicas son componentes celulares que pueden contener lípidos neutros, triacilglicéridos y colesterol (214); pueden formarse en diferentes contextos celulares que no son excluyentes, y contribuir a la generación de energía, la síntesis de hormonas esteroideas, la formación de membranas o a contrarrestar la síntesis de ROS (215). Se ha comprobado que, en condiciones de estrés energético, los lípidos acumulados en gotas pueden ser transferidos a las mitocondrias, suponiendo una fuente de energía. Este proceso implica unas mitocondrias más fusionadas y en contacto con las gotas lipídicas, así como un aumento de la autofagia para reponer los ácidos grasos en las gotas lipídicas (216). Durante la disección de los ratones Hq, se observó *de visu* que éstos presentaban una menor cantidad de tejido graso que los ratones WT. Esto, junto al hecho de que la mayor parte de las gotas lipídicas encontradas en corazón y cuádriceps de los ratones Hq se localizasen asociadas a mitocondrias, y a unos posibles mayores niveles de fusión mitocondrial y de autofagia, podría sugerir que se está produciendo una movilización de ácidos grasos del tejido graso al muscular, con la consiguiente formación de gotas lipídicas y la utilización de los lípidos para la generación de energía en las mitocondrias. Además, esta hipótesis también podría ser apoyada por los mayores niveles de FABPs encontrados en los ratones Hq, que son chaperonas de unión a ácidos grasos con funciones

relevantes en el importe, almacenamiento y liberación de ácidos grasos en la célula (217). De hecho, se ha observado que, en corazón y músculo esquelético, el contenido en FABPs es proporcional a la tasa de oxidación de ácidos grasos (218). Además, un estudio de nuestro grupo reveló que una sesión única de ejercicio era capaz de elevar los niveles plasmáticos de FABP3 en pacientes mitocondriales (172), probablemente para aumentar la disponibilidad de energía muscular. Por tanto, es posible que en los ratones Hq se esté produciendo como mecanismo de compensación un incremento de FABPs para potenciar el transporte de ácidos grasos a las mitocondrias para su oxidación y la obtención de energía. Sin embargo, también cabe mencionar que un aumento en la cantidad de gotas lipídicas en el contexto de un fallo OXPHOS puede darse como consecuencia de que los ácidos grasos no pueden ser metabolizados correctamente, de manera que se almacenan dentro de gotas lipídicas para evitar una situación de lipotoxicidad en la célula (219), siendo ésta otra posibilidad para explicar la mayor cantidad de gotas lipídicas en los ratones Hq.

4. Sistema OXPHOS.

La mayor parte de modelos de deficiencia de AIF estudiados hasta ahora manifiestan un déficit de los niveles del CI principalmente; y, en algunos casos, del CIV de forma más moderada (78, 80, 81). Además, en células madre embrionarias deficientes en AIF se ha descrito un nivel menor del CIII (77). En esta tesis se llevó a cabo un estudio del sistema OXPHOS con el fin de averiguar cómo la deficiencia de AIF afecta a este sistema en corazón y músculo esquelético del ratón Hq.

En el caso del corazón, no se detectaron diferencias en los niveles de ninguna de las subunidades del sistema OXPHOS entre los ratones Hq y WT a 2, 3 y 6 meses medidas en homogenizados totales. Sin embargo, al estudiar el ensamblaje de los complejos de la CTE en fracciones enriquecidas en mitocondrias de ratones de 6 meses, sí se observaron unos niveles moderadamente menores de subunidades del CI y del CIII en los complejos libres y formando parte del supercomplejo I+III₂ y del respirasoma. Además, también se encontraron menos dímeros y monómeros del CV. En el caso del CIV, se vieron niveles menores de respirasoma (probablemente debido al déficit de CI y CIII para formarlo) y una acumulación del CIV libre, por no poder formar parte del respirasoma. El hecho de que los niveles de las subunidades medidas en homogenizados totales no cambiasen, pero sí se observasen unos niveles menores de CI, CIII y CV en fracciones enriquecidas en mitocondrias, estaría indicando que no existe un fallo en la síntesis de las subunidades sino en el ensamblaje de estos complejos y supercomplejos, bien porque algunas proteínas no se estén importando correctamente al interior mitocondrial o bien porque se estén degradando por la imposibilidad de ensamblarse adecuadamente en los complejos. Pese a la existencia de estas alteraciones, no se encontró una caída en la actividad del CI ni del resto de complejos en el ratón Hq, así como tampoco del consumo de O₂ en cardiomiocitos neonatales, lo que indicaría que el defecto en el ensamblaje de los complejos CI, CIII, y CV no se traduce en un descenso relevante de su función. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las medidas de actividad enzimática se realizaron *in vitro* y en condiciones óptimas de disponibilidad de sustratos, mientras que los ensayos de respirometría se hicieron en cardiomiocitos neonatales, en los cuales es posible que sea demasiado pronto como para detectar alteraciones. Por tanto, cabe la posibilidad de que, en condiciones fisiológicas

y en animales adultos, el mecanismo de fosforilación oxidativa sí esté afectado, especialmente en situaciones de alta demanda de trabajo cardíaco. Por otro lado, los hallazgos de estas tesis correlacionaron con estudios previos que indican que en el corazón del ratón Hq no existe un déficit en los niveles ni actividad de ningún complejo de la CTE (77, 78). Sin embargo, en un modelo en el que se abolió completamente AIF en músculo esquelético y cardíaco, sí se describió una caída significativa de los niveles y la actividad del CI, y una caída más moderada del CIV (81), lo que pone de manifiesto que AIF también tiene una función esencial en el mantenimiento de la función OXPHOS en el corazón.

En cuanto al músculo esquelético, no se observaron diferencias en los niveles de subunidades OXPHOS de homogenizados totales de ratones Hq respecto a los WT. Sin embargo, el estudio del ensamblaje de los complejos en fracciones enriquecidas en mitocondrias sí sugirió menores niveles de las proteínas NDUFA9 y NDUFS1 en el CI libre y en el supercomplejo I+III₂ en los ratones Hq; y la acumulación del CIV libre, igual que sucedía en el corazón. Sin embargo, en este caso, los niveles de monómero del CV resultaron ser mayores en los ratones Hq que en los WT. Por tanto, también parece existir un defecto en el ensamblaje del CI en músculo esquelético, pero no en la síntesis de sus subunidades. En cuanto a la actividad de los complejos, los datos mostraron unos niveles inferiores del CI en los ratones Hq respecto a los WT, por lo que en este caso el defecto en el ensamblaje del CI sí estaría suponiendo un descenso de su función, que explicaría la miopatía del modelo y que correlaciona con hallazgos previos de otros autores (78, 173). Recientemente se ha observado que los fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en AIF muestran fallos en el ensamblaje, con menores niveles de supercomplejo I+III₂ y respirasoma (208), y postulan un modelo de “plasticidad”, en el cual la alteración de un complejo individual afecta a la organización de otros supercomplejos, fenómeno que podría estar ocurriendo en el corazón y el músculo esquelético del ratón Hq.

Actualmente, la hipótesis más plausible que relaciona la función de AIF con el mantenimiento de la función OXPHOS es mediante su interacción con CHCHD4, la cual participa en la ruta de importe de algunas proteínas, entre las que se encuentran subunidades de la CTE, a la mitocondria (79). En esta tesis se observó que los niveles de CHCHD4 y de su ARNm eran menores en homogeneizados totales de corazón en los ratones Hq que en los WT a todas las edades. En el músculo esquelético no fue posible detectar la proteína mediante *western blot*, pero los niveles de ARNm fueron menores en los ratones Hq. No obstante, en ninguno de los dos tejidos la caída de CHCHD4 se tradujo en un menor contenido de la proteína NDUFB7, que se importa a la mitocondria a través de esta vía, si bien este hallazgo no descarta el fallo en su importe a la mitocondria, ya que esta proteína se cuantificó en homogenizados totales y no en fracción mitocondrial. Por tanto, la menor cantidad de CHCHD4 observada podría apoyar la existencia de un fallo en el importe de subunidades del CI, que podría a su vez desencadenar el fallo en el ensamblaje y/o estabilidad del CIII y del supercomplejo I+III₂ y respirasoma, así como la acumulación del CIV libre. Sin embargo, recientemente se ha postulado que el efecto que la disfunción de AIF tiene sobre el sistema OXPHOS no depende del importe de las subunidades de los complejos de la CTE a través de CHCHD4, sino a una disfunción del complejo MICOS (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) en la MMI (220), con el que interacciona CHCHD4 (221). De hecho, se ha observado

que las células carentes de MICOS, o con fallos en su composición, exhiben un déficit de actividad del CIV, y un déficit de CI y CIV, respectivamente (222, 223). Además, MICOS interacciona físicamente con OPA1 y con el CV, desempeñando un papel importante en la formación y el mantenimiento de las crestas mitocondriales (197). Por tanto, es posible que, en el corazón del ratón Hq, el déficit de CHCHD4 desencadene una disfunción de MICOS que afecte a la formación de monómeros y dímeros del CV, produciendo inestabilidad en las crestas e impidiendo el correcto ensamblaje del CI y CIII. Además, se ha observado que la sobreexpresión de OPA1 incrementa el ensamblaje de los supercomplejos (224), por lo que el aumento de OPA1 en corazón también podría ser un mecanismo compensatorio para tratar de revertir la inestabilidad de las crestas. Por otro lado, en cuádriceps se observó un aumento de los niveles de monómero del CV, lo que hace pensar que la disfunción del complejo MICOS puede afectar de forma diferencial en distintos tejidos, o bien que en músculo esquelético existe un mecanismo compensatorio para aumentar los niveles de CV y contrarrestar así la inestabilidad en las crestas.

Por algún motivo, la deficiencia de AIF en el ratón Hq afecta de forma diferencial al sistema OXPHOS en los distintos órganos. La variabilidad entre tejidos se ha observado ya en otros casos de deficiencia de algún factor de ensamblaje de los complejos de la CTE (225, 226). No obstante, los mecanismos que explican la especificidad tisular son en su mayor parte desconocidos. El hecho de que no se haya encontrado una correlación significativa entre los niveles de AIF residuales y la actividad del CI (78) hace pensar que la pequeña cantidad residual de AIF en el corazón Hq es suficiente para mantener el correcto funcionamiento de la maquinaria OXPHOS a través de un mecanismo alternativo al que opera en otros tejidos como el sistema nervioso. Por ejemplo, es posible que AIFsh2 —isoforma de AIF cuyos niveles en el corazón Hq son similares a los WT y que no se expresa en cerebro ni en músculo esquelético (78)— esté compensando la función de AIF en el mantenimiento de la respiración mitocondrial. Por otro lado, la familia del factor inductor de apoptosis, además de AIF, consta de otras dos proteínas: AMID (*ferroptosis suppressor protein 1*), que se expresa de forma ubicua y predominantemente en corazón, es capaz de translocarse al núcleo e inducir la apoptosis (227); y AIFL (*apoptosis-inducing factor 3*), que se expresa de forma ubicua, induce apoptosis dependiente de caspasas y podría tener funciones en el mantenimiento del CI de la CTE (228). Es posible que AIF, AMID y AIFL posean actividades compensatorias en diferentes tejidos y contextos celulares, lo que podría suponer otra vía para explicar las diferencias observadas entre tejidos.

Por último, cabe mencionar que, dado que los niveles de GAPDH en corazón y cuádriceps fueron similares en los ratones Hq y WT, y que la tasa de acidificación del medio en cardiomiocitos neonatales tampoco resultó diferente en los cardiomiocitos Hq, se puede descartar una sobre activación relevante del metabolismo glucolítico en corazón y músculo esquelético del ratón Hq como compensación a la posible deficiencia en la síntesis mitocondrial de ATP.

5. Alteraciones en los niveles de aminoácidos y otros metabolitos.

El análisis de aminoácidos y derivados en los músculos estriados del ratón Hq reveló una concentración superior de la mayor parte de ellos, tanto en corazón como en cuádriceps, respecto a los animales WT

del estudio de la intervención. Datos previos del laboratorio han demostrado que, en el cerebelo del ratón Hq a 6 meses de edad, hay un déficit significativo de glutamato, que se ha atribuido a un consumo incrementado de este aminoácido para producir intermediarios anapleróticos del ciclo de Krebs (α -cetoglutarato y succinil coA) —el cual, debido al fallo mitocondrial, se encuentra parcialmente bloqueado— para promover la producción de energía. Puesto que el músculo esquelético constituye la principal reserva de aminoácidos corporales, es posible que el catabolismo muscular esté actuando como fuente alternativa de energía para el sistema nervioso central, e incluso para el propio tejido muscular, en este modelo de EM. No obstante, resulta sorprendente que pueda ocurrir también en el miocardio, sin dar lugar a atrofia cardíaca y, por el contrario, asociado al mayor riesgo de cardiomiopatía hipertrófica descrito en el ratón Hq. Por tanto, serán necesarios estudios futuros para dilucidar el papel del catabolismo de las proteínas en el corazón de este modelo de EM.

La valina y la leucina son aminoácidos ramificados que se encontraron elevados tanto en corazón como en músculo esquelético del ratón Hq. El catabolismo de los aminoácidos ramificados tiene lugar principalmente en los músculos, generando glutamato y los correspondientes ceto-ácidos ramificados, que pueden actuar como fuente de energía y servir para la síntesis de otros aminoácidos (229, 230). A partir del glutamato se pueden formar alanina y glutamina, que pueden ser secretados a la sangre para suplir las demandas de otros tejidos (231). De esta manera, es posible que la valina y leucina muscular estén actuando como fuentes de glutamina y alanina. A su vez, la glutamina podría migrar al cerebelo donde generaría más glutamato, mientras que la alanina podría llegar al hígado para sintetizar glucosa, la cual sería después exportada a otros tejidos que la requieran, como el cerebelo. Esta hipótesis se apoyaría en que, en el suero de ratones Hq de 6 meses de edad, se detectaron unos niveles considerablemente mayores de alanina, y ligeramente superiores de glutamina (datos no mostrados).

Asimismo, la ornitina puede ser transformada en glutamato, así como en prolina o citrulina. A su vez, la ornitina se puede formar a partir de la arginina (232). Los niveles superiores de estos cuatro metabolitos encontrados en cuádriceps del ratón Hq podrían sugerir un mecanismo de envío de precursores de glutamato, que serían exportados a la sangre para satisfacer las necesidades del cerebelo. Además, la lisina también puede ser transformada en glutamato (233, 234), por lo que los mayores niveles encontrados en cuádriceps podrían suponer otra fuente de glutamato.

Por otro lado, se ha descrito que un defecto OXPHOS puede dar lugar a un incremento en la síntesis de serina (235, 236), cuyo catabolismo produce glicina y metabolitos de 1 carbono, que constituyen importantes intermediarios para la síntesis de nucleótidos, lípidos y glutatión; contribuyen al ensamblaje del CI y al mantenimiento de la respiración celular (237). Por tanto, un aumento de serina en el corazón de los ratones Hq podría sugerir la existencia de este mecanismo compensatorio para generar metabolitos de 1 carbono que promueven el mantenimiento de la respiración mitocondrial.

6. Alteraciones del grupo hemo.

El estudio proteómico realizado en corazón permitió detectar alteraciones en proteínas relacionadas con la síntesis y transporte del grupo hemo en los ratones Hq. Se corroboró una tendencia a unos niveles menores de hemoglobina β y de ARNm de la mioglobina. Aunque el déficit de hemoglobina β podría deberse a un menor contenido de glóbulos rojos en sangre, las alteraciones en la mioglobina y la menor cantidad de ferroquelatasa detectada mediante el análisis proteómico sugirieron que los ratones Hq presentan un fallo general en la síntesis del grupo hemo, ya que la ferroquelatasa cataliza la última reacción de la biosíntesis del grupo hemo en la mitocondria (238). Recientemente se ha descrito una interacción entre la ferroquelatasa y la proteína del complejo MICOS, Mic60, necesaria para la correcta biosíntesis del grupo hemo (239). Así, podría ocurrir que una disfunción de MICOS causada por la deficiencia de CHCHD4 disminuya los niveles de ferroquelatasa en los ratones Hq. Como consecuencia, el déficit de grupo hemo daría lugar a unos menores niveles de las enzimas que lo contienen, tales como hemoglobina, mioglobina, o incluso algunas subunidades de los complejos de la CTE, en cuyo ensamblaje el grupo hemo juega un importante papel (240). Otra posible explicación para la síntesis disminuida del grupo hemo podría constituirlo el hecho de que el succinil coA, implicado en la formación del ácido δ -aminolevulínico (primer intermediario de la síntesis del grupo hemo), fuese un factor limitante debido a que esté siendo utilizado preferentemente para la generación de energía a través del CII de la CTE (241). Por otro lado, la hemopexina es una proteína plasmática encargada de transportar el grupo hemo libre en el plasma, disminuyendo su capacidad de generar radicales hidroxilo (242). Una vez en los hepatocitos, el grupo hemo puede ser catabolizado o reutilizado para la síntesis de nuevas hemoproteínas (243). Los mayores niveles de hemopexina en los ratones Hq sugeridos por el estudio proteómico podrían estar tratando de recuperar el hemo libre de la sangre y llevarlo a los hepatocitos, donde sería reutilizado para sintetizar más hemoproteínas y compensar así el déficit en la síntesis *de novo* del grupo hemo. Por último, el estudio proteómico también detectó en los ratones Hq un mayor nivel de serotransferrina, proteína que une Fe^{3+} en la sangre y lo transporta a los lugares de absorción, utilización o almacenamiento (244). Es posible que, del mismo modo que sucedería con la hemopexina, los ratones Hq incrementen los niveles de serotransferrina para captar todo el Fe^{3+} posible para aumentar la síntesis del grupo hemo.

