



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

ROL DE *eIF4E* Y *4E-BP*, EFECTORES DE LA VÍA TOR, EN EL ENVEJECIMIENTO CARDIOVASCULAR Y ARRITMOGÉNESIS

Tesista: Lic. Manuela Santalla

Directora: Dra. Paola Ferrero

Codirector: Dr. Carlos Valverde

Codirectora: Dra. Alicia Mattiazzi

Año: 2018

RECONOCIMIENTOS

A las autoridades del Centro de Investigaciones Cardiovasculares “Dr. Horacio E. Cingolani”, Dr. Martín Vila Petroff y Dr. Alejandro Aiello, por abrirme las puertas de esta hermosa familia y darme el espacio para desarrollarme y llevar a cabo esta tesis doctoral.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires quien me otorgó una beca de iniciación con la que llevé a cabo mis primeros dos años de tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca de finalización de doctorado con la que llevé a cabo mis últimos dos años de tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata, casa donde llevé a cabo mis estudios de posgrado.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA) lugar donde llevé a cabo mis estudios de grado y donde me desempeñé como docente.

AGRADECIMIENTOS

Lo que más ansiaba de escribir la tesis era poder redactar los agradecimientos. Acá me encuentro, hoja en blanco mediante, sin saber cómo empezar. No porque no tenga qué agradecer sino porque me desbordan las palabras. Podría escribir toda otra tesis sobre los miles de gracias que tengo para decir. Podría hasta relatar millones de anécdotas hermosas que acompañaron estos 4 años de tesis. Porque una tesis no es solo pipetear, llorar, escribir y pensar. La tesis es un *todos los días*. TODOS, no sólo los días hábiles, los sábados, domingos y feriados también. Y todos los días, en 4 años- contando con uno bisiesto- fueron algo así como 1461 días. Si lo llevamos a horas y minutos (cosa que los que me conocen saben que me hubiera encantado hacer) es algo así como “una banda de tiempo”. El tiempo pasa, el tiempo no se recupera, es tiempo que hay que saber invertir. Tiempo entre alegrías, llantos y aprendizaje que no hubiera sido posible sobrellevar si no fuera por todos y cada uno de los que hoy componen un pedacito de esta tesis, y ya forman parte de esta Manu. Doctora o no, de esta Manu que sale del punto final de esta tesis para abrazarlos y agradecerles a cada uno. Porque sin dudas, fueron parte de la tesis, pero más aún de lo que hoy soy.

Para empezar a ponerle nombre a los agradecimientos, el primero es sin duda alguna para la persona que me abrió las puertas al mágico mundo de la ciencia. “Que sepa abrir la puerta para ir a jugar” pregona el *Arroz con leche*, canción con la que más de uno de nosotros hemos crecido. Si hay puerta que Pao-porque para mí es Pao, no la Dra. Ferrero- me abrió fue la del juego. La de juego apasionado con el conocimiento. Como en todo juego, alguien nos tiene que guiar, enseñar las reglas, curar una herida si tropezamos al saltar y empujarnos para volver a intentarlo cuando parece que no vamos a poder jugar más. Gracias, Pao, por enseñarme, apoyarme, incentivar me y sobre todo por dejarme pensar. Encontré en vos una guía y también una compañera. Una amiga de charlas enredadas de *de todo un poco*, una apasionada más por la ciencia con la que pude ser más yo que nunca y alimentar esa Santallita curiosa y pensativa. Gracias por dejarme pensar, por darme el espacio para desenmarañar nudos, por escuchar mis ideas y ayudarme a llevarlas a cabo. Gracias por los mates y las cervezas. Sin dudas me llevo de vos el mejor aprendizaje.

Las ideas, las locuras, los experimentos y los resultados con los que nos fuimos encontrando tampoco serían lo que son si en el camino no hubieran apoyado, sostenido y acompañado Charly y Alicia, mis codirectores. Gracias, por enseñarme a trabajar en equipo, a pensar y aprender un montón de cosas que jamás creí que podía saber. El agradecimiento más grande es por transmitirme la pasión por la ciencia, por demostrarme que se puede, y que la constancia y el amor por lo que uno hace trasciende cualquier obstáculo.

Todos estos años se vivió bajo un techo. El techo del Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Que más que institución donde desarrollé mi tesis fue un hogar. Y a los hogares los componen más las personas que el mobiliario. Al Centro de Investigaciones Cardiovasculares le agradezco ser mi hogar, mi familia. El día a día se sostiene en equipo, y este equipo tiene la particularidad de contar con una energía y una puja conjunta que sin dudas debe ser envidiada por cualquier otra institución. A la enorme familia del CIC, gracias por cobijarme en sus brazos, por el sostén y el apoyo de estos años.

Dentro de la gran familia, a los amigos. Esos que aparecen de casualidad mesada o pasillo de por medio y se convierten en lo más valioso e importante del camino. Esos que pasaron de compañeros de trabajo a compañeros de aventuras, de sonrisas, llantos y birras. A Breita, que trascendió cualquier barrera para pasar de compañera a amiga, a hermana, a oxígeno y surfactante. Gracias, Breita. Por ser parte de la raíz y el tallo. Por sostener, empujar, acompañar, compartir y dejarme que sea recíproco. A La Plata no le tenía nada de fe, al Pincha mucha menos, y me regalaron lo mejor de estos últimos 4 años y lo que, sin dudas, seguirá siendo lo mejor de este camino loco por la vida. A Barbi por las risas, los abrazos, las noches de baile y los viajes. Por los 12 de enero en Azul (tenés record histórico), por las interminables charlas y las resacas. Gracias por alegrarme el camino, ambas sabemos que eso es siempre lo que más necesito. A Salitas, por ser ese amigo que siempre me hace falta. El compinche, el jodón, el consejero masculino que toda amiga necesita. Por sostenerme, acompañarme, charlarme hasta que me quede dormida y despertarme con el mate. A Caro, gracias por darme la oportunidad de conocerte. De dejarme ayudar y cuidar. Por las charlas desvariadas por las ramas. Por estar al lado mío en la mesada, aconsejarme y meterme garra. Por ser y dejarme ser amiga. A Sofi, que aunque un patio nos separaba siempre estuvo para un mate, una charla de relax o las juntadas extra laborales. Por los afterlab y las charlas interminables. Al Chino, ese compañerito nuevo que se ganó enseguida el cariño. Gracias por la compañía y el apoyo constante. Por la ayuda brindada, por la complicidad, por los almuerzos, las charlas. Gracias por estar. A todos los "CIC nuevo" que estuvieron para acompañar con mates, risas, buena onda y alegría cada día, aunque no fuera el mejor día individual. Por ser un grupo maravilloso, que empuja para el mismo lado, el de la felicidad de los compañeros. Juan, Lu, Fer, Ale, Anita, Gabita (la que más se extraña), Patri, gracias, aunque me ponga los auriculares cuando aísló corazones, los quiero y adoro pasar tiempo con ustedes.

Pero, por suerte, las maravillas no quedaron dentro de las puertas del CIC. Sino que la ciencia me supo regalar dos maravillas más. Que afortunadamente siempre estuvieron cruzando un patio, dando la vuelta de la esquina o caminando un par de cuadras. Si hay dos personas que hicieron que mi vida en esta ciudad dejara de ser un sinsentido para convertirse en una vida normal, esas dos personas son Sabi y Romi. A quienes me unió el amor nerd y gestamos un amor que hizo que no nos separemos más. Gracias a ambas, por ser ese sostén incondicional, por todas y cada una de las charlas, los mates, las cenas, los reactivos prestados, la discusión de resultados y el planeamiento científico. Por las escapadas viajeras, las fotos tomadas sin permiso, las risas, los llantos y los tragos. Gracias por ser mis amigas, esas que se ganan de casualidad y quedan para siempre.