7. Estrés oxidativo.

Según un estudio previo realizado en el corazón del ratón Hq, éste no presenta signos de estrés oxidativo en condiciones basales, pero sí tras realizar una constricción de la aorta transversal (245). Sin embargo, en esta tesis se comprobó que el corazón Hq contiene unos niveles significativamente mayores de PRDX6 respecto al WT a 2 y 6 meses de edad, con unos mayores niveles de oxidación en el residuo Cys47 de su sitio catalítico, lo que podría ser una señal indirecta de una mayor demanda de trabajo de esta enzima, es decir, de estrés oxidativo. Además, se observó una tendencia a que los cardiomiocitos Hq tuviesen una menor capacidad de eliminar las ROS. De hecho, se comprobó que la actividad de la catalasa era menor en el corazón Hq a 6 meses de edad. Así, la menor actividad catalasa podría estar contribuyendo a la acumulación de H_2O_2 en las células Hq, con el consecuente aumento de PRDX6,

cuya principal función es eliminar H_2O_2 , hidroperóxidos derivados de fosfolípidos, hidroperóxidos orgánicos de cadena corta y peroxinitrito (196). Además, las inmunofluorescencias en las que se detectó 8-OHdG sugirieron un estrés oxidativo mayor en el ADN mitocondrial de los ratones Hq respecto a los WT, debido posiblemente a la mayor proximidad del ADN mitocondrial y a la CTE, principal generadora de ROS (246).

Por otro lado, en músculo esquelético del ratón Hq, está descrito un aumento moderado de la actividad SOD, así como un aumento del doble de la actividad catalasa (78). Sin embargo, en esta tesis no se observó un aumento significativo de la actividad catalasa en cuádriceps de ratones Hq, aunque sí de los niveles de proteína. Esta aparente discrepancia puede ser debida a que el número muestral empleado sea insuficiente para detectar las diferencias de actividad, o a que se hayan estudiado distintos tipos de músculo esquelético. Además, también se observó una cantidad notablemente mayor de estrés oxidativo en el ADN de los ratones Hq respecto a los WT, tanto en el ADN nuclear como en el mitocondrial, similar a lo observado previamente en el sóleo y el EDL de los ratones Hq (120).

Tanto en corazón como en músculo esquelético de los ratones Hq, el análisis proteómico reveló un mayor nivel de albúmina, así como unos mayores niveles de oxidación en varias de sus cisteínas. La albúmina es la proteína más abundante del plasma y posee importantes propiedades antioxidantes, siendo capaz de actuar como tamponadora del exceso de ROS para evitar que se oxiden otras proteínas (247). En otros modelos de degeneración muscular se ha observado un incremento de la albúmina (248, 249), por un aumento en la permeabilidad capilar y una menor eliminación por vía linfática (250), lo que podría ocurrir también en el ratón Hq con el fin de evitar la oxidación de otras proteínas.

En conjunto, en ambos tejidos del ratón Hq, los datos apuntaron hacia un incremento en el estrés oxidativo, en línea con lo observado previamente en otros tejidos del ratón Hq como el cerebelo (199, 251), pero no en otros modelos de deficiencia de AIF (80, 91). En este sentido, el CI es el mayor responsable de la generación de fuerza protón motriz y el mayor productor de ROS (252). Además, se cree que la formación de supercomplejos facilita la transferencia de electrones, aumentando la eficiencia del proceso y disminuyendo la generación de ROS, por lo que un fallo en su ensamblaje podría contribuir al aumento del estrés oxidativo (35). Por otro lado, se ha comprobado que las células carentes en AIF suplementadas con glutatión no restauran el defecto en la respiración, indicando que la detoxificación de las ROS no es suficiente para revertir el fallo en el ensamblaje del CI (77). Con todo, parecería que el fallo en el ensamblaje de los complejos y supercomplejos observado en esta tesis, y no la pérdida de AIF, es la causa del aumento de ROS en las células.

8. Fenotipo de la maquinaria contráctil.

En el corazón de los ratones Hq del estudio de la intervención, el análisis proteómico identificó diversas proteínas estructurales de los sarcómeros (miosinas, actinas y troponinas), cuyos niveles fueron menores que en los ratones WT. Además, se comprobó mediante *western blot* que los niveles de 3 de ellas —MYL3, TNNI3 y TNNC1— eran significativamente menores en los ratones Hq. El déficit en proteínas del sarcómero podría ser consecuencia del catabolismo proteico más activo. Las consecuencias de la

pérdida de estas proteínas no están claras, si bien cabe especular con que estén implicadas en el mayor riesgo de fallo cardiaco presente en el modelo (88). En este sentido, hay que destacar que, en humanos, mutaciones en MYL3 se han asociado a cardiomiopatía hipertrófica (253–255). Respecto a la pérdida de troponinas, ésta puede tener un impacto importante en el corazón, pues se encargan de regular la interacción actina-miosina, la generación de fuerza y la relajación cardíaca (256). Por ejemplo, se ha descrito que la pérdida de TNNI3 conduce a un fallo en la relajación del miocardio y, como consecuencia, al desarrollo del fallo cardiaco (257). No obstante, hacen falta más estudios para dilucidar la causa y los efectos específicos de estas alteraciones en el ratón Hq.

Inesperadamente, en los ratones del estudio de la evolución temporal, únicamente se vio un descenso en MYL3, mientras que TNNI3 y TNNC1 presentaron unos niveles superiores en los ratones Hq respecto a los WT. Esta discrepancia podría atribuirse a diferencias en los fondos genéticos de ambos grupos de ratones, que en ambos casos presentan un fondo genético mixto (B6CBACa, Aw-J/A), pero los cruces realizados para la obtención de los animales fundadores de la colonia del estudio de la evolución temporal implicaron una mayor proporción del fondo C57BL/6J.

En cuanto al músculo esquelético, se observaron fibras de menor área en el tibial anterior de los ratones Hq respecto a los WT. Sin embargo, al no haberse detectado indicios de muerte celular ni pérdida de fibras, este hallazgo estaría indicando un proceso de atrofia y no de hipoplasia, fenómeno ya descrito por otro grupo tanto para músculos rápidos como lentos del ratón Hq (120). Además, puesto que la atrofia muscular está asociada a una pérdida de núcleos (258), los datos referentes al número de núcleos por fibra, menor en los ratones Hq, confirmaron los datos previamente descritos en la literatura (120). Por último, el análisis proteómico realizado en bíceps femoral reveló menores niveles de diversas isoformas rápidas de proteínas de los sarcómeros en los ratones Hq, coherente con la transición de fibras rápidas a fibras lentas ya descrita en el sóleo y el EDL de este modelo (120).

9. Manejo de Ca²⁺ intracelular en el acoplamiento excitación-contracción.

Con el objetivo de analizar si existían alteraciones en el mecanismo de acoplamiento E-C en los cardiomiocitos de los ratones Hq, se llevó a cabo un estudio del manejo de Ca²⁺ intracelular en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratones de 6 meses de edad. No se detectaron alteraciones en la liberación transitoria de Ca²⁺ durante la sístole. En cambio, sí se observó que los cardiomiocitos Hq tardaban más tiempo que los WT en captar el Ca²⁺ de nuevo al RS. En este sentido, se encontraron evidencias de una mayor oxidación de la Cys498 en la proteína SERCA2, que podría estar relacionada con una posible reducción en su actividad (259–261). Además, también se detectaron niveles más bajos de su ARNm, que podrían deberse a una regulación a la baja en respuesta al daño oxidativo crónico. Sin embargo, sorprendentemente los niveles de proteína y actividad *in vitro* de la SERCA2 fueron mayores en los ratones Hq que en los WT. Se podría especular con que la célula trate de compensar la regulación negativa de la actividad con un aumento en los niveles de proteína. Por el contrario, que la actividad *in vitro* fuese más alta en los ratones Hq no tiene una explicación aparente, salvo que en esas condiciones

no hay limitación en la cantidad de ATP para la catálisis, como sí puede ocurrir *in vivo*, lo cual, sumado a la mayor cantidad de proteína, conduciría a una mayor actividad.

Por otro lado, se observó que la carga total de Ca^{2+} almacenada en el RS fue menor en los cardiomiocitos Hq que en los WT, y que esto se debía —además de a una posible menor actividad de SERCA2— a una mayor fuga de Ca^{2+} en forma de *sparks* a través de los RYRs durante la diástole. Este aumento en la fuga de Ca^{2+} estaba causado por un mayor número de agrupaciones de RYRs en los que se producían los *sparks*, y por una mayor probabilidad de apertura de éstos. De hecho, se observaron unos mayores niveles de RYR2, así como de su forma fosforilada en el residuo Ser2814 (que indicaría una mayor probabilidad de apertura) en los ratones Hq respecto a los WT. También se detectaron unos mayores niveles de FKBP12, cuya unión al RYR2 induce su activación (262). En cambio, se observó una tendencia a un menor nivel de ARNm de *Ryr2* en los ratones Hq, lo que podría tratar de compensar el exceso de actividad del RYR2 para evitar una fuga excesiva de Ca^{2+} . Sin embargo, a pesar de que los cardiomiocitos Hq presentaron una menor carga total de Ca^{2+} en el RS, esto no afectó de forma significativa a la liberación transitoria de Ca^{2+} . No obstante, durante la liberación transitoria de Ca^{2+} en la contracción, aproximadamente entre el 40 y el 60% del total de Ca^{2+} del RS sale al citosol, quedando un reservorio de Ca^{2+} dentro del RS (263, 264), lo que hace posible que los cardiomiocitos Hq tengan suficiente Ca^{2+} en el RS como para llevar a cabo la contracción a pesar de la fuga ocasionada por los *sparks*. Aun así, puesto que se ha relacionado el aumento en la frecuencia de *sparks* de Ca^{2+} con la probabilidad de desarrollar arritmias (188, 265), sería conveniente estudiar si los ratones Hq presentan una mayor probabilidad de sufrirlas que los WT.

Aunque el citado incremento en los niveles de fosforilación de RYR2 en el residuo Ser2814, que es dependiente de la proteína CAMKII, pudiera ser el responsable del aumento en la frecuencia de *sparks* de Ca^{2+} (266–268), es posible que se den otros mecanismos que contribuyan a la fuga de Ca^{2+} . Por ejemplo, se ha relacionado el incremento en la producción de ROS mitocondrial con una mayor probabilidad de apertura del RYR2 (269–271). De hecho, se ha considerado al RYR2 como un sensor redox, ya que contiene una alta presencia de residuos cisteína muy reactivos (272–274). Además, la activación del RYR2 por un aumento de ROS no solo implica su oxidación directa sino su activación a través de la oxidación de sus proteínas reguladoras, como la CAMKII (275), por lo que el aumento del estrés oxidativo en el corazón de los ratones Hq podría contribuir a la mayor actividad del RYR2.

Por otro lado, el análisis proteómico en corazón sugirió alteraciones en los niveles de algunas proteínas relacionadas con el manejo de Ca^{2+} en el acoplamiento E-C. Se detectaron unos menores niveles de juntofilina 2 en los ratones Hq, proteína que forma complejos de unión entre la membrana plasmática y el RS, y que se une directamente a los RYRs, facilitando su inactivación y previniendo la salida de Ca^{2+} durante la diástole (276). Por tanto, unos niveles menores de juntofilina 2 podrían contribuir al aumento de la frecuencia de *sparks* de Ca^{2+} . Asimismo, se detectaron mayores niveles de las proteínas calsecuestrina cardiaca, sorcina y calreticulina en los ratones Hq respecto a los WT. La calsecuestrina, además de actuar como un almacén de Ca^{2+} en el RS, es capaz de inhibir la actividad del RYR2 cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RS es baja (277). Por su parte, la sorcina puede interactuar tanto con RYR, inhibiendo

su función, como con la SERCA, activándola, de manera que promueve el almacenamiento de Ca^{2+} en el RS (278). Por tanto, es posible que el aumento de calsecuestrina y sorcina suponga un mecanismo para inhibir la actividad del RYR2 y contrarrestar la fuga excesiva de Ca^{2+} . Por último, la calreticulina es una chaperona de unión a Ca^{2+} del RS, que es sobre expresada en situaciones de estrés del RS o metabólico, afectando a la capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} en el RS, así como su entrada y liberación al citosol (279). Los niveles de calreticulina pueden aumentar en situaciones de estrés oxidativo (280), lo que podría explicar el aumento de los niveles de proteína y de los residuos cisteína oxidados de ésta encontrados en los ratones Hq.

En cuanto al músculo esquelético, aunque el análisis realizado fue preliminar, también se encontraron algunas alteraciones en proteínas relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} en el acoplamiento E-C. El análisis proteómico sugirió unos menores niveles de SERCA1, RYR1, calsecuestrina muscular y TMEM38A (canal iónico del RS que favorece la liberación de Ca^{2+} mediante la entrada de K^+ al RS) en los ratones Hq. De hecho, se comprobó que existían unos menores niveles de RYR1, tanto de proteína como de ARNm. Además, los niveles de ARNm de SERCA1 sugirieron un descenso con la edad en los ratones Hq, ya que fueron notablemente menores a 6 que a 2 meses. Sin embargo, es posible que el hecho de que los niveles de estas proteínas fueran menores en los ratones Hq de 6 meses se deba a la atrofia de las fibras musculares, como se observó en las imágenes de microscopía electrónica correspondientes a 1 de los 3 ratones fotografiados. Por último, se observó un mayor nivel de la proteína SERCA2 en los ratones Hq —que corresponde a la isoforma de SERCA mayoritariamente expresada en corazón y en fibras lentas del músculo esquelético—, tanto en el estudio proteómico como en los niveles de ARNm medidos, que podría atribuirse a la transición de fibras rápidas a fibras lentas que se produce en el músculo esquelético del ratón Hq (120).

10. Autofagia.

En corazón del ratón Hq se encontraron unos niveles superiores de mTOR fosforilada en el residuo Ser2448, que estarían indicando un estado más activo de esta proteína (281). Este hallazgo concuerda con lo observado en músculo esquelético de un modelo de ratón *knock in* con una delección en la arginina 201 de AIF, en el que se observó un aumento de actividad de mTOR, además de un incremento de MTHFD2 (*bifunctional methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase*), una de las enzimas involucradas en el metabolismo de compuestos de 1 carbono dependiente del ciclo del folato (282). Además, en otros modelos como el ratón *Deletor* —que presenta miopatía, cardiomiopatía hipertrófica y riesgo de arritmias por un fallo en la helicasa Twinkle— también se ha observado un aumento de la actividad de mTOR, con un incremento del ciclo del folato y una acumulación de marcadores autofágicos por un flujo interrumpido (283). Los hallazgos observados en corazón del ratón Hq parecen ir en esta línea, con una acumulación de marcadores de autofagia y un aumento de la actividad de mTOR. Sin embargo, paradójicamente, el análisis del flujo autofágico con leupeptina indicó un flujo autofágico más activo en el ratón Hq, contrariamente a lo observado en el ratón *Deletor*. Una hipótesis para tratar de explicar esta aparente contradicción podría ser que mTOR se active para promover el metabolismo

de 1 carbono, con el objetivo de contribuir a mantener el sistema OXPHOS mediante la metilación del ARNt, lo que potencia la traducción de proteínas codificadas en el ADNmt (284). A la vez, también podría estar activándose la autofagia por una vía independiente de mTOR (285), con el fin de llevar a cabo procesos catabólicos que generen una mayor cantidad de metabolitos necesarios para satisfacer los requerimientos energéticos del propio tejido muscular y del cerebelo, así como de aminoácidos necesarios para el ciclo del folato, como la serina, cuyos niveles fueron superiores en ratones Hq. En cuanto al músculo esquelético, también se vio una acumulación de marcadores autofágicos. Sin embargo, no se pudo analizar el flujo autofágico ni medir los niveles de mTOR, aunque cabe pensar que exista un paralelismo entre este tejido y el corazón.

Por otro lado, en los animales Hq tratados con leupeptina los niveles de NDUFB8, VDAC1 y TOM20 no cambiaron respecto a los no tratados, de lo que se dedujo que la disfunción mitocondrial no aumentó la degradación de mitocondrias por mitofagia. Sin embargo, los niveles superiores de ATP5A en los ratones tratados respecto a los ratones sin tratar permiten pensar que esta proteína mitocondrial sí se degrada por la vía lisosomal, hallazgo que concuerda con trabajos previos que describen que la autofagia actúa selectivamente sobre algunas proteínas mitocondriales (286).

Por último, también se observó un aumento de niveles de la subunidad 26S del proteasoma en el corazón de los ratones Hq, lo que quizás indicaría una activación de este sistema de degradación, y podría explicar los mayores niveles de P62, ya que esta proteína también une las proteínas ubiquitinadas al proteasoma (287).

11. Alteraciones en los niveles de anexinas.

La detección de unos niveles más altos de algunas anexinas en corazón de los ratones Hq hizo pensar en una posible inducción de la apoptosis, debido a la conocida implicación de las anexinas en este proceso (195, 288, 289). Sin embargo, al no observarse muerte celular en el miocardio de los ratones Hq, parece más probable que el incremento en los niveles de anexinas esté relacionado con otra función de éstas en la célula. Se ha relacionado a la anexina A1 con la mejora de la capacidad de regeneración y la función cardíaca tras un infarto de miocardio (290, 291); y a la anexina A5 con una reducción del área de infarto y una mejora de la función cardíaca, gracias a la reducción de la respuesta inflamatoria (292), acciones protectoras que podrían estar realizando en el miocardio del ratón Hq. Hay que destacar que se ha descrito que un incremento en los niveles de anexina A3 puede aumentar los niveles de autofagia y disminuir la apoptosis a través de la vía PKC δ /p38 MAPK (293); y que la anexina A5 puede incrementar la degradación por la vía lisosomal, induciendo la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas (294). Por tanto, es posible que el aumento en los niveles de anexinas en el corazón de los ratones Hq esté relacionado con la inducción de la autofagia observada. Por otro lado, las anexinas tienen un papel importante en la regulación del Ca²⁺ en los cardiomiocitos. Por ejemplo, se ha observado que la proteína S100A11 —proteína que se encuentra incrementada en el análisis proteómico del corazón en los ratones Hq— es capaz de interactuar con la anexina A1 (295), así como la sorcina interactúa con la anexina A7 (296). A pesar de que no se conocen bien los mecanismos, esto sugiere que las anexinas pueden

jugar un papel en el mantenimiento de la homeostasis del acoplamiento E-C (297), por lo que es posible que los mayores niveles de anexinas en el corazón de los ratones Hq estén relacionados con las alteraciones en este proceso.

12. Efectos del programa de entrenamiento en el músculo estriado del ratón Hq.

Uno de los objetivos de la presente tesis fue dilucidar las bases moleculares en los músculos estriados que subyacen a las mejoras funcionales que un programa de entrenamiento combinado de resistencia y fuerza produjo en el ratón Hq (173). En primer lugar, se determinó que el entrenamiento fue seguro para los ratones, ya que no indujo un aumento de la apoptosis ni en los cardiomiocitos ni en el músculo esquelético de los ratones entrenados, así como tampoco se habían observado indicios de necrosis ni daño muscular, ya que los niveles de creatina quinasa en plasma fueron normales (173). Además, tampoco se observaron diferencias en los niveles de proteínas de los sarcómeros por efecto del entrenamiento ni en el corazón ni en el músculo esquelético de los ratones Hq ni de los controles, por lo que el ejercicio no provocó una mayor proteólisis de las proteínas de los sarcómeros.

El corazón es un órgano con una alta demanda de energía, que se incrementa durante el ejercicio físico. Sin embargo, en esta tesis no se observó un aumento en la biosíntesis de los complejos OXPHOS, ni en los ratones Hq ni en los WT. Algunos estudios han observado un aumento de la biogénesis mitocondrial en cardiomiocitos en respuesta al ejercicio (298, 299). El mayor nivel de VDAC1 en el corazón de los ratones WT entrenados respecto a los sedentarios podría indicar una adaptación en este sentido. Sin embargo, no se observó este mismo efecto en ratones Hq, quizás porque los niveles de VDAC1 ya se encontraban elevados en los ratones Hq sedentarios respecto a los WT por efecto de la enfermedad, habiendo llegado al límite en el cual el entrenamiento no era capaz de incrementarlos más. También se observó una tendencia a aumentar los niveles de CS en los ratones entrenados respecto a los sedentarios, tanto en los WT como en los Hq, aunque la diferencia no llegó a ser significativa. Sin embargo, HSP60 permaneció invariable en los ratones entrenados respecto a los sedentarios. Puesto que no todos los datos apuntaban en la misma dirección, no fue posible afirmar que el entrenamiento indujera un proceso adaptativo que aumentase el contenido mitocondrial los ratones Hq. Por otro lado, apenas existen evidencias claras sobre el impacto que el entrenamiento tiene sobre la fusión y fisión mitocondrial en corazón. De hecho, en algunos modelos se han encontrado evidencias de fisión (300), y en otros de fusión mitocondrial (301), tras un programa de entrenamiento. En el presente trabajo, se observó una tendencia a aumentar los niveles de OPA1 en los ratones WT entrenados respecto a los sedentarios. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en los ratones Hq entrenados respecto a los sedentarios, quizás porque los ratones Hq ya presentaban unos mayores niveles de esta proteína que los WT por efecto de la patología. Por tanto, parece que algunas de las posibles adaptaciones que induce el entrenamiento en el miocardio ocurren de manera compensatoria por efecto de la propia patología, por lo que la intervención no es capaz de aumentar dicha respuesta más allá.

En el músculo esquelético no se encontraron diferencias en los niveles de ninguna subunidad OXPHOS ni de la actividad de los complejos de la CTE en los ratones entrenados respecto a los sedentarios, ni en

los Hq ni en los WT. Además, los niveles de actividad de CS medidos en homogenizados totales de cuádriceps no cambiaron en los ratones Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios. Sin embargo, nuestro grupo había descrito previamente un aumento en la actividad de CS medida en homogenizados totales de bíceps femoral en los ratones Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios, acompañado de un incremento de la actividad de los complejos CI, CIII y CV (173). Esto, junto a un incremento en los niveles de PGC1 α , indicaría un aumento en la biogénesis mitocondrial en los ratones Hq por efecto del entrenamiento (173). Puesto que no se observó una inducción de la biogénesis mitocondrial en el cuádriceps de los ratones Hq entrenados, cabe pensar que no todos los músculos esqueléticos experimentan el mismo tipo de adaptación al ejercicio, pese a que el bíceps femoral y el cuádriceps son músculos similares, con una predominancia de fibras rápidas.

En las últimas décadas, numerosos estudios han demostrado que el ejercicio físico está asociado a un aumento en los niveles de ROS (302). De hecho, es capaz de incrementar la capacidad antioxidante de SOD1, SOD2 y catalasa tanto en corazón como en músculo esquelético (303). Sin embargo, las consecuencias del incremento de ROS son controvertidas, ya que puede tanto promover una adaptación fisiológica de los tejidos al ejercicio como dañar las estructuras macromoleculares de proteínas, lípidos o el ADN tras un ejercicio prolongado (302). Los resultados de esta tesis mostraron que, en el corazón, no hubo cambios en los niveles de SOD1, SOD2, PRDX6 y catalasa en los ratones entrenados respecto a los sedentarios, ni en los Hq ni en los WT. De ello se dedujo que el ejercicio no aumentó el estrés oxidativo en el corazón, así como tampoco promovió ninguna adaptación al entrenamiento mediada por ROS. Por otro lado, el músculo esquelético es una importante fuente de ROS durante el ejercicio físico (302), suponiendo un estímulo adaptativo durante un entrenamiento agudo o crónico (304). En esta tesis no se vio ningún cambio en los niveles de SOD1, SOD2, PRDX6 y catalasa, ni en el estrés oxidativo reflejado en el ADN, en los ratones Hq entrenados respecto a los sedentarios. Sin embargo, datos previos del laboratorio habían mostrado un descenso de los niveles de catalasa en bíceps femoral de ratones Hq entrenados respecto a los sedentarios, sugiriendo un descenso del estrés oxidativo en el músculo de los ratones Hq (173). No obstante, esta discrepancia puede deberse a que los niveles de catalasa en esta tesis se midieron en cuádriceps, por lo que, como ya se ha mencionado, distintos músculos pueden presentar adaptaciones diferentes al entrenamiento. De hecho, si el ejercicio incrementa o no los niveles de catalasa en el músculo es un tema controvertido, con estudios que apuntan en direcciones opuestas (303).

Durante el ejercicio físico, la demanda de O₂ se incrementa para aumentar el rendimiento muscular, por lo que se requiere un mayor transporte de O₂ en la sangre. De hecho, en diversos estudios se ha observado un incremento del nivel de hemoglobina como adaptación al entrenamiento (305–307). Los datos del análisis proteómico realizado en corazón mostraron un aumento en los niveles de las subunidades β 1 y β 2 de la hemoglobina en los ratones Hq entrenados respecto a los Hq sedentarios. Este aumento podría sugerir una adaptación al ejercicio en estos ratones, que contrarreste el déficit en los niveles de hemoglobina que presentan los ratones Hq sedentarios. De confirmarse este hallazgo, podría constituir una explicación a las mejoras en la capacidad aeróbica y la fuerza encontradas en los ratones Hq entrenados junto a las adaptaciones ya descritas en bíceps femoral.

En cuanto a los efectos del entrenamiento sobre el mecanismo de acoplamiento E-C en corazón, no fue posible llevar a cabo el estudio del manejo de Ca^{2+} intracelular en los ratones entrenados. Sin embargo, se midieron los niveles de RYR2 y SERCA2, observando en ambos casos una tendencia a unos mayores niveles en los ratones entrenados respecto a los sedentarios, tanto en los Hq como en los controles, si bien esta diferencia no resultó significativa. Se ha descrito que el ejercicio físico es capaz de reducir la liberación espontánea de *sparks* de Ca^{2+} en cardiomiocitos (308) y de atenuar la actividad del RYR2 (309, 310). En algunos casos de disfunción en el manejo del Ca^{2+} , se ha descrito que el ejercicio induce un aumento de los niveles o la actividad de SERCA2, favoreciendo la entrada de Ca^{2+} al RS (310, 311). Por otro lado, en músculo esquelético, se observó una tendencia a unos menores niveles de RYR1 en el bíceps femoral de los ratones entrenados respecto a los sedentarios, tanto en los Hq como en los controles, aunque la diferencia no fue significativa. En otros estudios se ha observado que el ejercicio puede promover la proteólisis de RYR1 de una manera dependiente de ROS (312).

Por otro lado, dado que cada vez más estudios señalan la importancia de la autofagia en la adaptación del corazón (158, 159) y del músculo esquelético (313) al ejercicio, se midieron los niveles de proteínas implicadas en este proceso, sin observarse diferencias significativas en ninguna de ellas entre entrenados y sedentarios, ni en ratones controles ni Hq. Algunos estudios han señalado una relación entre los niveles de inducción de autofagia en músculo y la intensidad y la duración del ejercicio, de manera que una sola sesión de ejercicio de alta intensidad es capaz de inducir el flujo autofágico en mayor medida que una sesión de ejercicio prolongado de intensidad moderada (314, 315). Por tanto, es posible que el programa de entrenamiento de esta tesis, que es de intensidad moderada, no fuese capaz de inducir la autofagia. Además, también se ha observado que la inducción de la autofagia puede ser detectada inmediatamente después de la realización del ejercicio, pero no está claro que persista durante la fase de recuperación (316), por lo que ésta puede constituir otra razón que explique que aparentemente no se observen cambios en el flujo autofágico en los ratones entrenados.

En definitiva, esta tesis doctoral ahonda en las bases moleculares que subyacen a la deficiencia de AIF en corazón y músculo esquelético, dilucidando algunos procesos celulares que se encuentran alterados, tales como el sistema OXPHOS, la autofagia, la homeostasis del Ca^{2+} en el acoplamiento excitación-contracción, el estrés oxidativo, el metabolismo lipídico y proteico, o la biosíntesis del grupo hemo (material suplementario, **resumen gráfico**); contribuyendo a arrojar más luz y asentando las bases para generar nuevas hipótesis sobre la fisiopatología de las enfermedades mitocondriales. Debido a las limitaciones del estudio —principalmente el empleo de un bajo número muestral, así como de un modelo que presenta un fenotipo moderado en los músculos estriados—, se requieren nuevos estudios en el futuro para una mayor potencia estadística. Por otro lado, la intervención con entrenamiento combinado puede ser considerada una actividad segura, que supone mejoras considerables en la capacidad física, aunque no ha sido capaz de inducir grandes adaptaciones a nivel molecular, o bien las limitaciones inherentes a las técnicas disponibles no han permitido detectarlas. Sin embargo, este estudio deja la puerta abierta a futuras intervenciones de mayor duración o intensidad como una aproximación terapéutica prometedora para las enfermedades mitocondriales.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El corazón y el cuádriceps del ratón *Harlequin* contienen niveles residuales de AIF, que no promueven la muerte celular en los cardiomiocitos ni en las fibras musculoesqueléticas.
2. La deficiencia de AIF en corazón y cuádriceps del ratón *Harlequin* altera la ultraestructura mitocondrial, generando mitocondrias de mayor área y más alargadas.
3. En corazón, la deficiencia de AIF produce un fallo en el ensamblaje del CI, CIII y CV, del supercomplejo I+III₂ y del respirasoma, pero no en la síntesis de las subunidades que los constituyen, sin afectar de forma relevante a la actividad enzimática de los complejos OXPHOS. En cuádriceps, produce un fallo en el ensamblaje del CI, del supercomplejo I+III₂ y del respirasoma, pero no en la síntesis de sus subunidades; y supone un déficit leve de función del CI.
4. La deficiencia de AIF aumenta el estrés oxidativo en corazón, asociado a un mayor nivel de peroxirredoxina 6 y una menor actividad catalasa; y en cuádriceps, asociado a un mayor nivel de catalasa y de daño oxidativo en el ADN.
5. La deficiencia de AIF altera la distribución de lípidos en corazón y cuádriceps del ratón Hq, que presentan una acumulación de gotas lipídicas y de transportadores de ácidos grasos FABPs.
6. La deficiencia de AIF da lugar a un incremento del catabolismo proteico en corazón y cuádriceps del ratón Hq, incrementando los niveles de aminoácidos libres en estos tejidos.
7. La deficiencia de AIF en corazón altera el acoplamiento excitación-contracción, generando una mayor fuga de Ca²⁺ a través de los RYRs, tanto por un mayor número de agrupaciones de RYRs como por una mayor probabilidad de apertura de éstos, sumado a un tiempo mayor en captar el Ca²⁺ de nuevo al retículo sarcoplásmico. Sin embargo, no afecta a la liberación transitoria de Ca²⁺.
8. La deficiencia de AIF en corazón y bíceps femoral produce una alteración en el proceso de autofagia, con una acumulación de proteínas implicadas en distintos puntos de la ruta, junto a una mayor activación de mTOR en el caso del corazón; y, al menos en este último, una mayor activación del flujo autofágico.
9. La deficiencia de AIF probablemente altera la síntesis del grupo hemo, disminuyendo los niveles de hemoglobina y mioglobina en corazón.
10. El protocolo de entrenamiento combinado de fuerza y resistencia utilizado en la presente tesis, a pesar de mejorar la capacidad aeróbica y la fuerza muscular, no es capaz de atenuar el fenotipo muscular y cardiaco causado por la deficiencia de AIF. Sin embargo, supone una actividad segura para los ratones.

BIBLIOGRAFÍA

1. L. Margulis, The origin of plant and animal cells. *Am. Sci.* 59, 230–235 (1971).
2. M. Bereiter-Hahn and Voth, Dynamics of mitochondria in living cells. *Microsc. res. Tech.* 219, 198–219 (1994).
3. Y. J. Liu, R. L. McIntyre, G. E. Janssens, R. H. Houtkooper, Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mech. Ageing Dev.* 186, 111212 (2020).
4. R. M. Andrews, I. Kubacka, P. F. Chinnery, R. N. Lightowlers, D. M. Turnbull, N. Howell, Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA [5]. *Nat. Genet.* 23 (1999), p. 147.
5. Y. Hashimoto, T. Niikura, H. Tajima, T. Yasukawa, H. Sudo, Y. Ito, Y. Kita, M. Kawasumi, K. Kouyama, M. Doyu, G. Sobue, T. Koide, S. Tsuji, J. Lang, K. Kurokawa, I. Nishimoto, A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6336–6341 (2001).
6. C. Lee, J. Zeng, B. G. Drew, T. Sallam, A. Martin-Montalvo, J. Wan, S. J. Kim, H. Mehta, A. L. Hevener, R. De Cabo, P. Cohen, The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* 21, 443–454 (2015).
7. L. J. Cobb, C. Lee, J. Xiao, K. Yen, R. G. Wong, H. K. Nakamura, H. H. Mehta, Q. Gao, C. Ashur, D. M. Huffman, J. Wan, R. Muzumdar, N. Barzilai, P. Cohen, Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are agedependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging (Albany. NY).* 8, 796–808 (2016).
8. H. A. Krebs, The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14, 154–170 (1970).
9. G. V. Gnani, P. Priore, M. J. H. Geelen, L. Siculella, The mitochondrial citrate carrier: Metabolic role and regulation of its activity and expression. *IUBMB Life.* 61, 987–994 (2009).
10. B. T. Paul, D. H. Manz, F. M. Torti, S. V. Torti, Mitochondria and Iron: current questions. *Expert Rev. Hematol.* 10, 65–79 (2017).
11. L. Wang, Mitochondrial purine and pyrimidine metabolism and beyond. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 35, 578–594 (2016).
12. N. Kumashiro, S. A. Beddow, D. F. Vatner, S. K. Majumdar, J. L. Cantley, F. Guebre-Egziabher, I. Fat, B. Guigni, M. J. Jurczak, A. L. Birkenfeld, M. Kahn, B. K. Perler, M. A. Puchowicz, V. P. Mancham, S. Bhanot, C. D. Still, G. S. Gerhard, K. F. Petersen, G. W. Cline, G. I. Shulman, V. T. Samuel, Targeting pyruvate carboxylase reduces gluconeogenesis and adiposity and improves insulin resistance. *Diabetes.* 62, 2183–2194 (2013).
13. J. Yang, S. C. Kalhan, R. W. Hanson, What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J. Biol. Chem.* 284, 27025–27029 (2009).
14. O. E. Owen, S. C. Kalhan, R. W. Hanson, The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* 277, 30409–30412 (2002).
15. A. Chatterjee, S. Dasgupta, D. Sidransky, Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev. Res.* 4, 638–654 (2011).
16. M. Hochli, C. R. Hackenbrock, Fluidity in mitochondrial membranes: thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1636–1640 (1976).

17. J. H. Hochman, M. Schindler, J. G. Lee, S. Ferguson-Miller, Lateral mobility of cytochrome c on intact mitochondrial membranes as determined by fluorescence redistribution after photobleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 6866–6870 (1982).
18. R. Acín-Perez, J. A. Enriquez, The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 444–450 (2014).
19. E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez, A. Latorre-Pellicer, C. Colaś, E. Balsa, E. Perales-Clemente, P. M. Quirós, E. Calvo, M. A. Rodríguez-Hernández, P. Navas, R. Cruz, Á. Carracedo, C. López-Otín, A. Pérez-Martos, P. Fernández-Silva, E. Fernández-Vizarra, J. A. Enriquez, Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science (80-.).* 340, 1567–1570 (2013).
20. H. Schagger, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783 (2000).
21. D. Moreno-Lastres, F. Fontanesi, I. García-Consuegra, M. A. Martín, J. Arenas, A. Barrientos, C. Ugalde, Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab.* 15, 324–335 (2012).
22. F. Minauro-Sanmiguel, S. Wilkens, J. J. Garcia, Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F₀ bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12356–12358 (2005).
23. A. Galkin, S. Dröse, U. Brandt, The proton pumping stoichiometry of purified mitochondrial complex I reconstituted into proteoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 1575–1581 (2006).
24. L. E. Formosa, M. G. Dibley, D. A. Stroud, M. T. Ryan, Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Semin. Cell Dev. Biol.* 76, 154–162 (2018).
25. D. F. Stowe, A. K. S. Camara, Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: Modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants Redox Signal.* 11, 1373–1414 (2009).
26. S. Dröse, U. Brandt, Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 748, 145–169 (2012).
27. J. St-Pierre, J. A. Buckingham, S. J. Roebuck, M. D. Brand, Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790 (2002).
28. M. D. Brand, The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45, 466–472 (2010).
29. N. Di Marzo, E. Chisci, R. Giovannoni, The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells.* 7 (2018), doi:10.3390/cells7100156.
30. M. Ristow, K. Zarse, How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Exp. Gerontol.* 45, 410–418 (2010).
31. S. Hekimi, J. Lapointe, Y. Wen, Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21, 569–576 (2011).
32. R. B. Hamanaka, A. Glasauer, P. Hoover, S. Yang, H. Blatt, A. R. Mullen, S. Getsios, C. J.