En el camino tuve la suerte de caminar otras tierras, otra cultura en medio de esta locura llamada doctorado y ciencia. Así fue como tuve el inmenso placer de conocer al magnífico grupo del InCan. A ese *Team Traslation* al que no puedo dejar de pertenecer aunque 8025 kilómetros nos separen. A quienes admiro y extraño a la distancia. Un *gracias* enorme a Greek (doctor Greco Hernández, para ustedes) porque en tan poco tiempo aprendí un montón con vos. Aprendí técnicas nuevas, a pensar de otra manera, a vivir en otro lugar. Gracias por compartir tus conocimientos, pero por sobre todo por hacerme sentir una más. Por las charlas de ciencia, de literatura, de ficción. Gracias por ayudarme en este camino y estar dispuesto a que desde acá puedan salir muchas más cosas juntos. Fue realmente un enorme placer trabajar con vos, conocer tu tierra, leer tus libros y ser una más de tus escuincles. A ellos, mil gracias. Por incorporarme a su grupo como una más, sin importar que hablara distinto y tomara un breva con bombilla todo el día. Gracias por enseñarme, tenerme paciencia, llevarme a pasear. Gracias por los afterlab, los viajes y los mates que aprendieron a compartir. Un *gracias* especial a mi rommie, Gio, por dejar de lado el prejuicio, dejarse querer por una argentina y no dejarla nunca de querer. Gracias por ser mi amiga casi desde el día cero, por acompañarme en mis locuras, por reírte y enojarte conmigo (pinchegil). Gracias por los mates, las tortafritas y las birras. Estar en otra tierra era un desafío enorme, uno de los más fuertes que me tocó vivir en este camino al doctorado y sin dudas fue hermoso gracias a ustedes.

Pero no todo es ciencia, Santalla. Hay una vida más allá del ADN. Sí, y eso casi que lo aprendí cuando entré en We Dance. Hay una vida que involucra el sacrificio físico, la fuerza, la danza y la alegría. Cuando uno trabaja con la cabeza, como nosotros, nuestro instrumento de trabajo lo llevamos a todos lados. Solo en We encontré el lugar donde dejarla un rato. Gracias a los amigos poleros por bancar la parada, por sostenerme para que no me caiga, por decirme que sí podía, por darme aliento y por bancarme las nerdeadas en clase. Sobre todo por bancar y apoyar estos meses de tesis sin casi siquiera saber con qué se comía. Gracias por preguntar, bancar y estar ahí. Por la alegría, por los handsping que no salieron aún y por los que van a salir. Salidita de We, gracias Cami por salir del aula a rumbear la vida conmigo. Por confiar en mí, por las charlas, los bailes, Damas Gratis y las birras. Porque nos faltan mucho más, y ahora vas a tener una amiga doctora. A las carbonos, los afterpole. A Bubu que le debo un invento que tenemos planeado para el futuro y a Seba la confianza y el sostén. El doctorado y la tesis posiblemente me hubieran quemado las neuronas si no hubiera encontrado en We un lugar donde descargar y ser feliz.

Gracias también a Euge, porque los 10 años de amistad se consumaron cuando vine a vivir acá e hicimos siempre todo lo que pudimos por estar. Por las charlas mezclando la ciencia en las naturales y las sociales. Por las comidas excelentes y por el aguante *since 2007*. A mi Barbarita, gracias por esa fuerza y energía que me das siempre, porque sos la prima que debería haber sido hermana más genial del universo.

Y si algún día llegué hasta acá, con el afán de conseguir el título de doctora fue porque antes obtuve otro título académico al cual llegué siendo la persona más feliz del universo. Y si lo fui, fue porque tuve una familia hermosa acompañándome. Gracias a ese *Hay Equipo* porque siempre estuvieron, distancia y tiempo mediante. Porque son esos amigos que cualquiera quiere tener. Porque lejos o cerca están acompañando siempre.

Gracias a mi Simbionte, porque solo una amistad tan linda y fuerte entre dos personas tan mal de la cabeza puede ser titulada con una interacción entre organismos vivos. Gracias por compartir mi locura, por los consejos, por el empuje constante, y por compartir desde lo más profundo todo lo que sentí. Gracias por hacer este doctorado conmigo, y doctorarte hoy conmigo. Gracias por los bailes cuando lo festejemos. Por dejarme ser tía de Juanita y por apoyarme como pocos.

Gracias también a los amigos de siempre, que a la distancia caminaron este camino al doctorado conmigo. Lu, Chichi, Mari, Pichi, Vane, miles de millones de gracias. Porque no importa que tan perdida pueda sentirme en la vida, ustedes están ahí, siempre para hacerme saber que todo va a estar bien. Gracias por, entendiendo o no, esta locura del doctorado, apoyarme y darme aliento siempre.

Gracias Lu B, por menear conmigo en una playa de Punta Cana y no soltarme más. Porque tu energía vino a darme mucha luz cuando las cosas parecían tan solo tender a la oscuridad. Gracias por admirarme y hacerme pasar esa vergüenza linda mezclada con amor. Gracias por ser mi amiga desde hace 28 años aunque nos conozcamos hace 2.

A medida que iba enumerando personas me daba más miedo olvidarme de alguien. Es que cuando uno quiere agradecer hay tantos gracias para dar que entre el montón los actos de amor pueden pasar todos como igual. Creo que no habiendo olvidado a nadie, ha llegado el momento del final.

El GRACIAS final, que no por último es menos importante sino todo lo contrario, es para mi familia. Le puedo deber la Santalla profesional a un par de instituciones educativas, pero la Santalla que realmente en esencia soy se la debo eterna y profundamente a ellos. De ellos aprendí sobre el amor, y ese amor dejaron que yo lo deposite en la ciencia. Gracias a mis viejos, una y mil veces por haberme cocido con amor unas alitas, darme el empujoncito y dejarme volar. Gracias por esperarme con el nido calentito siempre que quiera volver. Por la confianza, el amor, el orgullo y los valores. Gracias a mis hermanos por el amor más lindo, sincero y puro que tuve la posibilidad de vivir en la vida. A Oscar por ser mi ídolo, mi ejemplo, el gran amor de mi vida. A Mari porque nada de lo que hoy soy sería posible sin ella, desde enseñarme lo que es la genética, hasta lo que es la perseverancia y el amor real. A Fran por ser mi razón de ser, por hacerme querer ser siempre mejor, por los enojos, las peleas, los feliz día y la complicidad. A Mechi, gracias, mil millones de gracias mi chiquita. Las letras de esta tesis son en gran parte tuyas. El tramo final y la escritura fueron especiales porque los caminaste muy al lado mío. Gracias por soportarme día a día. Por procurar que no me faltara comida o cerveza cuando escribir era lo único que me importaba en la vida. Gracias por convertirte en la mejor compañera de día a día. A Nati, gracias por esa alegría tan sincera con cada logro y por esa fuerza cuando las cosas parecían rumbear mal. A Patri y Mati el gracias más profundo, porque casi sin saberlo son el empujón más grande, lo que más quiero, mi orgullo, mi alegría y mi aliento. Gracias por todo el amor sin medidas que me dan.

A Matías.

*Por los barquitos de papel, las vueltas en calesita, los paseos
por el parque, las manchas, veo-veo y noches contando
satélites que esta tesis nos robó.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1. DROSOPHILA COMO MODELO DE ESTUDIO

1.1 La ventana abierta de la “habitación de las moscas”2

1.2 Características generales.....2

2. CORAZÓN DE MOSCA

2.1 Desarrollo y funcionamiento del tubo cardíaco de *Drosophila melanogaster*.....3

2.2 El corazón adulto de *Drosophila melanogaster*.....5

3. TOR, ENVEJECIMIENTO, CORAZÓN

3.1 Vía de señalización TOR.....7

3.2 TOR en la regulación de la síntesis proteica.....8

3.3 eIF4E-4E-BP.....10

3.4 TOR y envejecimiento.....11

4. FUNCIONAMIENTO CARDÍACO

4.1 La importancia del calcio intracelular en el funcionamiento cardíaco.....11

4.2 El calcio intracelular y el desarrollo de arritmias cardíacas.....13

5. ANTECEDENTES

5.1. *Drosophila melanogaster* como modelo cardíaco.....14

5.2 Envejecimiento cardíaco en *Drosophila melanogaster*.....15

5.3 Efectores de la vía TOR involucrados en el envejecimiento cardíaco.....17

HIPÓTESIS.....18

OBJETIVOS GENERALES.....18

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de stocks y cruces genéticos.....20

Obtención del preparado semi intacto.....22

Obtención de la señal fluorescente.....23

Intervenciones farmacológicas.....25

Análisis estadístico.....25

Ensayos de traducción.....	25
Ensayo de doble híbrido	26
Mutagénesis sitio dirigida.....	32
Transformación de levaduras con las construcciones mutantes.....	34
RT-PCR de corazón.....	34
Western blot.....	35
Espectrometría de masas.....	35