- Gottardi, R. J. DeBerardinis, R. M. Lavker, N. S. Chandel, Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Sci. Signal.* 6, ra8–ra8 (2013).
33. G. S. Shadel, T. L. Horvath, Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell.* 163, 560–569 (2015).
 34. G. Lenaz, A. Baracca, V. Carelli, M. D'Aurelio, G. Sgarbi, G. Solaini, Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1658, 89–94 (2004).
 35. E. Maranzana, G. Barbero, A. I. Falasca, G. Lenaz, M. L. Genova, Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxidants Redox Signal.* 19, 1469–1480 (2013).
 36. L. Formentini, M. Sánchez-Aragó, L. Sánchez-Cenizo, J. M. C. Cuezva, The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response. *Mol. Cell.* 45, 731–742 (2012).
 37. P. Storz, Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.* 10, 1881–1896 (2005).
 38. I. G. Kirkinetzos, C. T. Moraes, Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 449–457 (2001).
 39. M. Y. Cha, D. K. y. Kim, I. Mook-Jung, The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. *Exp. Mol. Med.* 47, e150 (2015).
 40. R. Rizzuto, P. Bernardi, M. Favaron, G. F. Azzone, Pathways for Ca²⁺ efflux in heart and liver mitochondria. *Biochem. J.* 246, 271–277 (1987).
 41. C. Cárdenas, R. A. Miller, I. Smith, T. Bui, J. Molgó, M. Müller, H. Vais, K. H. Cheung, J. Yang, I. Parker, C. B. Thompson, M. J. Birnbaum, K. R. Hallows, J. K. Foskett, Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP₃ Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria. *Cell.* 142, 270–283 (2010).
 42. G. M. Cereghetti, A. Stangherlin, O. Martins De Brito, C. R. Chang, C. Blackstone, P. Bernardi, L. Scorrano, Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15803–15808 (2008).
 43. E. Basso, L. Fante, J. Fowlkes, V. Petronilli, M. A. Forte, P. Bernardi, Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *J. Biol. Chem.* 280, 18558–18561 (2005).
 44. R. Singh, A. Letai, K. Sarosiek, Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 175–193 (2019).
 45. M. S. D'Arcy, Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592 (2019).
 46. P. Nair, M. Lu, S. Petersen, A. Ashkenazi, *Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway* (Elsevier Inc., ed. 1, 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417158-9.00005-4>), vol. 544.
 47. A. Shamas-Din, J. Kale, B. Leber, D. W. Andrews, Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–21 (2013).
 48. R. Hegde, S. M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. Dubois, Y. Lazebnik, A. S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri, Identification of Omi/HtrA2

- as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* 277, 432–438 (2002).
49. R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 389–402 (2005).
 50. C. Borner, L. Monney, Apoptosis without caspases: An inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ.* 6, 497–507 (1999).
 51. L. Y. Li, X. Luo, X. Wang, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 412, 95–99 (2001).
 52. X. Wang, C. Yang, J. Chai, Y. Shi, D. Xue, Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80-)*. 298, 1587–1592 (2002).
 53. S. A. Susin, N. Zamzami, M. Castedo, T. Hirsch, P. Marchetti, A. Macho, E. Daugas, M. Geuskens, G. Kroemer, Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184, 1331–1341 (1996).
 54. S. A. Susin, H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, G. Kroemer, Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397, 441–446 (1999).
 55. H. Otera, S. Ohsakaya, Z. I. Nagaura, N. Ishihara, K. Mihara, Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.* 24, 1375–1386 (2005).
 56. M. J. Maté, M. Ortiz-Lombardía, B. Boitel, A. Haouz, D. Tello, S. A. Susin, J. Penninger, G. Kroemer, P. M. Alzari, The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor aif. *Nat. Struct. Biol.* 9, 442–446 (2002).
 57. H. Ye, C. Cande, N. C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer, H. Wu, Dna binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9, 680–684 (2002).
 58. B. M. Polster, G. Basañez, A. Etxebarria, J. M. Hardwick, D. G. Nicholls, Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 6447–6454 (2005).
 59. L. Ravagnan, S. Gurbuxani, S. A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jäättelä, J. M. Penninger, C. Garrido, G. Kroemer, Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 3, 839–843 (2001).
 60. C. Zhu, X. Wang, J. Deinum, Z. Huang, J. Gao, N. Modjtahedi, M. R. Neagu, M. Nilsson, P. S. Eriksson, H. Hagberg, J. Luban, G. Kroemer, K. Blomgren, Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *J. Exp. Med.* 204, 1741–1748 (2007).
 61. S. B. Shelar, K. K. Kaminska, S. A. Reddy, D. Kumar, C. T. Tan, V. C. Yu, J. Lu, A. Holmgren, T. Hagen, E. H. Chew, Thioredoxin-dependent regulation of AIF-mediated DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 87, 125–136 (2015).
 62. Y. Wang, R. An, G. K. Umanah, H. Park, K. Nambiar, S. M. Eacker, B. Kim, L. Bao, M. M. Harraz, C. Chang, R. Chen, J. E. Wang, T. I. Kam, J. S. Jeong, Z. Xie, S. Neifert, J. Qian, S. A. Andrabi, S. Blackshaw, H. Zhu, H. Song, G. L. Ming, V. L. Dawson, T. M. Dawson, A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science (80-)*. 354, aad6872–aad6872 (2016).

63. B. Farina, G. Di Sorbo, A. Chambery, A. Caporale, G. Leoni, R. Russo, F. Mascanzoni, D. Raimondo, R. Fattorusso, M. Ruvo, N. Doti, Structural and biochemical insights of CypA and AIF interaction. *Sci. Rep.* 7, 1138 (2017).
64. E. Daugas, S. A. Susin, N. Zamzami, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, N. Larochette, M. Prévost, B. Leber, D. Andrews, J. Penninger, G. Kroemer, Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14, 729–739 (2000).
65. S. A. Susin, E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prévost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw, G. Kroemer, Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192, 571–579 (2000).
66. D. Green, G. Kroemer, The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 8, 267–271 (1998).
67. S. A. Susin, N. Zamzami, M. Castedo, E. Daugas, H. G. Wang, S. Geley, F. Fassy, J. C. Reed, G. Kroemer, The central executioner of apoptosis: Multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 186, 25–37 (1997).
68. P. Lassus, X. Opitz-Araya, Y. Lazebnik, Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* (80-). 297, 1352–1354 (2002).
69. Y. Zhou, L. Liu, S. Tao, Y. Yao, Y. Wang, Q. Wei, A. Shao, Y. Deng, Parthanatos and its associated components: Promising therapeutic targets for cancer. *Pharmacol. Res.* 163, 105299 (2021).
70. A. A. Pieper, T. Walles, G. Wei, E. E. Clements, A. Verma, S. H. Snyder, J. L. Zweier, Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption. *Mol. Med.* 6, 271–282 (2000).
71. M. J. Eliasson, K. Sampei, A. S. Mandir, P. D. Hurn, R. J. Traystman, J. Bao, A. Pieper, Z. Q. Wang, T. M. Dawson, S. H. Snyder, V. L. Dawson, Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.* 3, 1089–1095 (1997).
72. O. V Evgenov, L. Liaudet, Role of nitrosative stress and activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in cardiovascular failure associated with septic and hemorrhagic shock. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 3, 293–299 (2005).
73. T.-I. Kam, X. Mao, H. Park, S.-C. Chou, S. S. Karuppagounder, G. E. Umanah, S. P. Yun, S. Brahmachari, N. Panicker, R. Chen, S. A. Andrabi, C. Qi, G. G. Poirier, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, L. M. Bekris, J. B. Leverenz, A. Pantelyat, H. S. Ko, L. S. Rosenthal, T. M. Dawson, V. L. Dawson, Poly(ADP-ribose) drives pathologic α -synuclein neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science*. 362 (2018), doi:10.1126/science.aat8407.
74. M. Masutani, H. Fujimori, Poly(ADP-ribosyl)ation in carcinogenesis. *Mol. Aspects Med.* 34, 1202–1216 (2013).
75. I. Y. Churbanova, I. F. Sevrioukova, Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.* 283, 5622–5631 (2008).
76. R. Villanueva, P. Ferreira, C. Marcuello, A. Usón, M. D. Miramar, M. L. Peleato, A. Lostao, S. A. Susin, M. Medina, Key Residues Regulating the Reductase Activity of the Human Mitochondrial Apoptosis Inducing Factor. *Biochemistry*. 54, 5175–5184 (2015).
77. N. Vahsen, C. Candé, J. J. Brière, P. Bénit, N. Joza, N. Larochette, P. G. Mastroberardino, M. O. Pequignot, N. Casares, V. Lazar, O. Feraud, N. Debili, S. Wissing, S. Engelhardt, F.

- Madeo, M. Piacentini, J. M. Penninger, H. Schägger, P. Rustin, G. Kroemer, AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23, 4679–4689 (2004).
78. P. Bénit, S. Goncalves, E. P. Dassa, J. J. Brière, P. Rustin, The variability of the Harlequin mouse phenotype resembles that of human mitochondrial-complex I-deficiency syndromes. *PLoS One.* 3 (2008), doi:10.1371/journal.pone.0003208.
 79. E. Hangen, O. Féraud, S. Lachkar, H. Mou, N. Doti, G. M. Fimia, N. vy Lam, C. Zhu, I. Godin, K. Muller, A. Chatzi, E. Nuebel, F. Ciccocanti, S. Flamant, P. Bénit, J. L. Perfettini, A. Sauvat, A. Bennaceur-Griscelli, K. Ser-Le Roux, P. Gonin, K. Tokatlidis, P. Rustin, M. Piacentini, M. Ruvo, K. Blomgren, G. Kroemer, N. Modjtahedi, Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Mol. Cell.* 58, 1001–1014 (2015).
 80. J. A. Pospisilik, C. Knauf, N. Joza, P. Benit, M. Orthofer, P. D. Cani, I. Ebersberger, T. Nakashima, R. Sarao, G. Neely, H. Esterbauer, A. Kozlov, C. R. Kahn, G. Kroemer, P. Rustin, R. Burcelin, J. M. Penninger, Targeted Deletion of AIF Decreases Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Protects from Obesity and Diabetes. *Cell.* 131, 476–491 (2007).
 81. N. Joza, G. Y. Oudit, D. Brown, P. Benit, Z. Kassiri, N. Vahsen, L. Benoit, M. M. Patel, K. Nowikovsky, A. Vassault, P. H. Backx, T. Wada, G. Kroemer, P. Rustin, J. M. Penninger, Muscle-Specific Loss of Apoptosis-Inducing Factor Leads to Mitochondrial Dysfunction, Skeletal Muscle Atrophy, and Dilated Cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10261–10272 (2005).
 82. C. Lechauve, S. Augustin, H. Cwerman-Thibault, É. Reboussin, D. Roussel, R. Lai-Kuen, B. Saubamea, J.-A. Sahel, T. Debeir, M. Corral-Debrinski, Neuroglobin gene therapy prevents optic atrophy and preserves durably visual function in Harlequin mice. *Mol. Ther.* 22, 1096–1109 (2014).
 83. S. Milasta, C. P. Dillon, O. E. Sturm, K. C. Verbist, T. L. Brewer, G. Quarato, S. A. Brown, S. Frase, L. J. Janke, S. S. Perry, P. G. Thomas, D. R. Green, Apoptosis-Inducing-Factor-Dependent Mitochondrial Function Is Required for T Cell but Not B Cell Function. *Immunity.* 44, 88–102 (2016).
 84. M. M. Elguindy, E. Nakamaru-Ogiso, Apoptosis-inducing factor (AIF) and its family member protein, AMID, are rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductases (NDH-2). *J. Biol. Chem.* 290, 20815–20826 (2015).
 85. K. Meyer, S. Buettner, D. Ghezzi, M. Zeviani, D. Bano, P. Nicotera, Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. *Cell Death Dis.* 6, e1814-5 (2015).
 86. L. Banci, I. Bertini, C. Cefaro, S. Ciofi-Baffoni, A. Gallo, M. Martinelli, D. P. Sideris, N. Katrakili, K. Tokatlidis, MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 198–206 (2009).
 87. J. A. Klein, C. M. Longo-Guess, M. P. Rossmann, K. L. Seburn, R. E. Hurd, W. N. Frankel, R. T. Bronson, S. L. Ackerman, The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* 419, 367–374 (2002).
 88. V. P. M. van Empel, A. T. Bertrand, R. van der Nagel, S. Kostin, P. A. Doevendans, H. J. Crijns, E. de Wit, W. Sluiter, S. L. Ackerman, L. J. De Windt, Downregulation of apoptosis-inducing factor in harlequin mutant mice sensitizes the myocardium to oxidative stress-related cell death and pressure overload-induced decompensation. *Circ. Res.* 96, 92–101 (2005).
 89. N. Apostolova, A. M. Cervera, V. M. Victor, S. Cadenas, A. Sanjuan-Pla, A. Alvarez-Barrientos, J. V. Esplugues, K. J. McCreath, Loss of apoptosis-inducing factor leads to an

- increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants [4]. *Cell Death Differ.* 13, 354–357 (2006).
90. S. J. Chinta, A. Rane, N. Yadava, J. K. Andersen, D. G. Nicholls, B. M. Polster, Reactive oxygen species regulation by AIF- and complex I-depleted brain mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 939–947 (2009).
 91. A. Urbano, U. Lakshmanan, P. H. Choo, J. C. Kwan, P. Y. Ng, K. Guo, S. Dhakshinamoorthy, A. Porter, AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J.* 24, 2815–2826 (2005).
 92. A. M. Schaefer, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, P. F. Chinnery, The epidemiology of mitochondrial disorders - Past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1659, 115–120 (2004).
 93. R. N. Lightowers, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science (80-)*. 349, 1494–1499 (2015).
 94. K. Fiedorczuk, L. A. Sazanov, Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. *Trends Cell Biol.* 28, 835–867 (2018).
 95. W. K. ENGEL, G. G. CUNNINGHAM, RAPID EXAMINATION OF MUSCLE TISSUE. AN IMPROVED TRICHROME METHOD FOR FRESH-FROZEN BIOPSY SECTIONS. *Neurology.* 13, 919–923 (1963).
 96. J. M. Shoffner, Mitochondrial myopathy diagnosis. *Neurol. Clin.* 18, 105–123 (2000).
 97. E. W. Sommerville, P. F. Chinnery, G. S. Gorman, R. W. Taylor, Adult-onset Mendelian PEO associated with mitochondrial disease. *J. Neuromuscul. Dis.* 1, 119–133 (2014).
 98. A. S. Ahuja, Understanding mitochondrial myopathies: A review. *PeerJ.* 2018 (2018), doi:10.7717/peerj.4790.
 99. J. Finsterer, S. Kothari, Cardiac manifestations of primary mitochondrial disorders. *Int. J. Cardiol.* 177, 754–763 (2014).
 100. S. R. Lee, N. Kim, Y. H. Noh, Z. Xu, K. S. Ko, B. D. Rhee, J. Han, Mitochondrial DNA, mitochondrial dysfunction, and cardiac manifestations. *Front. Biosci. - Landmark.* 22, 1177–1194 (2017).
 101. F. Scaglia, J. A. Towbin, W. J. Craigen, J. W. Belmont, E. O. B. Smith, S. R. Neish, S. M. Ware, J. V. Hunter, S. D. Fernbach, G. D. Vladutiu, L. J. C. Wong, H. Vogel, Clinical Spectrum, Morbidity, and Mortality in 113 Pediatric Patients with Mitochondrial Disease. *Pediatrics.* 114, 925–931 (2004).
 102. G. Limongelli, M. Tome-Esteban, C. Dejthevaporn, S. Rahman, M. G. Hanna, P. M. Elliott, Prevalence and natural history of heart disease in adults with primary mitochondrial respiratory chain disease. *Eur. J. Heart Fail.* 12, 114–121 (2010).
 103. C. Brunel-Guitton, A. Levtova, F. Sasarman, Mitochondrial Diseases and Cardiomyopathies. *Can. J. Cardiol.* 31, 1360–1376 (2015).
 104. T. Ozawa, Mitochondrial cardiomyopathy. *Herz.* 19, 105–118 (1994).
 105. D. E. Meyers, H. I. Basha, M. K. Koenig, Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management. *Texas Hear. Inst. J.* 40, 385–394 (2013).
 106. C. Reinhardt, G. Arena, K. Nedara, R. Edwards, C. Brenner, K. Tokatlidis, N. Modjtahedi,

- AIF meets the CHCHD4/Mia40-dependent mitochondrial import pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866, 165746 (2020).
107. M. Kettwig, M. Schubach, F. A. Zimmermann, L. Klinge, J. A. Mayr, S. Biskup, W. Sperl, J. Gärtner, P. Huppke, From ventriculomegaly to severe muscular atrophy: expansion of the clinical spectrum related to mutations in AIFM1. *Mitochondrion.* 21, 12–18 (2015).
 108. I. Berger, Z. Ben-Neriah, T. Dor-Wolman, A. Shaag, A. Saada, S. Zenvirt, A. Raas-Rothschild, M. Nadjari, K. H. Kaestner, O. Elpeleg, Early prenatal ventriculomegaly due to an AIFM1 mutation identified by linkage analysis and whole exome sequencing. *Mol. Genet. Metab.* 104, 517–520 (2011).
 109. D. Ghezzi, I. Sevrioukova, F. Invernizzi, C. Lamperti, M. Mora, P. D. Adamo, F. Novara, O. Zuffardi, G. Uziel, M. Zeviani, Severe X-Linked Mitochondrial Encephalomyopathy Associated with a Mutation in Apoptosis-Inducing Factor. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 639–649 (2010).
 110. A. Ardisson, G. Piscoquito, A. Legati, T. Langella, E. Lamantea, B. Garavaglia, E. Salsano, L. Farina, I. Moroni, D. Pareyson, D. Ghezzi, A slowly progressive mitochondrial encephalomyopathy widens the spectrum of AIFM1 disorders. *Neurology.* 84, 2193–2195 (2015).
 111. D. Diodato, G. Tasca, D. Verrigni, A. D'Amico, T. Rizza, G. Tozzi, D. Martinelli, M. Verardo, F. Invernizzi, A. Nasca, E. Bellacchio, D. Ghezzi, F. Piemonte, C. Dionisi-Vici, R. Carrozzo, E. Bertini, A novel AIFM1 mutation expands the phenotype to an infantile motor neuron disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 24, 463–466 (2016).
 112. S. U. Morton, S. P. Prabhu, H. G. W. Lidov, J. Shi, I. Anselm, C. A. Brownstein, M. N. Bainbridge, A. H. Beggs, S. O. Vargas, P. B. Agrawal, AIFM1 mutation presenting with fatal encephalomyopathy and mitochondrial disease in an infant. 1, 1–13 (2017).
 113. B. Hu, M. Wang, R. Castoro, M. Simmons, R. Dortch, R. Yawn, J. Li, A novel missense mutation in AIFM1 results in axonal polyneuropathy and misassembly of OXPHOS complexes. *Eur. J. Neurol.* 24, 1499–1506 (2017).
 114. D. Diodato, G. Tasca, D. Verrigni, A. D. Amico, T. Rizza, G. Tozzi, D. Martinelli, M. Verardo, F. Invernizzi, A. Nasca, E. Bellacchio, D. Ghezzi, F. Piemonte, C. Dionisi-vici, R. Carrozzo, E. Bertini, SHORT REPORT A novel AIFM1 mutation expands the phenotype to an infantile motor neuron disease, 463–466 (2016).
 115. E. G. Jeong, J. W. Lee, Y. H. Soung, S. W. Nam, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo, S. H. Lee, Immunohistochemical and mutational analysis of apoptosis-inducing factor (AIF) in colorectal carcinomas. *Apmis.* 114, 867–873 (2006).
 116. E. M. Lewis, A. S. Wilkinson, J. S. Jackson, R. Mehra, S. Varambally, A. M. Chinnaiyan, J. C. Wilkinson, The enzymatic activity of apoptosis-inducing factor supports energy metabolism benefiting the growth and invasiveness of advanced prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 287, 43862–43875 (2012).
 117. S. Rao, L. Mondragón, B. Pranjic, T. Hanada, G. Stoll, T. Köcher, P. Zhang, A. Jais, A. Lercher, A. Bergthaler, D. Schramek, K. Haigh, V. Sica, M. Leduc, N. Modjtahedi, T. P. Pai, M. Onji, I. Uribealago, R. Hanada, I. Kozieradzki, R. Kogelgruber, S. J. Cronin, Z. She, F. Quehenberger, H. Popper, L. Kenner, J. J. Haigh, O. Kepp, M. Rak, K. Cai, G. Kroemer, J. M. Penninger, AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development. *Cell Res.* 29, 579–591 (2019).
 118. D. Troutaud, B. Petit, C. Bellanger, B. Marin, M. P. Gourin-Chaury, D. Petit, A. Olivrie, J.