RESULTADOS

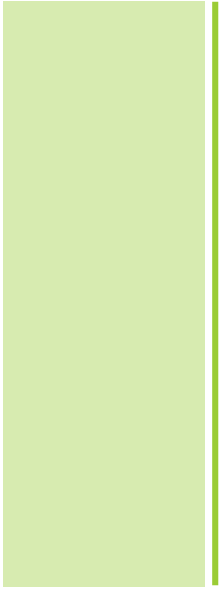
1. Modulación génica de 4E-BP	
1.1 Rol de 4E-BP en el ciclado del calcio intracelular.....	38
1.2 Relación entre envejecimiento cardíaco y acción de 4E-BP sobre el ciclado del calcio intracelular.....	42
2. Modulación génica de eIF4E	
2.1 Rol de eIF4E en el ciclado del calcio intracelular.....	45
2.2 Relación entre envejecimiento cardíaco y acción de eIF4E sobre el ciclado del calcio intracelular.....	49
3. Inactivación de TOR por inanición	
3.1 Impacto de la inactivación de TOR en el ciclado de calcio intracelular.....	53
4. Arritmogénesis	
4.1 Influencia de eIF4E en la generación de arritmias cardíacas.....	57
5. Traducción de proteínas.....	59
6. Interacción entre proteínas.....	61
7. Expresión de eIF4E-4 y SERCA.....	64
8. Expresión de eIF4E-4.....	65
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIÓN GRÁFICA.....	74
REFERENCIAS.....	75

ABREVIATURAS

3AT: 3-Amino-1,2,4-Triazol
4E-BP: proteína de unión a 4E
AD: dominio activador
AEC: acoplamiento éxcito-contráctil
BD: dominio de unión
CaMKII: calcio calmodulina kinasa 2
Cav1.2: canales de Ca(2+) tipo L voltaje operados
CCAP: péptido cardioactivo de crustáceo
CCTL: canal de calcio tipo L
CPVT: taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica
DAD: despolarización retrasad
DEPTOR: proteína DEP con dominio de interacción con mTOR
EAD: despolarización temprana
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
eIF4A: factor eucariótico de inicio de la traducción 4A
eIF4E: factor eucariótico de inicio de la traducción 4E
eIF4F: factor eucariótico de inicio de la traducción 4F
eIF4G: factor eucariótico de inicio de la traducción 4G
FA: fibrilación auricular
FV: fibrilación ventricular
IC: insuficiencia cardíaca
InR: receptor de insulina
K2P: canal de potasio
LB: Luria-Bertani
Mef-2: factor potenciador de miocitos 2
Mhc: cadena pesada de la miosina
mLST8: proteína 8 letal de mamífero con sec-13
Mnk1: proteína quinasa interactuante con proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK)
1
Mnk2: proteína quinasa interactuante con proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK)
2
mSin1: proteína activada por estrés en mamíferos que interactúa con map quinasas 1
Protor1/2: proteína observada con rictor 1 y 2
Nav1.5: canal de sodio voltaje operado
NCX: intercambiador sodio/calcio
OCT: tomografía de coherencia óptica
OPP: O-propargil-puromicina
PABP: proteína de unión a poli A
PBS: buffer fosfato salino
PFA: paraformaldehído
PI3K: fosfoinositol 3 kinasa
PKA: proteína kinasa A
PP1: fosfatasa tipo 1

PP2A: fosfatasa tipo 2A
PRAS40: sustrato de 40 kDa de Akt rico en prolina
PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
Raptor: proteína regulatoria asociada a mTORn
Rictor: compañero insensible a la rapamicina de mTOR
ROS: radicales libres del oxígeno
RS: retículo sarcoplasmático
RyR2: receptor de rianodina tipo 2
S6K: kinasa S6
SERCA: bomba Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplasmático
SOD2: superóxido dismutasa mitocondrial
SPEG: proteína kinasa expresada preferencialmente en músculo estriado
Tin: tinman
TOR: blanco de rapamicina
TrpC: troponina C
TV: taquicardia ventricular
UAS: secuencia de activación corriente arriba
YPD: extracto de levadura-peptona-dextrosa

INTRODUCCIÓN



1. DROSOPHILA COMO MODELO DE ESTUDIO

1.1 La ventana abierta de la “habitación de las moscas”

“The fly room” supo llamarse a la habitación en la que el biólogo y premio Nobel, Thomas Morgan (1866-1945), llevó a cabo los experimentos que le permitieron demostrar las leyes de la herencia antes postuladas por Gregor Mendel utilizando a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio (1). Pero la ventana de aquella habitación se encontraba abierta y los experimentos realizados por Morgan solo fueron el inicio en el campo de la investigación en *Drosophila*.

En la actualidad, la mosca de la fruta es conocida como el modelo genético por excelencia, siendo utilizada en todo tipo de investigaciones biológicas. Dentro de sus ventajas se pueden destacar: mantenimiento económico, ciclo corto de vida, descendencia con gran número de individuos, genoma completamente secuenciado, capacidad para portar mutaciones múltiples, la existencia de bancos repositivos de líneas transgénicas y el fácil acceso a éstas, características que la convierten en un excelente modelo de estudio (2-4). Si bien el genoma de *Drosophila* es más pequeño que los de mamíferos, se ha encontrado que de los genes vinculados a patologías identificados en humanos aproximadamente el 80% posee homólogos en *Drosophila*, lo que permite introducirla como modelo genético de enfermedades humanas (5-7).

Desde hace ya varios años, se emplea a *Drosophila* como modelo de estudio de distintas enfermedades como diabetes (8), patologías oftalmológicas (9), cáncer (10) y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (11-13), entre otras (14). Las patologías cardíacas no han sido la excepción, por lo que hace varias décadas se viene utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo de enfermedades cardiovasculares humanas (15-17).

1.2 Características generales de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo (con metamorfosis completa pasando por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto), perteneciente al orden Díptera y a la familia Drosophilidae. De hábitat cosmopolita, consume alimentos con alto contenido de ácido acético, como frutas en descomposición. Su desarrollo es relativamente corto (alrededor de 10 días a 25°C y 60 % humedad) e incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. La duración del ciclo varía de manera inversamente proporcional con la temperatura ambiente. Las hembras adultas pueden poner huevos durante toda su vida. El desarrollo embrionario se produce dentro del huevo y dura aproximadamente 1 día a 25°C. La larva es blanca, segmentada y vermiforme. La región bucal comprende ganchos mandibulares de coloración negra que permiten introducir la región cefálica estrecha en el alimento, el cual es ingerido vorazmente. No tiene ojos ni apéndices, respira por tráqueas y posee un par de espiráculos visibles (poros aéreos) en los extremos anteriores y posteriores del cuerpo. Esta fase de desarrollo dura entre 3 y 5 días a 25°C y se subdivide en tres estadios. El primero y segundo de ellos terminan en mudas. Cada muda implica la eliminación completa de la piel y partes orales y es el mecanismo por medio del cual la larva crece. Inmediatamente antes de la pupación la larva deja de comer, se arrastra hacia una superficie relativamente seca y sus espiráculos anteriores revierten. Durante la fase de pupa que dura alrededor de 4 a 5 días a 25°C, la mayoría de las estructuras larvarias son destruidas. El insecto empupa dentro de la última piel larvaria, que gradualmente se endurece y adquiere un color más oscuro. La mosca adulta emerge o eclosiona del pupario forzando su salida por el extremo anterior. En un

principio las alas están plegadas y los individuos son de color grisáceo. Se puede observar el meconio (restos de la última ingesta larval) en la región abdominal. Luego las alas se despliegan y el cuerpo se oscurece. Los adultos de *Drosophila melanogaster* pueden aparearse a partir de las 8 horas de emergidos. El promedio de supervivencia de una mosca adulta es de 70-80 días a 25°C. Un ciclo de vida de tales características es particularmente ventajoso a la hora de trabajar con organismos vivos. La figura 1 muestra el ciclo de vida y su modo de mantenimiento en el laboratorio. (18)

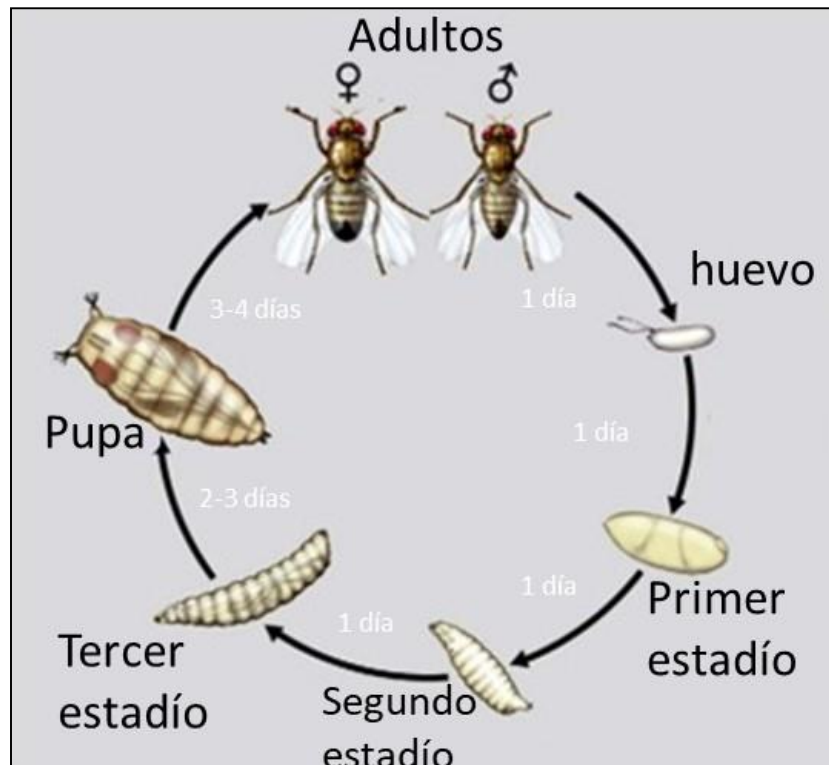


Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

2. EL CORAZÓN DE LA MOSCA

2.1 Desarrollo y funcionamiento del tubo cardíaco de *Drosophila melanogaster*

El sistema circulatorio de *D melanogaster* comprende un tubo muscular, llamado corazón, dispuesto de manera longitudinal en el plano dorso-medio del abdomen y la aorta que se extiende desde la parte más anterior del corazón hacia el cerebro (19). El corazón y la aorta están separados entre sí por un par de células cardíacas que forman la válvula cardíaca. La hemolinfa ingresa al tubo cardíaco a través de las ostias (células musculares que actúan como válvulas) y la circulación es abierta (20,21).

La naturaleza del corazón es mesodérmica. Las células cardíacas que se generan en estadios embrionarios migran luego a la zona media del individuo donde convergen dando lugar al tubo cardíaco. Durante esta migración se activan distintas vías de señalización dando como resultado dos filas de células cardíacas contráctiles que compondrán el corazón, rodeadas por una capa externa de células pericárdicas no contráctiles (22). El corazón está compuesto por cuatro cámaras, cada una de las cuales posee seis pares de células que expresan el factor de transcripción Mef2 (21). Cuatro de estos pares son células cardíacas contráctiles que expresan el factor de transcripción *tinman* (*tin*) (21, 23, 24). Los otros dos expresan el gen *seven-up* (*svp*) y darán lugar a las llamadas ostias (21, 25).

A pesar de las mencionadas diferencias anatómicas entre el corazón de *Drosophila melanogaster* y el corazón de vertebrados, en cuanto a su naturaleza embriológica y molecular presentan muchas similitudes, lo que permite considerar a *Drosophila* como un excelente modelo de cardiogénesis. Por ejemplo, en ambos sistemas el corazón se forma luego de la migración hacia el eje medio de progenitores mesodérmicos laterales a través de procesos moleculares conservados. Una vez en la zona media, en los vertebrados el tubo cardíaco se dobla dando lugar al corazón compuesto por las cuatro cámaras dispuestas de a dos mientras que en los invertebrados el corazón se mantiene longitudinal con las cuatro cámaras dispuestas en serie (26, 27).

La formación del corazón en *Drosophila* requiere de la expresión temprana en células mesodérmicas del factor de transcripción *tin* (23, 24). En ausencia de este factor, los mutantes *tinman* carecen de corazón y otros derivados mesodérmicos (28). A diferencia de mamíferos, los embriones de *Drosophila melanogaster* no requieren de un corazón funcional y es posible realizar este tipo de análisis de fenotipos mutantes embrionarios. Al demostrarse la importancia de este factor *tin* en el desarrollo cardíaco, se pudieron identificar sus homólogos en mamíferos. La familia de genes *Nkx* en mamíferos está compuesta por genes relacionados a *tinman*. Si bien no se observó una completa ausencia del corazón como en *Drosophila*, ratones mutantes para los genes *Nkx2-5* presentaban corazones que fallaron al momento de la invaginación y presentaron defectos en la expresión de factores cruciales para el correcto funcionamiento del corazón (29). Cuando los genes de vertebrados *Nkx* fueron expresados en moscas mutantes de *tinman* se pudo observar una recuperación parcial en el desarrollo del corazón de *Drosophila* indicando una redundancia funcional entre los genes mencionados (30).

Así como *tin* y *Nkx*, muchos de los genes involucrados en el desarrollo cardíaco se encuentran conservados entre *Drosophila* y vertebrados. La figura 2 muestra el desarrollo embrionario del corazón en *Drosophila melanogaster* y en vertebrados. En ella se puede observar la naturaleza mesodérmica compartida de las células precursoras cardíacas y sus posteriores transformaciones hasta dar lugar al

corazón adulto en mamíferos y al corazón embrionario que sufrirá ciertas modificaciones durante la metamorfosis en *Drosophila*.