- Feuillard, M. O. Jauberteau, D. Bordessoule, Prognostic significance of BAD and AIF apoptotic pathways in diffuse large B-Cell lymphoma. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 10, 118–124 (2010).
119. D. Brown, B. D. Yu, N. Joza, P. Benit, J. Meneses, M. Firpo, P. Rustin, J. M. Penninger, G. R. Martin, Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9918–9923 (2006).
120. A. S. Armand, I. Laziz, D. Djeghloul, S. Lécolle, A. T. Bertrand, O. Biondi, L. J. de Windt, C. Chanoine, Apoptosis-inducing factor regulates skeletal muscle progenitor cell number and muscle phenotype. *PLoS One.* 6 (2011), doi:10.1371/journal.pone.0027283.
121. S. J. Goldman, R. Taylor, Y. Zhang, S. Jin, Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion.* 10, 309–315 (2010).
122. K. R. Parzych, D. J. Klionsky, An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal.* 20, 460–473 (2014).
123. R. A. Saxton, D. M. Sabatini, mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 168, 960–976 (2017).
124. N. Hosokawa, T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. Guan, N. Oshiro, N. Mizushima, Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1 – Atg13 – FIP200 Complex Required for Autophagy. 20, 1981–1991 (2009).
125. E. Itakura, C. Kishi, K. Inoue, N. Mizushima, Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. 19, 5360–5372 (2008).
126. J. W. Zmijewski, S. Banerjee, H. Bae, A. Friggeri, E. R. Lazarowski, E. Abraham, Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 33154–33164 (2010).
127. M. Høyer-Hansen, L. Bastholm, P. Szyniarowski, M. Campanella, G. Szabadkai, T. Farkas, K. Bianchi, N. Fehrenbacher, F. Elling, R. Rizzuto, I. S. Mathiasen, M. Jäättelä, Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Mol. Cell.* 25, 193–205 (2007).
128. S. G. Pfisterer, M. Mauthe, P. Codogno, T. Proikas-cezanne, Ca²⁺ / Calmodulin-Dependent Kinase (CaMK) Signaling via CaMKI and AMP-Activated Protein Kinase Contributes to the Regulation of WIPI-1 at the Onset of Autophagy □, 1066–1075 (2011).
129. Z. Yang, D. J. Klionsky, Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 124–131 (2010).
130. A. Buj-Bello, V. Laugel, N. Messaddeq, H. Zahreddine, J. Laporte, J. F. Pellissier, J. L. Mandel, The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15060–15065 (2002).
131. Y. Tanaka, G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lüllmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura, P. Saftig, Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 406, 902–906 (2000).
132. A. Nakai, O. Yamaguchi, T. Takeda, Y. Higuchi, S. Hikoso, M. Taniike, S. Omiya, I. Mizote, Y. Matsumura, M. Asahi, K. Nishida, M. Hori, N. Mizushima, K. Otsu, The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* 13, 619–624 (2007).

133. L. M. Nepomnyashchikh, E. L. Lushnikova, D. E. Semenov, Focal degradation of cytoplasmic organelles in cardiomyocytes during regenerative and plastic myocardial insufficiency. *Bull. Exp. Biol. Med.* 130, 1190–1195 (2000).
134. M. Margeta, Autophagy Defects in Skeletal Myopathies. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15, 261–285 (2020).
135. S. Sciarretta, Y. Maejima, D. Zablocki, J. Sadoshima, The Role of Autophagy in the Heart. *Annu. Rev. Physiol.* 80, 1–26 (2018).
136. H. Tyynismaa, K. P. Mjosund, S. Wanrooij, I. Lappalainen, E. Ylikallio, A. Jalanko, J. N. Spelbrink, A. Paetau, A. Suomalainen, Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17687–17692 (2005).
137. K. E. White, V. J. Davies, V. E. Hogan, M. J. Piechota, P. P. Nichols, D. M. Turnbull, M. Votruba, Opal deficiency associated with increased autophagy in retinal ganglion cells in a murine model of dominant optic atrophy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 2567–2571 (2009).
138. M. Villanueva-Paz, S. Povea-Cabello, I. Villalón-García, M. Álvarez-Córdoba, J. M. Suárez-Rivero, M. Talaverón-Rey, S. Jackson, R. Falcón-Moya, A. Rodríguez-Moreno, J. A. Sánchez-Alcázar, Parkin-mediated mitophagy and autophagy flux disruption in cellular models of MERRF syndrome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866, 165726 (2020).
139. D. Cotán, M. D. Cordero, J. Garrido-Maraver, M. Oropesa-Avila, Á. Rodríguez-Hernández, L. G. Izquierdo, M. D. la Mata, M. De Miguel, J. B. Lorite, E. R. Infante, S. Jackson, P. Navas, J. A. Sánchez-Alcázar, Secondary coenzyme Q 10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J.* 25, 2669–2687 (2011).
140. M. Morán, A. Delmiro, A. Blázquez, C. Ugalde, J. Arenas, M. A. Martín, Bulk autophagy, but not mitophagy, is increased in cellular model of mitochondrial disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842, 1059–1070 (2014).
141. J. Deng, Y. Lu, Z. Xie, J. Liu, Y. Yuan, Z. Wang, RNA-seq profiling, and impaired autophagic process in skeletal muscle of MELAS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 523, 91–97 (2020).
142. S. Emperador, N. Garrido-Pérez, J. Amezcua-Gil, P. Gaudó, J. A. Andrés-Sanz, D. Yubero, A. Fernández-Marmiesse, M. M. O’Callaghan, J. D. Ortigoza-Escobar, M. Iriando, E. Ruiz-Pesini, A. García-Cazorla, M. Gil-Campos, R. Artuch, J. Montoya, M. P. Bayona-Bafaluy, Molecular Characterization of New FBXL4 Mutations in Patients With mtDNA Depletion Syndrome. *Front. Genet.* 10, 1–10 (2020).
143. D.-S. Lin, Y.-W. Huang, C.-S. Ho, P.-L. Hung, M.-H. Hsu, T.-J. Wang, T.-Y. Wu, T.-H. Lee, Z.-D. Huang, P.-C. Chang, M.-F. Chiang, Oxidative Insults and Mitochondrial DNA Mutation Promote Enhanced Autophagy and Mitophagy Compromising Cell Viability in Pluripotent Cell Model of Mitochondrial Disease. *Cells.* 8, 65 (2019).
144. M. de la Mata, J. Garrido-Maraver, D. Cotán, M. D. Cordero, M. Oropesa-Ávila, L. G. Izquierdo, M. de Miguel, J. B. Lorite, E. R. Infante, P. Ybot, S. Jackson, J. A. Sánchez-Alcázar, Recovery of MERRF Fibroblasts and Cybrids Pathophysiology by Coenzyme Q10. *Neurotherapeutics.* 9, 446–463 (2012).
145. J.-H. Yuan, Y. Sakiyama, I. Higuchi, Y. Inamori, Y. Higuchi, A. Hashiguchi, K. Higashi, A. Yoshimura, H. Takashima, Mitochondrial myopathy with autophagic vacuoles in patients with the m.8344A>G mutation. *J. Clin. Pathol.* 66, 659–664 (2013).
146. J. Garrido-Maraver, M. V. Paz, M. D. Cordero, J. Bautista-Lorite, M. Oropesa-Ávila, M. de

- la Mata, A. D. Pavón, I. de Laverá, E. Alcocer-Gómez, F. Galán, P. Ybot González, D. Cotán, S. Jackson, J. A. Sánchez-Alcázar, Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 2535–2553 (2015).
147. S. C. Johnson, M. E. Yanos, E.-B. Kayser, A. Quintana, M. Sangesland, A. Castanza, L. Uhde, J. Hui, V. Z. Wall, A. Gagnidze, K. Oh, B. M. Wasko, F. J. Ramos, R. D. Palmiter, P. S. Rabinovitch, P. G. Morgan, M. M. Sedensky, M. Kaeberlein, mTOR Inhibition Alleviates Mitochondrial Disease in a Mouse Model of Leigh Syndrome. *Science (80-.)*. 342, 1524–1528 (2013).
 148. D. E. R. Warburton, S. S. D. Bredin, Reflections on Physical Activity and Health: What Should We Recommend? *Can. J. Cardiol.* 32, 495–504 (2016).
 149. B. K. Pedersen, B. Saltin, Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 25 Suppl 3, 1–72 (2015).
 150. P. R. Lawler, K. B. Filion, M. J. Eisenberg, Efficacy of exercise-based cardiac rehabilitation post-myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. Heart J.* 162, 571-584.e2 (2011).
 151. L. Tao, Y. Bei, H. Zhang, J. Xiao, X. Li, Exercise for the heart: Signaling pathways. *Oncotarget.* 6, 20773–20784 (2015).
 152. M. A. Minetto, A. Giannini, R. McConnell, C. Busso, G. Massazza, Effects of exercise on skeletal muscles and tendons. *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res.* 9, 90–95 (2019).
 153. C. Lundby, R. A. Jacobs, Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp. Physiol.* 101, 17–22 (2016).
 154. E. A. Richter, M. Hargreaves, Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol. Rev.* 93, 993–1017 (2013).
 155. A. Vainshtein, D. A. Hood, The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 120, 664–673 (2016).
 156. P. Spitali, P. Grumati, M. Hiller, M. Chrisam, A. Aartsma-Rus, P. Bonaldo, Autophagy is Impaired in the Tibialis Anterior of Dystrophin Null Mice. *PLoS Curr.* 5 (2013), doi:10.1371/currents.md.e1226cefa851a2f079bbc406c0a21e80.
 157. F. Penna, D. Costamagna, F. Pin, A. Camperi, A. Fanzani, E. M. Chiarpotto, G. Cavallini, G. Bonelli, F. M. Baccino, P. Costelli, Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *Am. J. Pathol.* 182, 1367–1378 (2013).
 158. L. Wang, J. Wang, D. Cretoiu, G. Li, J. Xiao, Exercise-mediated regulation of autophagy in the cardiovascular system. *J. Sport Heal. Sci.* 9, 203–210 (2020).
 159. J. C. Campos, B. B. Queliconi, L. H. M. Bozi, L. R. G. Bechara, P. M. M. Dourado, A. M. Andres, P. R. Jannig, K. M. S. Gomes, V. O. Zambelli, C. Rocha-Resende, S. Guatimosim, P. C. Brum, D. Mochly-Rosen, R. A. Gottlieb, A. J. Kowaltowski, J. C. B. Ferreira, Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. *Autophagy.* 13, 1304–1317 (2017).
 160. C. He, M. C. Bassik, V. Moresi, K. Sun, Y. Wei, Z. Zou, Z. An, J. Loh, J. Fisher, Q. Sun, S. Korsmeyer, M. Packer, H. I. May, J. A. Hill, H. W. Virgin, C. Gilpin, G. Xiao, R. Bassel-Duby, P. E. Scherer, B. Levine, Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature.* 481, 511–515 (2012).

161. L. Tao, Y. Bei, S. Lin, H. Zhang, Y. Zhou, J. Jiang, P. Chen, S. Shen, J. Xiao, X. Li, Exercise Training Protects Against Acute Myocardial Infarction via Improving Myocardial Energy Metabolism and Mitochondrial Biogenesis. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 37, 162–175 (2015).
162. H. Liu, H. Lei, Y. Shi, J.-J. Wang, N. Chen, Z.-H. Li, Y.-F. Chen, Q.-F. Ye, Y. Yang, Autophagy inhibitor 3-methyladenine alleviates overload-exercise-induced cardiac injury in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 990–997 (2017).
163. L. Zhang, Z. Zhang, A. Khan, H. Zheng, C. Yuan, H. Jiang, Advances in drug therapy for mitochondrial diseases. *Ann. Transl. Med.* 8, 17 (2020).
164. N. B. M. Voet, E. L. van der Kooi, B. G. M. van Engelen, A. C. H. Geurts, Strength training and aerobic exercise training for muscle disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019 (2019), doi:10.1002/14651858.CD003907.pub5.
165. T. Taivassalo, T. D. Jensen, N. Kennaway, S. DiMauro, J. Vissing, R. G. Haller, The spectrum of exercise tolerance in mitochondrial myopathies: A study of 40 patients. *Brain.* 126, 413–423 (2003).
166. T. D. Jeppesen, M. Schwartz, D. B. Olsen, F. Wibrand, T. Krag, M. Dunø, S. Hauerlev, J. Vissing, Aerobic training is safe and improves exercise capacity in patients with mitochondrial myopathy. *Brain.* 129, 3402–3412 (2006).
167. S. Porcelli, M. Marzorati, L. Morandi, B. Grassi, Home-based aerobic exercise training improves skeletal muscle oxidative metabolism in patients with metabolic myopathies. *J. Appl. Physiol.* 121, 699–708 (2016).
168. T. Taivassalo, J. L. Gardner, R. W. Taylor, A. M. Schaefer, J. Newman, M. J. Barron, R. G. Haller, D. M. Turnbull, Endurance training and detraining in mitochondrial myopathies due to single large-scale mtDNA deletions. *Brain.* 129, 3391–3401 (2006).
169. J. L. Murphy, E. L. Blakely, A. M. Schaefer, L. He, P. Wyrick, R. G. Haller, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, T. Taivassalo, Resistance training in patients with single, large-scale deletions of mitochondrial DNA. *Brain.* 131, 2832–2840 (2008).
170. M. Venturelli, F. Villa, F. Ruzzante, C. Tarperi, D. Rudi, C. Milanese, V. Cavedon, C. Fonte, A. Picelli, N. Smania, E. Calabria, S. Skafidas, G. Layec, F. Schena, Neuromuscular and muscle metabolic functions in melas before and after resistance training: A case study. *Front. Physiol.* 10, 1–8 (2019).
171. P. Cejudo, J. Bautista, T. Montemayor, R. Villagómez, L. Jiménez, F. Ortega, Y. Campos, H. Sánchez, J. Arenas, Exercise training in mitochondrial myopathy: A randomized controlled trial. *Muscle and Nerve.* 32, 342–350 (2005).
172. C. Fiuza-Luces, J. Díez-Bermejo, M. Fernández-De La Torre, G. Rodríguez-Romo, P. Sanz-Ayán, A. Delmiro, D. Munguía-Izquierdo, I. Rodríguez-Gómez, I. Ara, C. Domínguez-González, J. Arenas, M. A. Martín, A. Lucia, M. Morán, Health Benefits of an Innovative Exercise Program for Mitochondrial Disorders. *Med. Sci. Sports Exerc.* 50, 1142–1151 (2018).
173. C. Fiuza-Luces, P. L. Valenzuela, S. Laine-Menéndez, M. F. De La Torre, V. Bermejo-Gómez, L. Rufián-Vázquez, J. Arenas, M. A. Martín, A. Lucia, M. Morán, Physical exercise and mitochondrial disease: Insights from a mouse model. *Front. Neurol.* 10 (2019), doi:10.3389/fneur.2019.00790.
174. T. Taivassalo, E. A. Shoubridge, J. Chen, N. G. Kennaway, S. Dimauro, D. L. Arnold, R. G. Haller, Aerobic conditioning in patients with mitochondrial myopathies: Physiological,