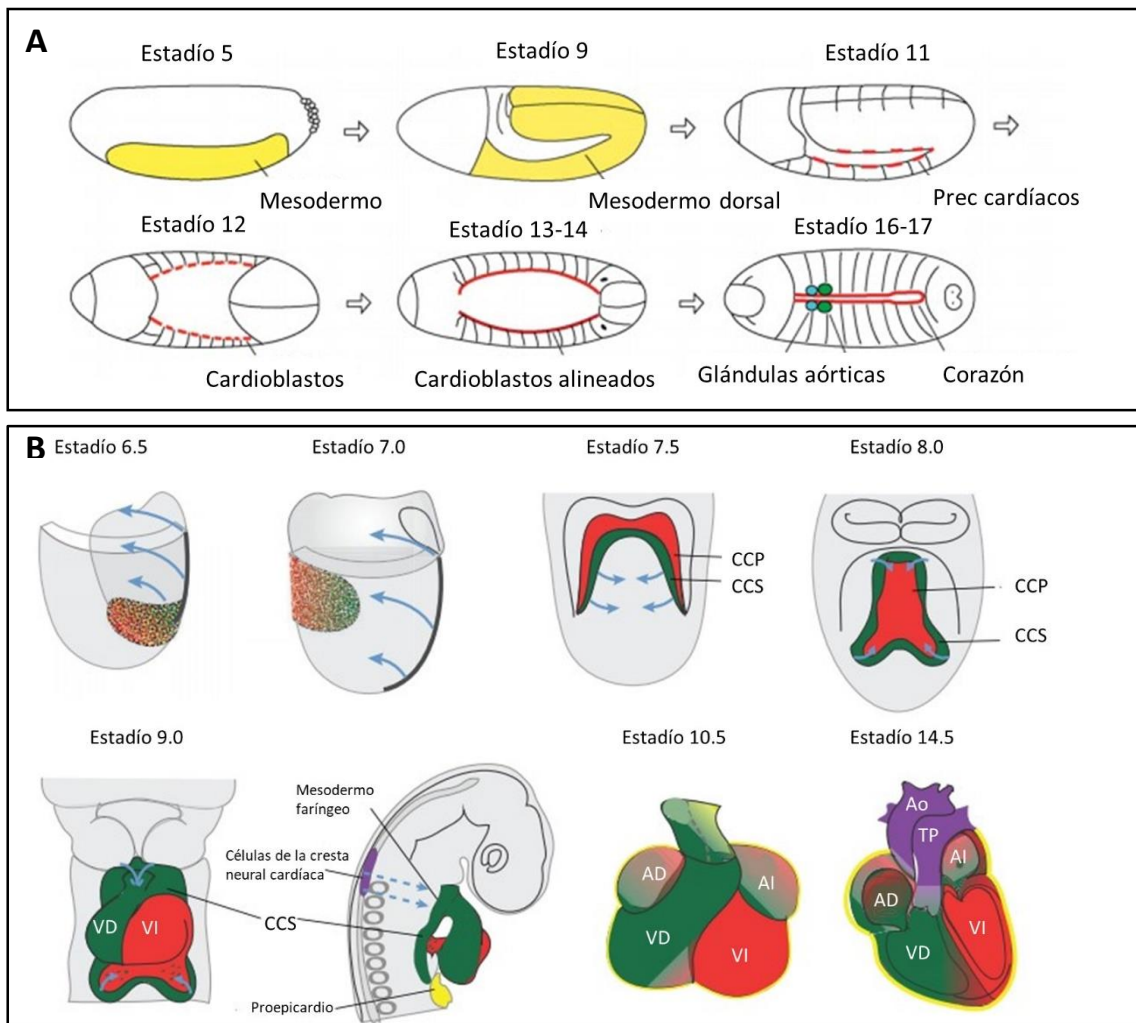


Figura 2: Desarrollo embrionario de A corazón de *Drosophila melanogaster* y B mamíferos. CCP: campo cardiogénico primario; CCS: campo cardiogénico secundario; VD: ventrículo derecho VI: ventrículo izquierdo, AD: aurícula derecha; AI: aurícula izquierda; TP: tronco pulmonar; Ao: aorta. Modificado de 26 y 27.

2.2 El corazón adulto de *Drosophila melanogaster*

Luego de su desarrollo embrionario, el corazón de *Drosophila* pasa por una pequeña serie de modificaciones durante la metamorfosis para dar lugar al corazón adulto (Figura 3). Se forma la cámara cónica entre el tórax y el primer segmento abdominal, donde se acumula la hemolinfa para ser bombeada (32). En esta primera cámara y en la cuarta cámara se encuentran los centros marcapasos. Una de las particularidades del tubo cardíaco de la mosca es que la presencia de dos centros marcapasos, uno en cada extremo del corazón, permite el desarrollo de dos sentidos de circulación de la hemolinfa, uno en sentido anteroposterior: anterógrado y uno con sentido postero-anterior: retrógrado (33, 34). Además, una capa adicional de músculo con estriaciones longitudinales se desarrolla en la zona ventral del corazón sobre la capa con estriaciones circulares y una cuarta ostia aparece en el corazón adulto en comparación con las tres existentes en el corazón de la larva (32).

Uno de los cambios más importantes que se da durante la metamorfosis es la inervación del tejido cardíaco, dando como resultado un corazón con un nivel de complejidad mayor en cuanto a la regulación de la frecuencia cardíaca y ritmicidad comparado con el de la larva. El corazón adulto se encuentra inervado a nivel de la cámara cónica por un par de nervios transversales que se unen bilateralmente dando lugar al puente transversal y por las terminales nerviosas del nervio medio procedente de la zona anterior, longitudinal a la aorta. En el caso de la última cámara, ésta se encuentra particularmente inervada por una serie de neuronas periféricas secretoras del péptido cardioactivo de crustáceo (CCAP). El resto de las cámaras solo se encuentran inervadas bilateralmente por el nervio transverso. Los patrones distintivos de inervación de la primera y última cámara se deben a que éstas conforman los centros marcapasos del corazón adulto de *Drosophila melanogaster* (34).

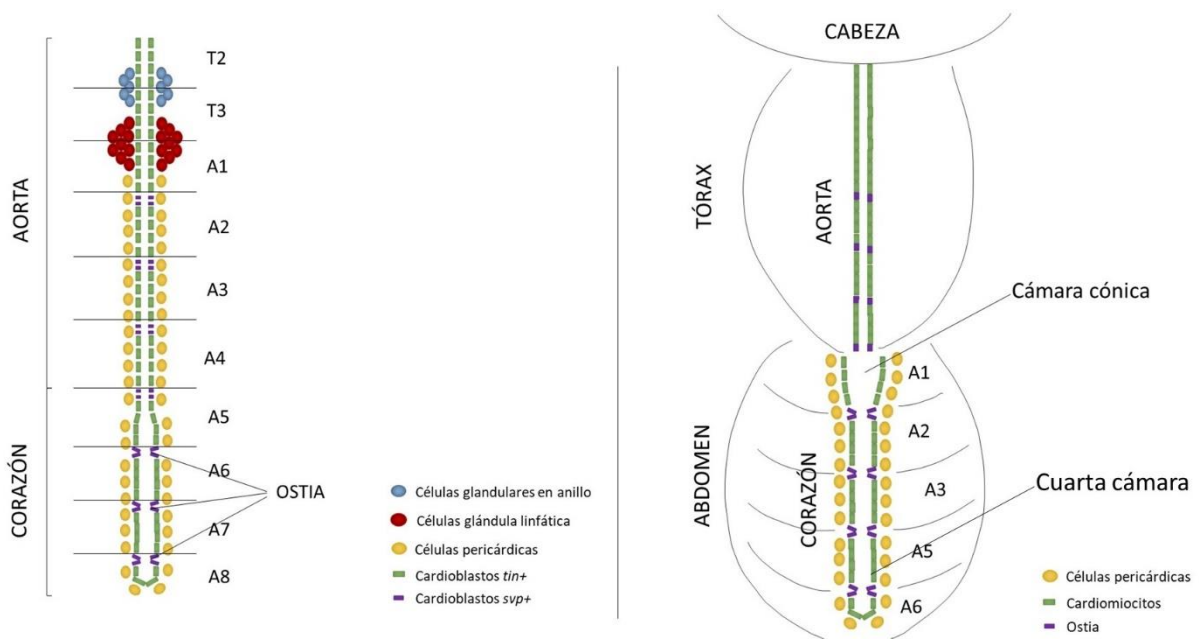


Figura 3. Izquierda: corazón y aorta embrionarios de *Drosophila melanogaster* ubicado en la zona media de la larva. Las células cardíacas contráctiles que expresan *tin* se encuentran en verde y las que componen la ostia y expresan *svp* en violeta. Las células pericárdicas se muestran en amarillo y las células de las glándulas acompañantes en rojo y azul. Derecha: corazón y aorta adultos. El corazón se extiende entre el primer y sexto segmento abdominal y la aorta por el tórax hacia la cabeza. Aparece la cámara cónica entre el segmento torácico y el primer segmento abdominal. Además se genera un nuevo par de ostias.

3. TOR, ENVEJECIMIENTO, CORAZÓN

3.1 Vía de señalización TOR

La vía de señalización TOR (*target of rapamycin*) integra señales internas y externas para regular el metabolismo, crecimiento y supervivencia celular. La principal proteína efectora de esta vía es la quinasa TOR, una quinasa serina/treonina atípica perteneciente a la familia de PI3K (*phosphoinositol 3 kinases*) quinasas. Dependiendo de las proteínas con las que interactúe TOR puede formar 2 complejos activos: TORC1 y TORC2. El complejo TORC1 está compuesto por la quinasa TOR, mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*), DEPTOR (*DEP domain containing mTOR-interaction Protein*), Tti1/Tel2, raptor (*regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*) y PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40 kDa*), mientras que el complejo TORC2 comparte las primeras cuatro proteínas mencionadas con el complejo TORC1 y a su vez lo integran las proteínas rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSin1 (*mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*) y protor1/2 (*protein observed with rictor 1 and 2*) (35).

TORC1 ha sido ampliamente estudiado y se conocen muy bien los procesos en los que interviene. La activación de TORC1 puede darse como respuesta a factores de crecimiento, estrés, estado energético, oxígeno o aminoácidos, provocando en la célula respuestas a los requerimientos metabólicos y energéticos. Estos efectos se deben a que TORC1 principalmente regula la síntesis proteica y lipídica. La vía de PI3K/AKT es la principal vía de activación de TOR en respuesta a cambios nutricionales, por ejemplo, por unión de insulina al receptor de insulina IR. Los aminoácidos leucina y arginina también activan a TORC1 y los mecanismos por los cuales lo hacen aún están siendo dilucidados (35).

TORC1 regula la síntesis proteica al interactuar con dos proteínas involucradas en el inicio de la traducción, la proteína de unión al factor eucariota de inicio de la traducción eIF4E, llamada 4E-BP (del inglés *4E binding protein*) y la quinasa de la proteína ribosomal S6, denominada S6K. TORC1 fosforila a 4E-BP y de esta manera imposibilita su interacción con el factor eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*). De igual manera, cuando TORC1 fosforila a S6K, promueve su actividad, activando la biogénesis de ARN mensajeros y el ensamblado de la subunidad ribosomal 40S en el ARN mensajero a traducirse (36).

Respecto a la actividad de TORC2 se sabe mucho menos que de la actividad de TORC1. TORC2, a diferencia de TORC1, es insensible a la rapamicina, aunque si se expone a las células por un tiempo prolongado a ésta, se observa una disminución en la actividad de TORC2. TORC2 es también insensible a los nutrientes, pero sí responde a factores de crecimiento como la insulina, en vías mediadas por PI3K que requieren la biosíntesis de ribosomas. Este complejo ha sido principalmente asociado a la regulación del tamaño y forma celular en determinados tipos celulares debido a que participa en la organización del citoesqueleto (35, 37).

Dado su complejo accionar, involucrado en procesos claves para la célula, se ha encontrado vinculación a TOR en distintos procesos fisiopatológicos, entre ellos: envejecimiento, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y enfermedades metabólicas (35).

Por su función en los procesos celulares vinculados a la síntesis proteica mediante la fosforilación de 4E-BP, en la figura 4 resumimos las vías que activan o inhiben al complejo TORC1, pertinente en este trabajo, y cómo éste regula diferentes respuestas celulares.

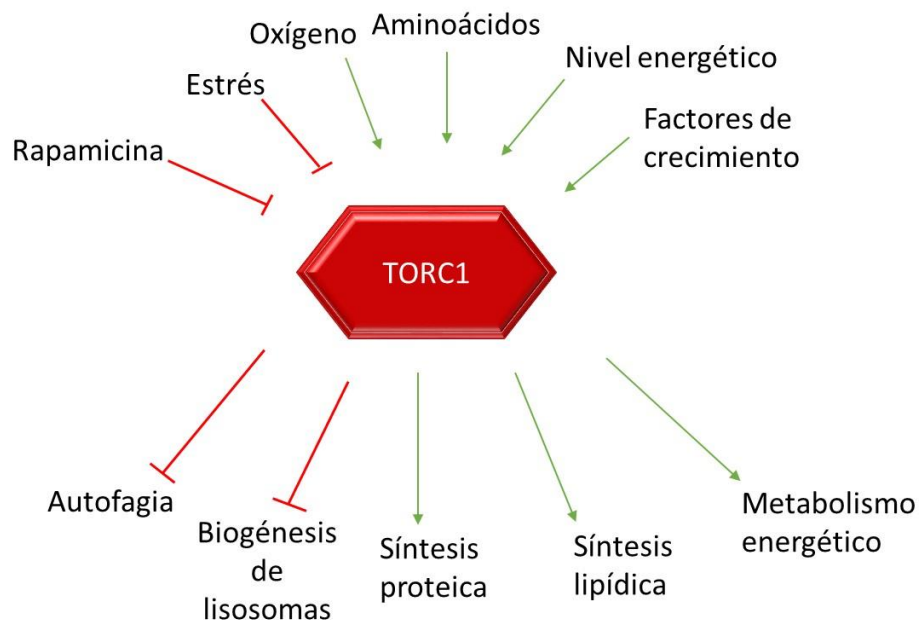


Figura 4. La Rapamicina y el estrés inhiben al complejo TORC1 mientras que las señales de oxígeno, aminoácidos, alto nivel energético y factores de crecimiento lo activan. Una vez activado este complejo se inhibe la autofagia y la síntesis de lisosomas, mientras que se activa la síntesis proteica, lipídica y el metabolismo energético celular.

3.2 TOR en la regulación de la síntesis proteica

Los niveles de proteínas de una célula o tejido deben ser regulados minuciosamente para mantener las condiciones vitales. El principal punto de regulación en la génesis proteica es el inicio de la traducción. Dado que este paso es crucial en el metabolismo proteico, posee varios puntos de control. Los ARN mensajeros eucariotas presentan en su extremo 5' un residuo de 7metil guanosina (38) y en su extremo 3' una cola de poliadenina, cuyo número oscila entre 50 en levaduras hasta más de 200 en eucariotas superiores (poli A). Ambas modificaciones le confieren a los ARN mensajeros mayor estabilidad, permiten su transporte desde el núcleo al citosol y participan en la regulación de la traducción (39). Una vez en el citosol, el ARN mensajero a ser traducido debe ser reconocido por la maquinaria de traducción. Una de las proteínas involucradas en su reconocimiento es el factor eucariota de inicio de la traducción 4E (eIF4E: del inglés *eukaryotic translation initiation factor 4E*). Este factor reconoce el residuo 7metil guanosina (cap) del mensajero y en conjunto con otros dos factores con los que interacciona (eIF4G y eIF4A) conforman el complejo de inicio de la traducción eIF4F. Una vez reconocido el cap, eIF4F a través de su interacción con el factor eIF3 recluta al complejo ribosomal pre ensamblado compuesto por la subunidad ribosomal 40S, el factor eIF3 unido a GTP y el aminoacil tRNA metionina (complejo 43S). Por otro lado, la proteína de unión a poli A (PABP) se une a la cola rica en adeninas del mensajero. Al interactuar con eIF4G, PABP permite la circularización del ARN mensajero, promoviendo su traducción y reciclado ribosomal. Cuando el ribosoma es ensamblado en el ARN mensajero (unión de la subunidad ribosomal 60S al complejo ribosomal pre ensamblado)

comienza la movilización (escaneo) de éste por la secuencia nucleotídica del ARN mensajero. Una vez hallado el primer codón AUG codificante para el aminoácido metionina en el contexto adecuado (generalmente secuencia Kozak) comienza la síntesis proteica por el ribosoma (40).

Como este mecanismo de inicio de la traducción comprende varios pasos y un gran gasto energético, es de esperarse que se encuentre ampliamente regulado. Uno de sus puntos de regulación es a través de la inhibición de la interacción entre el factor eIF4E y eIF4G para formar el complejo eIF4F. La unión de eIF4E a eIF4G está regulada de manera negativa por la proteína de unión a 4E, 4E-BP. 4E-BP compete por el sitio de unión a eIF4E con eIF4G. Ambas proteínas poseen en su secuencia aminoacídica el péptido consenso YXXXXLϕ (donde Y es tirosina, L es leucina, ϕ suele ser una leucina, pero puede ser una metionina o fenilalanina y X indica cualquier aminoácido) que permite la interacción con eIF4E. Cuando 4E-BP se encuentra unido a eIF4E este último no puede interaccionar con eIF4G y de este modo el complejo de inicio de la traducción eIF4F no puede formarse, bloqueando así la síntesis proteica. La unión de 4E-BP a eIF4E depende de su estado de fosforilación. Cuando 4E-BP se encuentra hipo fosforilada es capaz de unirse a eIF4E y de este modo inhibir su acción mientras que cuando 4E-BP se encuentra hiper fosforilada es incapaz de unirse a eIF4E posibilitando así que ocurra la síntesis proteica. La quinasa encargada de fosforilar a 4E-BP es TOR. El complejo TORC1 activo responde a las necesidades de la célula fosforilando a 4E-BP y de este modo inhibiendo su acción bloqueante de la traducción (Figura 5) (36, 40-42).

Por otro lado, TORC1 regula la síntesis proteica por fosforilar a la quinasa S6 quien promueve la biogénesis de ARN mensajeros y el ensamblaje de la maquinaria traduccional sobre el mensajero (36).