- biochemical, and genetic effects. *Ann. Neurol.* 50, 133–141 (2001).
175. T. Taivassalo, K. Fu, T. Johns, D. Arnold, G. Karpati, E. A. Shoubridge, Gene shifting: A novel therapy for mitochondrial myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1047–1052 (1999).
 176. G. Siciliano, C. Simoncini, A. Lo Gerfo, D. Orsucci, G. Ricci, M. Mancuso, Effects of aerobic training on exercise-related oxidative stress in mitochondrial myopathies. *Neuromuscul. Disord.* 22, S172–S177 (2012).
 177. T. Wenz, F. Diaz, D. Hernandez, C. T. Moraes, Regulation of Protein Metabolism in Exercise and Recovery Endurance exercise is protective for mice with mitochondrial myopathy, 1712–1719 (2009).
 178. A. Safdar, K. Khrapko, J. M. Flynn, A. Saleem, M. De Lisio, A. P. W. Johnston, Y. Kratysberg, I. A. Samjoo, Y. Kitaoka, D. I. Ogborn, J. P. Little, S. Raha, G. Parise, M. Akhtar, B. P. Hettinga, G. C. Rowe, Z. Arany, T. A. Prolla, M. A. Tarnopolsky, Exercise-induced mitochondrial p53 repairs mtDNA mutations in mutator mice. *Skelet. Muscle.* 6 (2016), doi:10.1186/s13395-016-0075-9.
 179. M. G. D. Bates, J. H. Newman, D. G. Jakovljevic, K. G. Hollingsworth, C. L. Alston, P. Zalewski, J. J. Klawe, A. M. Blamire, G. A. MacGowan, B. D. Keavney, J. P. Bourke, A. Schaefer, R. McFarland, J. L. Newton, D. M. Turnbull, R. W. Taylor, M. I. Trenell, G. S. Gorman, Defining cardiac adaptations and safety of endurance training in patients with m.3243A>G-related mitochondrial disease. *Int. J. Cardiol.* 168, 3599–3608 (2013).
 180. B. Korzeniewski, Faster and stronger manifestation of mitochondrial diseases in skeletal muscle than in heart related to cytosolic inorganic phosphate (Pi) accumulation. *J. Appl. Physiol.* 121, 424–437 (2016).
 181. R. M. J. Deacon, Measuring motor coordination in mice. *J. Vis. Exp.*, e2609 (2013).
 182. C. Welinder, L. Ekblad, Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J. Proteome Res.* 10, 1416–1419 (2011).
 183. M. A. Calvaruso, J. Smeitink, L. Nijtmans, Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods.* 46, 281–287 (2008).
 184. Z. YiChun, G. PiAn, Z. WenYuan, Z. JianJian, W. XiaoLin, X. Can, X. ZhongWei, L. ZhengWei, W. XiaoHui, W. Qi, L. Xiang, C. JinCao, Quantitative iTRAQ-based proteomic analysis of piperine protected cerebral ischemia/reperfusion injury in rat brain. *Neurochem. Int.* 124, 51–61 (2019).
 185. C. C. Clement, W. Wang, M. Dzieciatkowska, M. Cortese, K. C. Hansen, A. Becerra, S. Thangaswamy, I. Nizamutdinova, J. Y. Moon, L. J. Stern, A. A. Gashev, D. Zawieja, L. Santambrogio, Quantitative Profiling of the Lymph Node Clearance Capacity. *Sci. Rep.* 8, 1–16 (2018).
 186. F. Medja, S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B. Mousson de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J. P. Mazat, A. Lombès, Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion.* 9, 331–339 (2009).
 187. A. Saborido, J. Delgado, A. Megías, Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and E-type Mg²⁺-ATPase activity in rat heart homogenates. *Anal. Biochem.* 268, 79–88 (1999).
 188. J. A. Navarro-García, C. Delgado, M. Fernández-Velasco, A. Val-Blasco, E. Rodríguez-Sánchez, J. Aceves-Ripoll, N. Gómez-Hurtado, T. Bada-Bosch, E. Mérida-Herrero, E.

- Hernández, M. Praga, R. Salguero, J. Solís, F. Arribas, J. F. Delgado, H. Bueno, M. Kuro-O, L. M. Ruilope, G. Ruiz-Hurtado, Fibroblast growth factor-23 promotes rhythm alterations and contractile dysfunction in adult ventricular cardiomyocytes. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 34, 1864–1875 (2019).
189. G. Ruiz-Hurtado, N. Gómez-Hurtado, M. Fernández-Velasco, E. Calderón, T. Smani, A. Ordoñez, V. Cachafeiro, L. Boscá, J. Díez, A. M. Gómez, C. Delgado, Cardiotrophin-1 induces sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak and arrhythmogenesis in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 96, 81–89 (2012).
190. H. Cheng, L. S. Song, N. Shirokova, A. González, E. G. Lakatta, E. Ríos, M. D. Stern, Amplitude distribution of calcium sparks in confocal images: Theory and studies with an automatic detection method. *Biophys. J.* 76, 606–617 (1999).
191. M. Picard, K. White, D. M. Turnbull, Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle: a quantitative three-dimensional electron microscopy study. *J. Appl. Physiol.* 114, 161–171 (2013).
192. T. Metsalu, J. Vilo, ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 43, W566-70 (2015).
193. K. Potter, Methods for Presenting Statistical Information: The Box Plot. *Vis. Large Unstructured Data Sets.* 4, 97–106 (2006).
194. E. Solito, C. de Coupade, S. Canaider, N. J. Goulding, M. Perretti, Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br. J. Pharmacol.* 133, 217–228 (2001).
195. V. Monceau, Y. Belikova, G. Kratassiouk, D. Charue, E. Camors, C. Communal, P. Trouvé, F. Russo-Marie, D. Charlemagne, Externalization of endogenous annexin A5 participates in apoptosis of rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 64, 496–506 (2004).
196. J. A. Arevalo, J. P. Vázquez-Medina, The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling. *Antioxidants (Basel, Switzerland).* 7 (2018), doi:10.3390/antiox7120172.
197. T. Stephan, C. Brüser, M. Deckers, A. M. Steyer, F. Balzarotti, M. Barbot, T. S. Behr, G. Heim, W. Hübner, P. Ilgen, F. Lange, D. Pacheu-Grau, J. K. Pape, S. Stoldt, T. Huser, S. W. Hell, W. Möbius, P. Rehling, D. Riedel, S. Jakobs, MICOS assembly controls mitochondrial inner membrane remodeling and crista junction redistribution to mediate cristae formation. *EMBO J.* 39, C525–C534 (2020).
198. C. Zancanaro, R. Mariotti, F. Perdoni, E. Nicolato, M. Malatesta, Physical training is associated with changes in Nuclear magnetic resonance and morphometrical parameters of the skeletal muscle in senescent mice. *Eur. J. Histochem.* 51, 305–309 (2007).
199. J. A. Klein, C. M. Longo-Guess, M. P. Rossmann, K. L. Seburn, R. E. Hurd, W. N. Frankel, R. T. Bronson, S. L. Ackerman, The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature.* 419, 367–374 (2002).
200. E. C. C. Cheung, N. Joza, N. A. E. Steenaart, K. A. McClellan, M. Neuspiel, S. Mcnamara, J. G. Maclaurin, P. Rippstein, D. S. Park, G. C. Shore, H. M. McBride, J. M. Penninger, R. S. Slack, Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis, 4061–4073 (2006).
201. S. P. Cregan, A. Fortin, J. G. MacLaurin, S. M. Callaghan, F. Cecconi, S.-W. Yu, T. M. Dawson, V. L. Dawson, D. S. Park, G. Kroemer, R. S. Slack, Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* 158, 507–517 (2002).

202. I. F. Sevrioukova, Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. 14 (2011).
203. N. Vahsen, C. Candé, P. Dupaigne, F. Giordanetto, R. T. Kroemer, E. Herker, S. Scholz, N. Modjtahedi, F. Madeo, E. Le Cam, G. Kroemer, Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene*. 25, 1763–1774 (2006).
204. J. C. Wilkinson, A. S. Wilkinson, S. Galbán, R. A. Csomos, C. S. Duckett, Apoptosis-Inducing Factor Is a Target for Ubiquitination through Interaction with XIAP. *Mol. Cell. Biol.* 28, 237–247 (2008).
205. E. M. Lewis, A. S. Wilkinson, N. Y. Davis, D. A. Horita, J. C. Wilkinson, Nondegradative ubiquitination of apoptosis inducing factor (AIF) by X-linked inhibitor of apoptosis at a residue critical for AIF-mediated chromatin degradation. *Biochemistry*. 50, 11084–11096 (2011).
206. H. Lie-Venema, N. M. S. van den Akker, N. A. M. Bax, E. M. Winter, S. Maas, T. Kekarainen, R. C. Hoeben, M. C. deRuiter, R. E. Poelmann, A. C. Gittenberger-de Groot, Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal*. 7, 1777–1798 (2007).
207. J. Cao, K. D. Poss, The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat. Rev. Cardiol.* 15, 631–647 (2018).
208. L. Delavallée, N. Mathiah, L. Cabon, A. Mazeraud, M. N. Brunelle-Navas, L. K. Lerner, M. Tannoury, A. Prola, R. Moreno-Loshuertos, M. Baritaud, L. Vela, K. Garbin, D. Garnier, C. Lemaire, F. Langa-Vives, M. Cohen-Salmon, P. Fernández-Silva, F. Chrétien, I. Migeotte, S. A. Susin, Mitochondrial AIF loss causes metabolic reprogramming, caspase-independent cell death blockade, embryonic lethality, and perinatal hydrocephalus. *Mol. Metab.* 40, 101027 (2020).
209. J. Suárez-Rivero, M. Villanueva-Paz, P. de la Cruz-Ojeda, M. de la Mata, D. Cotán, M. Oropesa-Ávila, I. de Lavera, M. Álvarez-Córdoba, R. Luzón-Hidalgo, J. Sánchez-Alcázar, Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases*. 5, 1 (2016).
210. D. Tondera, S. Grandemange, A. Jourdain, M. Karbowski, Y. Mattenberger, S. Herzig, S. Da Cruz, P. Clerc, I. Raschke, C. Merkwirth, S. Ehse, F. Krause, D. C. Chan, C. Alexander, C. Bauer, R. Youle, T. Langer, J.-C. Martinou, SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28, 1589–1600 (2009).
211. G. Twig, O. S. Shirihai, The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxidants Redox Signal.* 14, 1939–1951 (2011).
212. A. K. S. Camara, Y. F. Zhou, P. C. Wen, E. Tajkhorshid, W. M. Kwok, Mitochondrial VDAC1: A key gatekeeper as potential therapeutic target. *Front. Physiol.* 8, 1–18 (2017).
213. V. Shoshan-Barmatz, N. Keinan, S. Abu-Hamad, D. Tyomkin, L. Aram, Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1797, 1281–1291 (2010).
214. A. S. Greenberg, R. A. Coleman, F. B. Kraemer, J. L. McManaman, M. S. Obin, V. Puri, Q.-W. Yan, H. Miyoshi, D. G. Mashek, The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 121, 2102–2110 (2011).
215. S. J. Lee, J. Zhang, A. M. K. Choi, H. P. Kim, Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013), doi:10.1155/2013/327167.

216. A. S. Rambold, S. Cohen, J. Lippincott-Schwartz, Erratum to Fatty Acid Trafficking in Starved Cells: Regulation by Lipid Droplet Lipolysis, Autophagy, and Mitochondrial Fusion Dynamics [*Developmental Cell* 32 (2015) 678-692]. *Dev. Cell.* 33, 489–490 (2015).
217. M. Furuhashi, G. S. Hotamisligil, Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 489–503 (2008).
218. J. H. Veerkamp, H. T. van Moerkerk, Fatty acid-binding protein and its relation to fatty acid oxidation. *Mol. Cell. Biochem.* 123, 101–106 (1993).
219. C. Laurens, V. Bourlier, A. Mairal, K. Louche, P. M. Badin, E. Mouisel, A. Montagner, A. Marette, A. Tremblay, J. S. Weisnagel, H. Guillou, D. Langin, D. R. Joanisse, C. Moro, Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle. *Sci. Rep.* 6, 1–12 (2016).
220. A. Murari, S. K. Rhooms, N. S. Goparaju, M. Villanueva, E. Owusu-Ansah, An antibody toolbox to track complex I assembly defines AIF's mitochondrial function. *J. Cell Biol.* 219 (2020), doi:10.1083/JCB.202001071.
221. M. Darshi, K. N. Trinh, A. N. Murphy, S. S. Taylor, Targeting and import mechanism of coiled-coil helix coiled-coil helix domain-containing protein 3 (ChChd3) into the mitochondrial intermembrane space. *J. Biol. Chem.* 287, 39480–39491 (2012).
222. J. R. Friedman, A. Mourier, J. Yamada, J. Michael McCaffery, J. Nunnari, MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *Elife.* 2015, 1–61 (2015).
223. C. Ott, K. Ross, S. Straub, B. Thiede, M. Gotz, C. Goosmann, M. Krischke, M. J. Mueller, G. Krohne, T. Rudel, V. Kozjak-Pavlovic, Sam50 Functions in Mitochondrial Intermembrane Space Bridging and Biogenesis of Respiratory Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1173–1188 (2012).
224. S. Cogliati, C. Frezza, M. E. Soriano, T. Varanita, R. Quintana-Cabrera, M. Corrado, S. Cipolat, V. Costa, A. Casarin, L. C. Gomes, E. Perales-Clemente, L. Salviati, P. Fernandez-Silva, J. A. Enriquez, L. Scorrano, Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell.* 155, 160–171 (2013).
225. S. M. S. Budde, L. P. W. J. van den Heuvel, R. J. P. Smeets, D. Skladal, J. A. Mayr, C. Boelen, V. Petruzzella, S. Papa, J. A. M. Smeitink, Clinical heterogeneity in patients with mutations in the NDUFS4 gene of mitochondrial complex I. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26, 813–815 (2003).
226. M. Jaksch, C. Paret, R. Stucka, N. Horn, J. Muller-Höcker, R. Horvath, N. Trepesch, G. Stecker, P. Freisinger, C. Thirion, J. Müller, R. Lunchwitz, G. Rödel, E. A. Shoubridge, H. Lochmüller, Cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in SCO2, encoding a mitochondrial copper-binding protein, is rescued by copper in human myoblasts. *Hum. Mol. Genet.* 10, 3025–3035 (2001).
227. S. Miriyala, C. Thippakorn, L. Chaiswing, Y. Xu, T. Noel, A. Tovmasyan, I. Batinic-Haberle, C. W. Vander Kooi, W. Chi, A. A. Latif, M. Panchatcharam, V. Prachayasittikul, D. Allan Butterfield, M. Vore, J. Moscow, D. K. St. Clair, Novel role of 4-hydroxy-2-nonenal in AIFm2-mediated mitochondrial stress signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 91, 68–80 (2016).
228. Q. Xie, T. Lin, Y. Zhang, J. Zheng, J. A. Bonanno, Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 19673–19681 (2005).
229. M. Holeček, Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr. Metab. (Lond).* 15, 33 (2018).

230. A. J. Sweatt, M. Wood, A. Suryawan, R. Wallin, M. C. Willingham, S. M. Hutson, Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E64-76 (2004).
231. M. Holeček, The BCAA-BCKA cycle: Its relation to alanine and glutamine synthesis and protein balance. *Nutrition.* 17, 70 (2001).
232. S. M. Morris, Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 137 (2007), doi:10.1093/jn/137.6.1602s.
233. F. Papes, M. J. Surpili, F. Langone, J. R. Trigo, P. Arruda, The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system. *FEBS Lett.* 488, 34–38 (2001).
234. G. Watanabe, H. Kobayashi, M. Shibata, M. Kubota, M. Kadowaki, S. Fujimura, Regulation of free glutamate content in meat by dietary lysine in broilers. *Anim. Sci. J.* 86, 435–442 (2015).
235. X. R. Bao, S. E. Ong, O. Goldberger, J. Peng, R. Sharma, D. A. Thompson, S. B. Vafai, A. G. Cox, E. Marutani, F. Ichinose, W. Goessling, A. Regev, S. A. Carr, C. B. Clish, V. K. Mootha, Mitochondrial dysfunction remodels one-carbon metabolism in human cells. *Elife.* 5, 1–24 (2016).
236. A. L. M. Smith, J. C. Whitehall, C. Bradshaw, D. Gay, F. Robertson, A. P. Blain, G. Hudson, A. Pyle, D. Houghton, M. Hunt, J. N. Sampson, C. Stamp, G. Mallett, S. Amarnath, J. Leslie, F. Oakley, L. Wilson, A. Baker, O. M. Russell, R. Johnson, C. A. Richardson, B. Gupta, I. McCallum, S. A. C. McDonald, S. Kelly, J. C. Mathers, R. Heer, R. W. Taylor, N. D. Perkins, D. M. Turnbull, O. J. Sansom, L. C. Greaves, Age-associated mitochondrial DNA mutations cause metabolic remodeling that contributes to accelerated intestinal tumorigenesis. *Nat. Cancer.* 1, 976–989 (2020).
237. S. Lucas, G. Chen, S. Aras, J. Wang, Serine catabolism is essential to maintain mitochondrial respiration in mammalian cells. *Life Sci. Alliance.* 1, 1–10 (2018).
238. G. C. Ferreira, R. Franco, S. G. Lloyd, I. Moura, J. J. Moura, B. H. Huynh, Structure and function of ferrocyclase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 221–229 (1995).
239. J. V Dietz, M. M. Willoughby, R. B. Piel, T. A. Ross, H. G. Addis, J. L. Fox, W. N. Lanzilotta, H. A. Dailey, Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System (MICOS) Machinery Supports Heme Biosynthesis by Enabling Optimal Performance of Ferrocyclase (2021), doi:https://doi.org/10.1101/2021.06.01.446600.
240. H. J. Kim, O. Khalimonchuk, P. M. Smith, D. R. Winge, Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 1604–1616 (2012).
241. Z. Bicakci, Growth retardation, general hypotonia, and loss of acquired neuromotor skills in the infants of mothers with cobalamin deficiency and the possible role of succinyl-CoA and glycine in the pathogenesis. *Medicine (Baltimore).* 94, e584 (2015).
242. E. Tolosano, F. Altruda, Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.* 21, 297–306 (2002).
243. E. Tolosano, S. Fagoonee, N. Morello, F. Vinchi, V. Fiorito, Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxidants Redox Signal.* 12, 305–320 (2010).
244. M. C.-M. Chung, Structure and function of transferrin. *Biochem. Educ.* 12, 146–154 (1984).