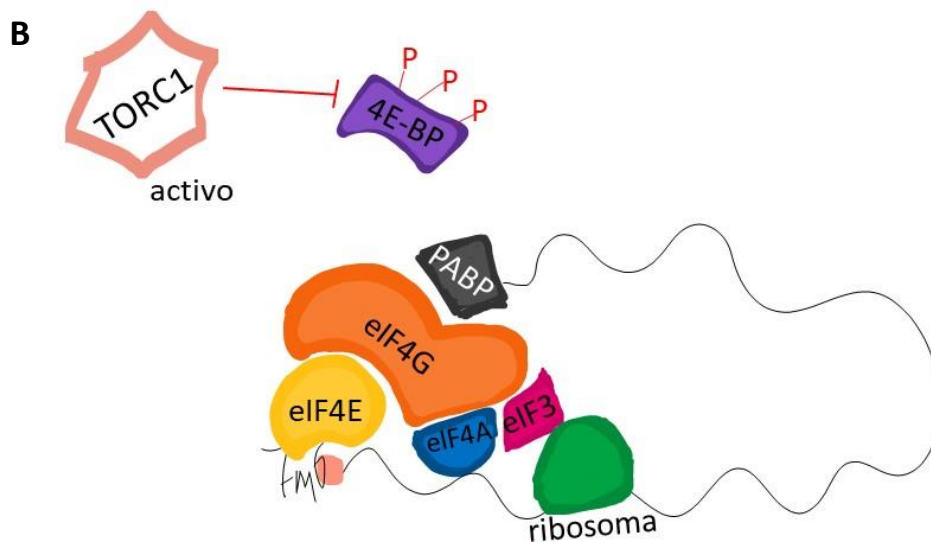


Figura 5. A. 4E-BP se encuentra hipo fosforilada por lo que es capaz de unirse a eIF4E bloqueando su interacción con eIF4G y por lo tanto el ensamblado del complejo eIF4F y de la maquinaria de traducción al ARN mensajero.

B. Cuando TORC1 se encuentra activo fosforila a 4E-BP. La forma hiperfosforilada de 4E-BP no puede unirse a eIF4E dejando libre su sitio de unión a eIF4G. La formación del complejo eIF4F constituido por eIF4E, eIF4G y eIF4A permite la circularización del ARNm a partir de la interacción entre eIF4G y la proteína de unión a la cola de poli A (PABP) y la interacción de eIF4F con eIF3 recluta la subunidad 40 S del ribosoma. Posteriormente se une la subunidad mayor dando lugar al complejo activo de traducción.

3.3 eIF4E-4E-BP

La proteína eIF4E se encuentra conservada en todos los eucariotas, consiste en ocho cadenas de hojas beta antiparalelas soportadas por tres hélices alfa que forman la palma y el dorso de una mano "en forma de copa" (43-45). En el humano se conocen tres isoformas de eIF4E (46). La mejor descrita es eIF4E- 1, que interviene en el inicio de la síntesis proteica. Presenta tres aminoácidos importantes para su función: dos sitios triptófano 56 y 102 (Trp56 y Trp102) se unen al residuo 7-metil guanosina (cap) del extremo 5' del ARN mensajero (47). Un tercer residuo triptófano (Trp73) reconoce y se une a diversas proteínas como eIF4G, con quien interactúa para la formación del complejo de inicio de la traducción eIF4F y alternativamente con eIF4E-BP, quien inhibe su actividad.

En *Drosophila melanogaster* existen 7 isoformas de eIF4E (48). Para la isoforma eIF4E- 1 los residuos encargados de la unión a cap son Trp100 y Trp146 mientras que el Trp117 media interacciones con las proteínas 4E-BP y eIF4G. El núcleo de eIF4E representado por aproximadamente 170 aminoácidos se conserva en todos los eucariotas y es suficiente para el reconocimiento del cap y la unión a eIF4G y 4E-BPs (49). Los dominios amino y carboxilo terminales son considerablemente variables. Es posible que los dominios amino y carboxilo terminales puedan estar involucrados en la regulación de la actividad de eIF4E o podrían afectar la estabilidad de la proteína (50, 51). La fosforilación en la serina 209 (Ser209) en mamíferos y en la serina 251 (Ser251) en *Drosophila melanogaster* es importante para su actividad (52-54). Mnk1 y Mnk2 se identificaron como las quinasas encargadas de dicha fosforilación (46, 53, 55, 56). Como lo mencionamos anteriormente, su rol conocido es la acción como factor de inicio de la traducción del ARN mensajero eucariótico. Más recientemente, se ha demostrado que eIF4E está relacionado a funciones no asociadas con la síntesis proteica como su participación en los cuerpos de procesamiento (*p-bodies*) (57, 58).

3.4 TOR y envejecimiento

Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización TOR juega un papel importante en la regulación del desarrollo y mantenimiento del metabolismo celular, sosteniendo principalmente la homeostasis proteica y la inhibición de la autofagia. Estos mecanismos se han visto afectados durante el envejecimiento, por lo que el estudio de la participación de esta vía en este proceso ha sido de amplio interés. En mamíferos, la extensión de la expectativa de vida ha llevado al desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento celular como trastornos neurodegenerativos, diabetes y sobre todo enfermedades cardiovasculares, principalmente insuficiencia cardíaca.

Se ha observado que la inhibición de esta vía por administración de Rapamicina o modificaciones genéticas, ha producido un aumento en la expectativa de vida tanto en mamíferos (59-61) como en invertebrados, especialmente en *Drosophila melanogaster* (62-64). La inhibición de la vía TOR por restricción calórica también ha conducido a un aumento en la expectativa de vida y ha mostrado efectos beneficiosos en patologías asociadas al envejecimiento como el Alzheimer (65, 66), enfermedades cardiovasculares y diabetes (67). Todos estos resultados indican la importancia de la vía no sólo durante edades tempranas en el desarrollo de los organismos sino a lo largo de todo el ciclo de vida, incluido el envejecimiento. El conocimiento sobre la regulación de esta vía puede contribuir a comprender los mecanismos del envejecimiento y de las patologías asociadas a éste.

4. FUNCIONAMIENTO CARDÍACO

4.1 La importancia del calcio intracelular en el funcionamiento cardíaco

En mamíferos, el desarrollo de cada latido cardíaco es el resultado de la respuesta del cardiomiocito a los cambios en el potencial de membrana y de las concentraciones de calcio intracelular (Ca^{+2}_i). El mecanismo de conversión del impulso eléctrico (potencial de acción) a fuerza mecánica (contracción del músculo) es llamado acoplamiento eléctrico-contráctil (AEC) (68). De este modo, el cambio en el potencial de membrana provocado por el ingreso del ion sodio (Na^+) a través de los canales de sodio operados por voltaje (Nav1.5) despolariza la membrana del cardiomiocito promoviendo el ingreso del Ca^{+2} al citosol por los canales tipo L activados por voltaje (CCTL, Cav1.2) (69). Una vez en el citosol el Ca^{+2} se une a los receptores de rianodina tipo 2 (RyR2) presentes en la membrana del retículo sarcoplasmático (RS) adyacentes a los CCTL. La unión del Ca^{+2} promueve la apertura del RyR2 y por lo tanto la liberación de iones Ca^{+2} del RS hacia el citosol aumentando aún más su concentración. El Ca^{+2} citosólico se une a la maquinaria contráctil del miocito a través de la proteína troponina C (TrpC) induciendo cambios conformacionales que conducen al denominado estado activado de la TrpC que deja expuestos en la actina, los sitios de unión a la miosina. La formación de puentes cruzados entre la actina y la miosina produce el deslizamiento de los miofilamentos uno sobre el otro, acorta los sarcómeros provocando la contracción del músculo y por lo tanto, el latido cardíaco (70-74).

Luego de la contracción muscular, durante la diástole, se produce la relajación en la cual parte del Ca^{+2}_i es extruido hacia el espacio extracelular a través del intercambiador sodio/calcio (NCX) de la membrana plasmática y la mayor parte es recapturado al RS a través de la bomba Ca^{+2} -ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA). A este aumento y posterior disminución de calcio intracelular se lo llama *transitorio de calcio* (75).

La actividad de las bombas y canales involucrados en el AEC responden a las demandas cardíacas a través de su regulación por varias vías de señalización. Las modificaciones post traduccionales en los canales llevan a variaciones en sus estados de actividad. Principalmente, el estado de fosforilación de muchos de estos o de sus reguladores influyen en su accionar durante el AEC. Dentro de los más estudiados se encuentran el RyR2, cuyo estado de fosforilación es regulado por las quinasas PKA (*protein kinase A*), CaMKII (*Ca²⁺ calmodulin kinase II*), la recientemente descrita, SPEG (*striated preferentially expressed protein kinase*) y las fosfatasa tipo 1 y 2A (PP1 y PP2A) (76-79). Al igual que RyR2, el LTCC está regulado por proteínas quinasas como CaMKII y PKA, así como la proteína fosfatasa tipo 1, la fosfatasa tipo 2A, y la calcineurina (también conocida como proteína fosfatasa tipo 2B) (80). La bomba SERCA se encuentra principalmente regulada de modo alostérico por la proteína fosfolamban. Fosfolamban interacciona directamente con SERCA inhibiéndola. Cuando fosfolamban es fosforilada por las quinasas PKA y/o CaMKII disminuye su inhibición aumentando así la recaptación del Ca²⁺ al retículo sarcoplasmático por la bomba SERCA (81, 82).