245. V. P. M. van Empel, A. T. Bertrand, R. J. van Oort, R. van der Nagel, M. Engelen, H. V. van Rijen, P. A. Doevendans, H. J. Crijns, S. L. Ackerman, W. Sluiter, L. J. De Windt, EUK-8, a Superoxide Dismutase and Catalase Mimetic, Reduces Cardiac Oxidative Stress and Ameliorates Pressure Overload-Induced Heart Failure in the Harlequin Mouse Mutant. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 824–832 (2006).
246. J. H. Kang, M. Li, X. Chen, X. M. Yin, Proteomics analysis of starved cells revealed Annexin A1 as an important regulator of autophagic degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 581–586 (2011).
247. M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 582, 1783–1787 (2008).
248. E. E. Dupont-Versteegden, A. M. Kitten, M. S. Katz, R. J. McCarter, Elevated levels of albumin in soleus and diaphragm muscles of mdx mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. (New York, N.Y.)*. 213, 281–286 (1996).
249. S. Laine-Menéndez, C. Domínguez-González, A. Blázquez, A. Delmiro, I. García-Consuegra, M. Fernández-De la Torre, A. Hernández-Lain, J. Sayas, M. Á. Martín, M. Morán, Preferent diaphragmatic involvement in tk2 deficiency: An autopsy case study. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021), doi:10.3390/ijms22115598.
250. A. HEILIG, D. PETTE, Albumin in rabbit skeletal muscle. Origin, distribution and regulation by contractile activity. *Eur. J. Biochem.* 171, 503–508 (1988).
251. M. Fernández-de la Torre, C. Fiuza-Luces, P. L. Valenzuela, S. Laine-Menéndez, J. Arenas, M. A. Martín, D. M. Turnbull, A. Lucia, M. Morán, Exercise Training and Neurodegeneration in Mitochondrial Disorders: Insights From the Harlequin Mouse. *Front. Physiol.* 11, 1–15 (2020).
252. L. Sharma, J. Lu, Y. Bai, Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Curr. Med. Chem.* 16, 1266–1277 (2009).
253. A. Jay, R. Chikarmane, J. Poulik, V. K. Misra, Infantile hypertrophic cardiomyopathy associated with a novel MYL3 mutation. *Cardiol.* 124, 248–251 (2013).
254. K. Poetter, H. Jiang, S. Hassanzadeh, S. R. Master, A. Chang, M. C. Dalakas, I. Rayment, J. R. Sellers, L. Fananapazir, N. D. Epstein, Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat. Genet.* 13, 63–69 (1996).
255. T. M. Olson, M. L. Karst, F. G. Whitby, D. J. Driscoll, Myosin light chain mutation causes autosomal recessive cardiomyopathy with mid-cavitary hypertrophy and restrictive physiology. *Circulation.* 105, 2337–2340 (2002).
256. A. Van Der Laarse, Hypothesis: Troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 56, 8–14 (2002).
257. J. Liu, J. Du, C. Zhang, J. W. Walker, X. Huang, Progressive troponin I loss impairs cardiac relaxation and causes heart failure in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H1273–81 (2007).
258. K. Gundersen, J. C. Bruusgaard, Nuclear domains during muscle atrophy: Nuclei lost or paradigm lost? *J. Physiol.* 586, 2675–2681 (2008).
259. R. Ushioda, A. Miyamoto, M. Inoue, S. Watanabe, M. Okumura, K. I. Maegawa, K. Uegaki, S. Fujii, Y. Fukuda, M. Umitsu, J. Takagi, K. Inaba, K. Mikoshiba, K. Nagata, Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E6055–E6063 (2016).
260. E. S. Dremina, V. S. Sharov, M. J. Davies, C. Schöneich, Oxidation and inactivation of SERCA by selective reaction of cysteine residues with amino acid peroxides. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1462–1469 (2007).
 261. V. S. Sharov, E. S. Dremina, N. A. Galeva, T. D. Williams, C. Schöneich, Quantitative mapping of oxidation-sensitive cysteine residues in SERCA in vivo and in vitro by HPLC-electrospray-tandem MS: Selective protein oxidation during biological aging. *Biochem. J.* 394, 605–615 (2006).
 262. E. Galfré, S. J. Pitt, E. Venturi, M. Sitsapesan, N. R. Zaccai, K. Tsaneva-Atanasova, S. O'Neill, R. Sitsapesan, Fkbp12 activates the cardiac ryanodine receptor Ca^{2+} -release channel and is antagonised by fkbp12.6. *PLoS One.* 7, 2–17 (2012).
 263. J. W. M. Bassani, R. A. Bassani, D. M. Bers, Twitch-dependent SR Ca accumulation and release in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 265 (1993), doi:10.1152/ajpcell.1993.265.2.c533.
 264. L. M. Delbridge, H. Satoh, W. Yuan, J. W. Bassani, M. Qi, K. S. Ginsburg, A. M. Samarel, D. M. Bers, Cardiac myocyte volume, Ca^{2+} fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 272, H2425–H2435 (1997).
 265. D. M. Bers, Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 107–127 (2014).
 266. J. Curran, K. H. Brown, D. J. Santiago, S. Pogwizd, D. M. Bers, T. R. Shannon, Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 49, 25–32 (2010).
 267. T. Guo, T. Zhang, R. Mestril, D. M. Bers, Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ. Res.* 99, 398–406 (2006).
 268. S. Currie, E. B. Elliott, G. L. Smith, C. M. Loughrey, Two candidates at the heart of dysfunction: The ryanodine receptor and calcium/calmodulin protein kinase II as potential targets for therapeutic intervention-An in vivo perspective. *Pharmacol. Ther.* 131, 204–220 (2011).
 269. L. Zhou, M. A. Aon, T. Liu, B. O'Rourke, Dynamic modulation of Ca^{2+} sparks by mitochondrial oscillations in isolated guinea pig cardiomyocytes under oxidative stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 632–639 (2011).
 270. E. V Isaeva, V. M. Shkryl, N. Shirokova, Mitochondrial redox state and Ca^{2+} sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *J. Physiol.* 565, 855–872 (2005).
 271. Y. Yan, J. Liu, C. Wei, K. Li, W. Xie, Y. Wang, H. Cheng, Bidirectional regulation of Ca^{2+} sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 77, 432–441 (2008).
 272. R. Xia, T. Stangler, J. J. Abramson, Skeletal muscle ryanodine receptor is a redox sensor with a well defined redox potential that is sensitive to channel modulators. *J. Biol. Chem.* 275, 36556–36561 (2000).
 273. G. Salama, E. V Menshikova, J. J. Abramson, Molecular interaction between nitric oxide and ryanodine receptors of skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum. *Antioxid. Redox Signal.* 2, 5–16 (2000).

274. K. Anzai, K. Ogawa, T. Ozawa, H. Yamamoto, Oxidative modification of ion channel activity of ryanodine receptor. *Antioxid. Redox Signal.* 2, 35–40 (2000).
275. J. R. Erickson, M. A. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C. V Oddis, R. K. Bartlett, J. S. Lowe, S. E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, M. C. Zimmerman, K. Zimmerman, A.-J. L. Ham, R. M. Weiss, D. R. Spitz, M. A. Shea, R. J. Colbran, P. J. Mohler, M. E. Anderson, A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell.* 133, 462–474 (2008).
276. R. J. van Oort, A. Garbino, W. Wang, S. S. Dixit, A. P. Landstrom, N. Gaur, A. C. De Almeida, D. G. Skapura, Y. Rudy, A. R. Burns, M. J. Ackerman, X. H. T. Wehrens, Disrupted Junctional Membrane Complexes and Hyperactive Ryanodine Receptors After Acute Junctophilin Knockdown in Mice. *Circulation.* 123, 979–988 (2011).
277. S. Györke, S. C. W. Stevens, D. Terentyev, Cardiac calsequestrin: Quest inside the SR. *J. Physiol.* 587, 3091–3094 (2009).
278. T. Matsumoto, Y. Hisamatsu, T. Ohkusa, N. Inoue, T. Sato, S. Suzuki, Y. Ikeda, M. Matsuzaki, Sorcin interacts with sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *Basic Res. Cardiol.* 100, 250–262 (2005).
279. M. W. Stoner, C. F. McTiernan, I. Scott, J. R. Manning, Calreticulin expression in human cardiac myocytes induces ER stress-associated apoptosis. *Physiol. Rep.* 8, 1–11 (2020).
280. L. I. Gold, P. Eggleton, M. T. Sweetwyne, L. B. Van Duyn, M. R. Greives, S. Naylor, M. Michalak, J. E. Murphy-Ullrich, Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J.* 24, 665–683 (2010).
281. G. G. Chiang, R. T. Abraham, Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 25485–25490 (2005).
282. L. Wischhof, A. Gioran, D. Sonntag-Bensch, A. Piazzesi, M. Stork, P. Nicotera, D. Bano, A disease-associated Aifm1 variant induces severe myopathy in knockin mice. *Mol. Metab.* 13, 10–23 (2018).
283. N. A. Khan, J. Nikkanen, S. Yatsuga, C. Jackson, L. Wang, S. Pradhan, R. Kivelä, A. Pessia, V. Velagapudi, A. Suomalainen, mTORC1 Regulates Mitochondrial Integrated Stress Response and Mitochondrial Myopathy Progression. *Cell Metab.* 26, 419–428.e5 (2017).
284. R. J. Morscher, G. S. Ducker, S. H.-J. Li, J. A. Mayer, Z. Gitai, W. Sperl, J. D. Rabinowitz, Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature.* 554, 128–132 (2018).
285. M. A. A. Al-Bari, P. Xu, Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and -independent pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1467, 3–20 (2020).
286. E. S. Vincow, R. E. Thomas, G. E. Merrihew, N. J. Shulman, T. K. Bammler, J. W. MacDonald, M. J. MacCoss, L. J. Pallanck, Autophagy accounts for approximately one-third of mitochondrial protein turnover and is protein selective. *Autophagy.* 15, 1592–1605 (2019).
287. V. Cohen-Kaplan, A. Ciechanover, I. Livneh, P62 at the crossroad of the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Oncotarget.* 7, 83833–83834 (2016).
288. M. Mirsaeidi, S. Gidfar, A. Vu, D. Schraufnagel, Annexins family: Insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. *J. Transl. Med.* 14, 1–9 (2016).
289. R. Debret, H. El Btaouri, L. Duca, I. Rahman, S. Radke, B. Haye, J. M. Sallenave, F. Antonicelli, Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR

- cells. *FEBS Lett.* 546, 195–202 (2003).
290. B. Ferraro, G. Leoni, R. Hinkel, S. Ormanns, N. Paulin, A. Ortega-Gomez, J. R. Viola, R. de Jong, D. Bongiovanni, T. Bozoglu, S. L. Maas, M. D'Amico, T. Kessler, T. Zeller, M. Hristov, C. Reutelingsperger, H. B. Sager, Y. Döring, M. Nahrendorf, C. Kupatt, O. Soehnlein, Pro-Angiogenic Macrophage Phenotype to Promote Myocardial Repair. *J. Am. Coll. Cardiol.* 73, 2990–3002 (2019).
 291. C. X. Qin, S. B. Finlayson, A. Al-Sharea, M. Tate, M. J. De Blasio, M. Deo, S. Rosli, D. Prakoso, C. J. Thomas, H. Kiriazis, E. Gould, Y. H. Yang, E. F. Morand, M. Perretti, A. J. Murphy, X.-J. Du, X.-M. Gao, R. H. Ritchie, Author Correction: Endogenous Annexin-A1 Regulates Haematopoietic Stem Cell Mobilisation and Inflammatory Response Post Myocardial Infarction in Mice In Vivo. *Sci. Rep.* 8 (2018), p. 7185.
 292. R. C. M. De Jong, N. J. Pluijmert, M. R. De Vries, K. Pettersson, D. E. Atsma, J. W. Jukema, P. H. A. Quax, Annexin A5 reduces infarct size and improves cardiac function after myocardial ischemia-reperfusion injury by suppression of the cardiac inflammatory response. *Sci. Rep.* 8, 4–13 (2018).
 293. M. Tong, N. Che, L. Zhou, S. T. Luk, P. W. Kau, S. Chai, E. S. Ngan, C. M. Lo, K. Man, J. Ding, T. K. Lee, S. Ma, Efficacy of annexin A3 blockade in sensitizing hepatocellular carcinoma to sorafenib and regorafenib. *J. Hepatol.* 69, 826–839 (2018).
 294. G. Ghislat, C. Aguado, E. Knecht, Annexin A5 stimulates autophagy and inhibits endocytosis. *J. Cell Sci.* 125, 92–107 (2012).
 295. S. Réty, D. Osterloh, J. P. Arié, S. Tabaries, J. Seeman, F. Russo-Marie, V. Gerke, A. Lewit-Bentley, Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I. *Structure.* 8, 175–184 (2000).
 296. D. Verzili, C. Zamparelli, B. Mattei, A. A. Noegel, E. Chiancone, The sorcin-annexin VII calcium-dependent interaction requires the sorcin N-terminal domain. *FEBS Lett.* 471, 197–200 (2000).
 297. E. Camors, V. Monceau, D. Charlemagne, Annexins and Ca²⁺ handling in the heart. *Cardiovasc. Res.* 65, 793–802 (2005).
 298. R. Vettor, A. Valerio, M. Ragni, E. Trevelin, M. Granzotto, M. Olivieri, L. Tedesco, C. Ruocco, A. Fossati, R. Fabris, R. Serra, M. O. Carruba, E. Nisoli, Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: Role in adaptation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 306, 519–528 (2014).
 299. H. Wang, Y. Bei, Y. Lu, W. Sun, Q. Liu, Y. Wang, Y. Cao, P. Chen, J. Xiao, X. Kong, Exercise prevents cardiac injury and improves mitochondrial biogenesis in advanced diabetic cardiomyopathy with PGC-1 α and Akt activation. *Cell. Physiol. Biochem.* 35, 2159–2168 (2015).
 300. D. Jia, L. Hou, Y. Lv, L. Xi, Z. Tian, Postinfarction exercise training alleviates cardiac dysfunction and adverse remodeling via mitochondrial biogenesis and SIRT1/PGC-1 α /PI3K/Akt signaling. *J. Cell. Physiol.* 234, 23705–23718 (2019).
 301. R. Ghahremani, A. Damirchi, I. Salehi, A. Komaki, F. Esposito, Mitochondrial dynamics as an underlying mechanism involved in aerobic exercise training-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 213, 102–108 (2018).
 302. S. K. Powers, R. Deminice, M. Ozdemir, T. Yoshihara, M. P. Bomkamp, H. Hyatt, Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J. Sport Heal. Sci.* 9, 415–425 (2020).

303. S. K. Powers, M. J. Jackson, Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* 88, 1243–1276 (2008).
304. C. Henríquez-Olguin, J. R. Knudsen, S. H. Raun, Z. Li, E. Dalbram, J. T. Treebak, L. Sylow, R. Holmdahl, E. A. Richter, E. Jaimovich, T. E. Jensen, Cytosolic ROS production by NADPH oxidase 2 regulates muscle glucose uptake during exercise. *Nat. Commun.* 10, 1–11 (2019).
305. B. R. Rønnestad, H. Hamarsland, J. Hansen, E. Holen, D. Montero, J. E. Whist, C. Lundby, Five weeks of heat training increases haemoglobin mass in elite cyclists. *Exp. Physiol.* 106, 316–327 (2021).
306. Sepriadi, K. Jannah, Eldawaty, The effect of jogging exercise to improve hemoglobin levels. *J. Phys. Conf. Ser.* 1481 (2020), doi:10.1088/1742-6596/1481/1/012028.
307. M. Hu, W. Lin, Effects of exercise training on red blood cell production: implications for anemia. *Acta Haematol.* 127, 156–164 (2012).
308. T. K. Danielsen, M. Sadredini, R. Manotheepan, J. M. Aronsen, M. Frisk, M. H. Hansen, K. W. Andressen, K. Hougen, F. O. Levy, W. E. Louch, O. M. Sejersted, I. Sjaastad, M. K. Stokke, Exercise Training Stabilizes RyR2-Dependent Ca²⁺ Release in Post-infarction Heart Failure. *Front. Cardiovasc. Med.* 7 (2021), doi:10.3389/fcvm.2020.623922.
309. M. A. Carneiro-Júnior, J. F. Quintão-Júnior, L. R. Drummond, V. N. Lavorato, F. R. Drummond, M. A. Amadeu, E. M. Oliveira, L. B. Felix, J. S. Cruz, J. G. Mill, A. J. Natali, T. N. Prímola-Gomes, Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 47, 960–965 (2014).
310. C. H. Shao, X. H. T. Wehrens, T. A. Wyatt, S. Parbhu, G. J. Rozanski, K. P. Patel, K. R. Bidasee, Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J. Appl. Physiol.* 106, 1280–1292 (2009).
311. N. P. L. Rolim, A. Medeiros, K. T. Rosa, K. C. Mattos, M. C. Irigoyen, E. M. Krieger, J. E. Krieger, C. E. Negrão, P. C. Brum, Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol. Genomics.* 29, 246–252 (2007).
312. T. Kohl, G. Weninger, R. Zalk, P. Eaton, S. E. Lehnart, Intensity matters: Ryanodine receptor regulation during exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15271–15272 (2015).
313. A. Rocchi, C. He, Regulation of Exercise-Induced Autophagy in Skeletal Muscle. *Curr. Pathobiol. Rep.* 5, 177–186 (2017).
314. C. Schwalm, C. Jamart, N. Benoit, D. Naslain, C. Prémont, J. Prévét, R. Van Thienen, L. Deldicque, M. Francaux, Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 3515–3526 (2015).
315. A. M. Fritzen, C. Frøsig, J. Jeppesen, T. E. Jensen, A. M. Lundsgaard, A. K. Serup, P. Schjerling, C. G. Proud, E. A. Richter, B. Kiens, Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle. *Cell. Signal.* 28, 663–674 (2016).
316. Y. A. Kim, Y. S. Kim, W. Song, Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J. Physiol. Biochem.* 68, 229–235 (2012).

ANEXOS

MATERIAL SUPLEMENTARIO**Tabla S1.** Proteínas con expresión diferencial pertenecientes a la familia de las anexinas, identificadas en el análisis proteómico de corazón en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
P97384	ANXA11	5	4	0,988	1,219	1,203
P48036	ANXA5	18	18	1,039	1,32	1,36
O35639	ANXA3	5	4	1,019	1,589	1,679
P10107	ANXA1	6	6	1,165	1,623	1,641

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S2. Proteínas con expresión diferencial relacionadas con el transporte de ácidos grasos, identificadas en el análisis proteómico de corazón en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
Q05816	FABP5	4	4	1,012	1,749	1,758
P04117	FABP4	16	16	0,988	1,214	1,208

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S3. Proteínas con expresión diferencial pertenecientes al proceso OXPHOS, identificadas en el análisis proteómico de corazón en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
Q8BK30	NDUFV3	4	4	1,001	0,672	0,893
Q5SUD5	SCO1	2	2	0,988	0,704	0,747
Q9CQY6	UQCC2	2	2	0,906	0,709	0,665
Q9D881	GM11273	6	6	0,965	0,769	0,826
Q9Z1P6	NDUFA7	9	9	1,007	0,781	0,823
Q9CQZ6	NDUFB3	2	2	0,972	0,784	0,824
Q9CQZ5	NDUFA6	5	5	1,024	0,788	0,873
Q9DC69	NDUFA9	12	12	0,964	0,798	0,829
Q9ERS2	NDUFA13	5	5	1,012	0,812	0,915
Q9DC70	NDUFS7	2	2	1,004	0,812	0,878

Anexos

Q9CQC7	NDUFB4	7	7	1,019	0,824	0,855
P52503	NDUFS6	8	8	1,028	0,83	0,861
P56391	COX6B1	9	9	1,026	0,835	0,879
P19783	COX4I1	13	13	1,007	0,837	0,852
O09111	NDUFB11	2	2	1,043	0,84	0,855
Q9CQJ8	NDUFB9	9	9	0,936	0,84	0,883
Q9CPP6	NDUFA5	4	4	1,148	0,842	0,895
P12787	COX5A	8	8	1,023	0,845	0,878
Q9CQ54	NDUFC2	5	5	0,965	0,85	0,875
Q9CQ75	NDUFA2	6	6	1,028	0,856	0,909
P00405	MTCO2	4	4	0,915	0,859	0,851
A0A140LIU 4	COX7A1	2	2	0,951	0,861	0,863
Q91VD9	NDUFS1	33	33	0,988	0,862	0,923
Q9D6J5	NDUFB8	3	3	0,952	0,864	0,893
Q9CR61	NDUFB7	3	3	1,191	0,875	0,891
Q91WD5	NDUFS2	14	14	0,951	0,876	0,941
A0A0R4J27 5	NDUFA12	5	5	0,988	0,877	0,905
Q9D0M3	CYC1	9	9	1,003	0,877	0,953
Q8K3J1	NDUFS8	5	5	0,792	0,878	0,878
Q9CR68	UQCRFS1	12	12	0,983	0,882	0,901
Q9DCJ5	NDUFA8	9	9	1,025	0,885	0,952
Q9DB77	UQCRC2	21	21	1,009	0,89	0,922
Q9D6J6	NDUFV2	11	11	0,969	0,893	0,926
Q3UIU2	NDUFB6	2	2	1,102	0,895	0,953
Q99LY9	NDUFS5	6	6	1,002	0,899	0,936
Q9CPQ1	COX6C	7	7	1,015	0,914	0,849
Q9CRA7	ATP5S	2	2	0,921	0,876	0,926

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S4. Proteínas con expresión diferencial relacionadas con el transporte y la biosíntesis del grupo hemo, identificadas en el análisis proteómico de corazón en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
P02089	HBB-B2	13	6	1,073	0,556	0,892
Q91VB8	HBA-A1	12	2	0,888	0,616	0,549

P02088	HBB-B1	14	3	1,138	0,692	1,034
P01942	HBA	12	2	0,96	0,717	0,729
A8DUK4	HBB-BS	14	5	0,858	0,741	0,602
Q544X6	FECH	4	4	0,982	0,88	0,838
Q921I1	TF	36	35	0,903	1,173	1,307
Q91X72	HPX	11	11	0,923	1,289	1,408

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S5. Proteínas con expresión diferencial relacionadas con la respuesta antioxidante, identificadas en el análisis proteómico de corazón en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
P20108	PRDX3	6	6	0,943	1,124	1,145
P99029	PRDX5	12	12	1,012	1,145	1,13
O08709	PRDX6	10	6	0,991	1,193	1,102
P35700	PRDX1	9	9	1,025	1,242	1,202
P07724	ALB	51	51	0,928	1,269	1,365
P09671	SOD2	9	9	0,966	1,296	1,28

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S6. Proteínas con expresión diferencial constituyentes del sarcómero, identificadas en el análisis proteómico de corazón en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
P09541	MYL4	4	3	1,623	0,371	0,446
P48787	TNNI3	13	13	1,09	0,493	0,459
P09542	MYL3	17	15	1,084	0,494	0,339
P51667	MYL2	14	5	0,991	0,499	0,352
P19123	TNNC1	6	6	1	0,547	0,488
J3QQ13	TNNT2	11	11	1,029	0,57	0,599
P68033	ACTC1	28	9	1,044	0,581	0,535
P58771	TPM1	31	20	1,114	0,594	0,548
Q02566	MYH6	40	40	1,081	0,766	0,602
Q9DC77	SMPX	2	2	1,015	0,768	0,768
P05977	MYL1	2	1	1,039	0,773	0,758

Q3UIK0	MYBPC3	42	42	1,186	0,86	0,869
---------------	--------	----	----	-------	------	-------

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S7. Proteínas con expresión diferencial relacionadas con el manejo de Ca²⁺, identificadas en el análisis proteómico de corazón en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
P50543	S100A11	2	2	1,111	1,43	1,39
F6QYE1	CASQ2	6	6	0,916	1,242	1,104
Q6P069	SRI	2	2	1,091	1,22	1,121
P14211	CALR	6	6	1,011	1,177	1,201
Q9ET78	JPH2	2	2	0,991	0,792	0,781

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S8. Análisis proteómico de las modificaciones oxidativas post-traduccionales en cisteínas de proteínas relacionadas con el transporte y biosíntesis del grupo hemo en corazón.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	PTM	AMINOÁCIDO	HQ SED/ WT SED
Q921H1	TF	Carbamidometilación	Cys (472)	31,98
Q921H1	TF	Carbamidometilación	Cys (517)	2,52
Q921H1	TF	Carbamidometilación	Cys (583)	2,01
Q921H1	TF	Carbamidometilación	Cys (373)	1,64
Q921H1	TF	Carbamidometilación	Cys (67)	1,62
Q921H1	TF	Carbamidometilación	Cys (260)	1,55
Q921H1	TF	Carbamidometilación	Cys (246)	1,51
G3X9T8	CP	Carbamidometilación	Cys (356)	1,79
Q91X72	HPX	Carbamidometilación	Cys (406)	1,74
Q91X72	HPX	Carbamidometilación	Cys (433)	1,73
Q91X72	HPX	Carbamidometilación	Cys (153)	1,62

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org, el tipo de modificación detectada; el residuo modificado; y la ratio de la modificación relativizada respecto al valor correspondiente del grupo *wild type* (WT). La carbamidometilación es una modificación que se introduce en residuos oxidados de cisteína para su detección. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *Harlequin* entrenado, HQ SED.

Tabla S9. Análisis proteómico de las modificaciones oxidativas post-traduccionales en cisteínas de la albúmina y PRDX6 en corazón.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	PTM	AMINOÁCIDO	HQ SED/ WT SED
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (538)	7,25
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (582)	5,18
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (583)	5,18
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (86)	4,82
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (114)	4,33
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (115)	4,33
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (277)	4,14
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (270)	4,07
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (269)	4,07
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (462)	3,89
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (302)	3,88
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (303)	3,88
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (148)	2,83
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (501)	2,51
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (99)	2,44
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (591)	2,36
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (201)	2,36
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (461)	2,28
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (125)	2,25
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (472)	2,2
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (289)	2,16
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (416)	1,94
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (485)	1,94
Q6GT24	PRDX6	Carbamidometilación	Cys (47)	1,32

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org, el tipo de modificación detectada; el residuo modificado; y la ratio de la modificación relativizada respecto al valor correspondiente del grupo wild type (WT). La carbamidometilación es una modificación que se introduce en residuos oxidados de cisteína para su detección. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *Harlequin* entrenado, HQ SED.

Tabla S10. Análisis proteómico de las modificaciones oxidativas post-traduccionales en cisteínas de proteínas relacionadas con el manejo de Ca²⁺ en corazón.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	PTM	AMINOÁCIDO	HQ SED/ WT SED
P35564	CANX	Carbamidometilación	Cys (361)	2,69
P35564	CANX	Carbamidometilación	Cys (367)	2,69
P14211	CALR	Carbamidometilación	Cys (137)	2,65

Anexos

P14211	CALR	Carbamidometilación	Cys (105)	1,67
Q7TQ48	SRL	Carbamidometilación	Cys (456)	1,91
Q7TQ48	SRL	Carbamidometilación	Cys (461)	1,8
O55143	SERCA2	N-etilmaleimida	Cys (498)	0,58

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org, el tipo de modificación detectada; el residuo modificado; y la ratio de la modificación relativizada respecto al valor correspondiente del grupo wild type (WT). La carbamidometilación es una modificación que se introduce en residuos oxidados de cisteína para su detección. La modificación por n-etilmaleimida marca tioles reducidos en cisteínas. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *Harlequin* entrenado, HQ SED.

Tabla S11. Proteínas con expresión diferencial pertenecientes al proceso OXPHOS, identificadas en el análisis proteómico de bíceps femoral en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
Q16795	NDUFA9	4	4	0,970	0,812	0,999
Q05769	COX2	3	3	0,883	0,837	0,867
Q9CZ13	UQCRC1	9	9	0,890	0,849	0,834
UQCRC2	UQCRC2	10	10	0,956	0,849	0,870
Q9DCT2	NDUFS3	4	4	0,987	0,860	0,874
Q91VD9	NDUFS1	8	8	0,944	0,864	0,844
P56480	ATP5B	21	21	0,896	0,877	0,936

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S12. Proteínas relacionadas con el transporte de ácidos grasos, con expresión diferencial, identificadas en el análisis proteómico de bíceps femoral en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
A0A140T8 V1	FABP3	3	3	0,832	1,353	1,387
P04117	FABP4	3	3	1,027	1,448	1,561

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S13. Niveles de albúmina identificados en el análisis proteómico de bíceps femoral en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
P07724	ALB	28	28	0,996	1,213	1,292

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S14. Proteínas con expresión diferencial constituyentes del sarcómero, identificadas en el análisis proteómico de bíceps femoral en el estudio de la intervención.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
Q5SX39	MyHC-2b	51	51	0,919	0,472	0,489
P97457	MYLPF	12	12	1,025	0,729	1,010
P68134	ACTA1	15	6	1,029	0,770	0,795
P20801	TNNC2	7	6	1,006	0,788	0,881
P05977	MYL1	9	9	0,936	0,807	0,983
A2A6I8	TNNT3	3	3	1,117	0,819	0,957
A2A6K0	TNNI2	3	3	1,038	0,831	0,923
A0A1B0	PDLIM3	2	2	1,040	1,235	1,230
GSX6						

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S15. Proteínas con expresión diferencial relacionadas con el manejo de Ca²⁺, identificadas en el análisis proteómico de bíceps femoral en el estudio de la intervención.

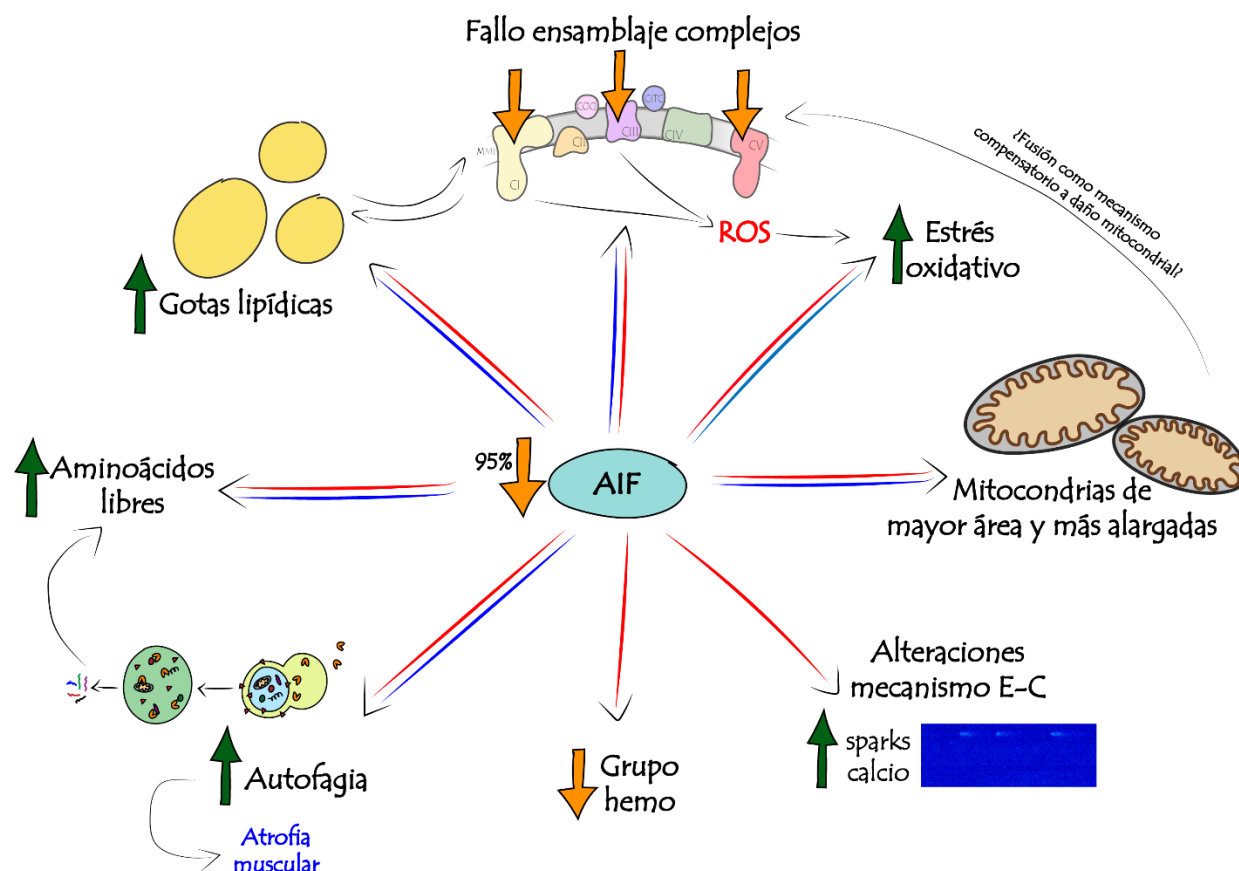
CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	NUM. PÉPTIDOS	PÉPTIDOS ÚNICOS	WT ENT/ WT SED	HQ SED/ WT SED	HQ ENT/ WT SED
Q8R429	SERCA1	27	44	0,945	0,881	0,864
O55143-2	SERCA2	2	19	1,320	1,391	1,113
K3W4M2	RYR1	18	18	0,960	0,865	0,834
O09165	CASQ1	7	7	0,929	0,828	0,856
Q3TMP8	TMEM38A	3	3	0,893	0,880	0,781

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org; la abreviatura de la proteína; el número de péptidos identificados y de péptidos únicos; y las ratios de expresión de cada proteína en los distintos grupos experimentales relativizadas respecto al valor del grupo *wild type* sedentario. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *wild type* entrenado, WT ENT; *Harlequin* sedentario, HQ SED; *Harlequin* entrenado, HQ ENT.

Tabla S16. Análisis proteómico de las modificaciones oxidativas post-traduccionales en cisteínas de la albúmina en cuádriceps.

CÓDIGO ACCESO	PROTEÍNA	PTM	AMINOÁCIDO	HQ SED/ WT SED
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (582)	9,09
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (583)	9,09
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (114)	9,01
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (115)	9,01
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (86)	8,07
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (77)	8,07
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (461)	6,71
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (462)	6,71
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (301)	5,76
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (302)	5,76
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (289)	5,27
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (269)	4,93
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (270)	4,93
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (148)	4,57
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (125)	4,16
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (200)	3,78
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (500)	3,39
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (591)	3,27
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (99)	3,11
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (416)	3,05
P07724	ALB	Carbamidometilación	Cys (472)	2,66

Se muestran: el código de acceso de la proteína en www.uniprot.org, el tipo de modificación detectada; el residuo modificado; y la ratio de la modificación relativizada respecto al valor correspondiente del grupo wild type (WT). La carbamidometilación es una modificación que se introduce en residuos oxidados de cisteína para su detección. Abreviaturas: *wild type* sedentario, WT SED; *Harlequin* entrenado, HQ SED.

RESUMEN GRÁFICO

Resumen gráfico. Esquema resumen de las principales alteraciones encontradas en corazón (marcadas con flechas rojas) y músculo esquelético (flechas azules) del ratón *Harlequin*. La deficiencia de AIF da lugar a un fallo en el ensamblaje de algunos complejos de la cadena transportadora de electrones (concretamente, en los complejos I, III y V en corazón; y en el complejo I en cuádriceps), que solamente se traduce en un descenso de actividad del complejo I en cuádriceps. Además, también se observa un incremento del estrés oxidativo en ambos tejidos, probablemente debido a una mayor producción de ROS por la cadena transportadora de electrones. Por otro lado, la ultraestructura mitocondrial resulta alterada, con unas mitocondrias más alargadas y de mayor área, probablemente debido a un aumento en la fusión mitocondrial como mecanismo compensatorio a un posible fallo OXPHOS. Además, se observa una distribución alterada de lípidos, con un aumento de los niveles de gotas lipídicas en ambos tejidos. Esto podría suponer una fuente de acetil coA para aumentar la función del proceso OXPHOS, o bien ser un mecanismo para almacenar un posible exceso de lípidos y evitar una situación de toxicidad en la célula. Por otro lado, tanto en corazón como en cuádriceps se observa una mayor cantidad de aminoácidos libres, debido a un mayor catabolismo proteico, posiblemente mediante un aumento en los niveles de autofagia. De esta manera, los aminoácidos serían utilizados para satisfacer las necesidades energéticas de los propios tejidos y de otros, como el cerebro, en el que existe un marcado déficit de glutamato. Por otro lado, se observan alteraciones en el mecanismo de excitación-contracción de los cardiomiocitos, consistentes en una mayor fuga de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) mediada por *sparks*, y una menor capacidad de recaptación del Ca^{2+} hacia el RS durante la diástole. Por último, se observa un menor nivel de hemoglobina y mioglobina en corazón, que podría ser atribuido a un fallo en la biosíntesis del grupo hemo.