En *Drosophila melanogaster* las proteínas que participan en el AEC se encuentran conservadas (83) a excepción de fosfolamban. Estudios recientes hallaron péptidos codificados por pequeños marcos de lectura abiertos con homología parcial con fosfolamban y demostraron que uno de ellos, a quien llamaron sarcolamban por su homología parcial con fosfolamban y sarcolipina (proteína similar a fosfolamban que regulada a la bomba SERCA), puede regular la actividad de SERCA. Moscas con delección en la secuencia codificante de sarcolamban presentan un fenotípico arrítmico que es rescatado cuando se expresa dicha región (84). A pesar de su homología parcial, estos péptidos no poseen conservados los sitios de fosforilación por PKA y CaMKII presentes en fosfolamban, por lo que no se puede saber a ciencia cierta si regulan de la misma manera a la SERCA. Los mecanismos de regulación de esta bomba en el tubo cardíaco de *Drosophila* se encuentran aún sin dilucidar.

Más allá de que las proteínas involucradas en el funcionamiento cardíaco se encuentran conservadas entre mamíferos y *Drosophila melanogaster*, poco se sabe sobre su accionar en este modelo a nivel molecular, por lo que es de gran interés enfocar estudios para comprender estos mecanismos.

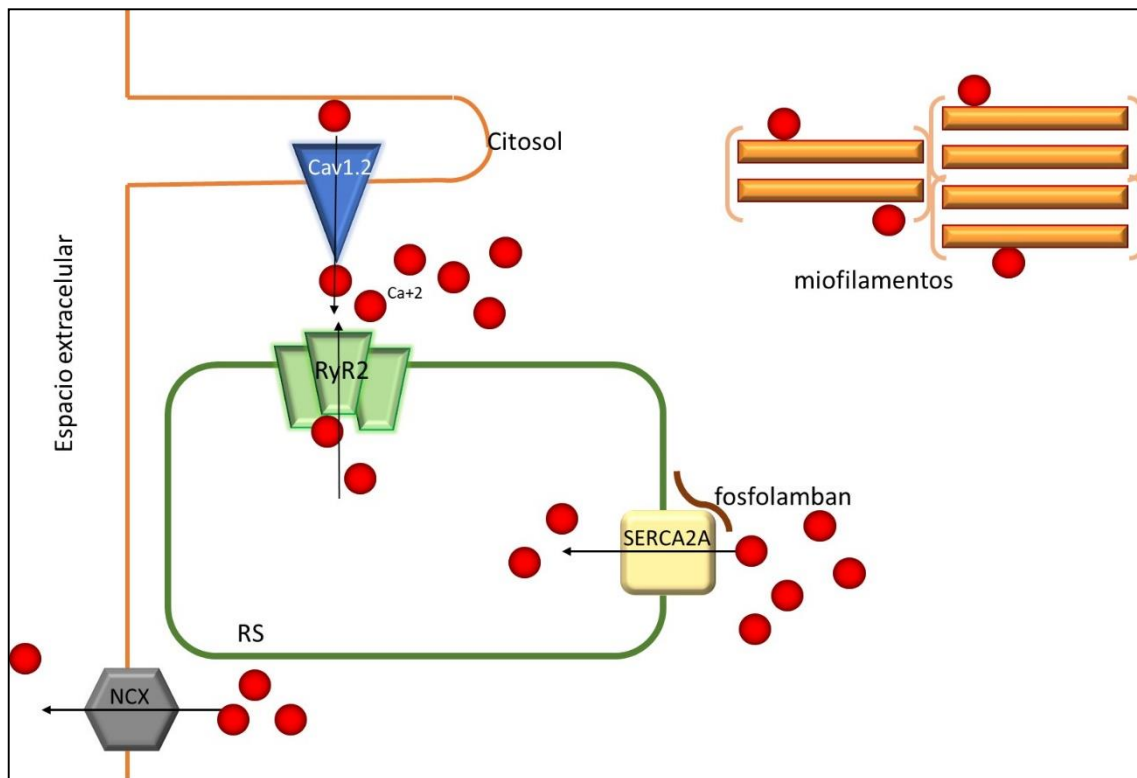


Figura 6. Esquema del acoplamiento excito-contráctil en mamífero. La corriente de Na⁺ estimula la entrada de Ca²⁺ por el canal L (Cav1.2) y la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (RS) mediante apertura de los RyR2. El Ca²⁺ en el citosol se une a los miofilamentos promoviendo su movimiento. Luego de la contracción, el Ca²⁺ se extruye de la célula por el intercambiador NCX funcionando en su modo directo y principalmente, se recaptura hacia el RS por medio de la SERCA. El acoplamiento excito-contráctil en *Drosophila* cuenta con los mismos componentes, excepto fosfolamban, que no se encuentra en el tejido cardíaco de la mosca de la fruta.

4.2 El calcio intracelular y el desarrollo de arritmias cardíacas

Cuando se altera la frecuencia cardíaca, cuando el lugar donde se origina el latido cardíaco no es el marcapaso fisiológico o cuando la secuencia normal en la activación del corazón se altera, se habla de arritmias (85). Los mecanismos responsables de la generación de arritmias cardíacas generalmente suelen dividirse en los mecanismos de generación anormal de impulsos y los mecanismos devenidos de trastornos de la conducción (86, 87). Las causas más comunes de generación de arritmias son las despolarizaciones tempranas (EADs, *early afterdepolarization*) que aparecen antes de la finalización del potencial de acción y las despolarizaciones tardías (DADs, *delayed afterdepolarization*) que ocurren luego de la finalización del potencial de acción (88-91).

Las DADs se producen durante la diástole. Las EADs se producen durante el potencial de acción. Estas despolarizaciones se vinculan a taquicardia ventricular (TV), fibrilación ventricular (FV) y fibrilación auricular (FA) así como taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), e insuficiencia cardíaca (IC) (91).

La generación de arritmias cardíacas ha sido asociada a varias mutaciones en los canales de manejo del Ca²⁺ como RyR2 (92,93), canal tipo L (95), reguladores como fosfolamban (94), entre otros (91), por lo que el correcto funcionamiento de la maquinaria de ciclo del Ca²⁺ cumple un rol importante en la patogénesis arritmogénica.

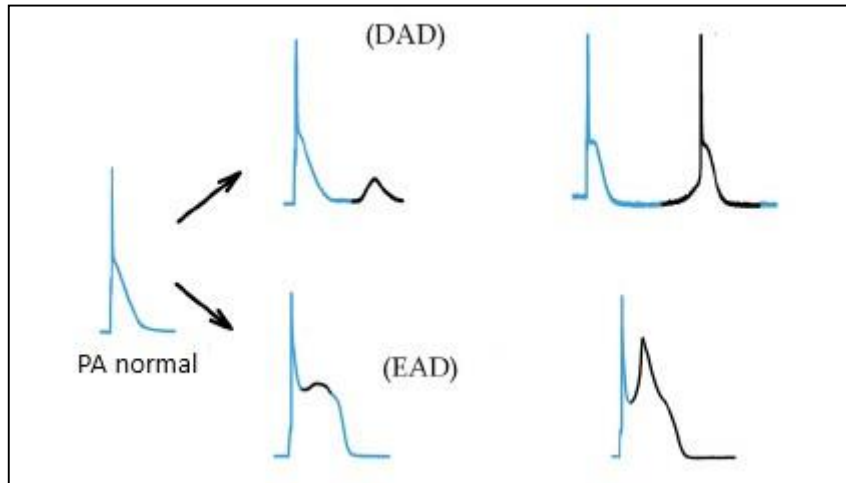


Figura 7. Esquema que representa las DADs y EADs en mamífero. Izquierda potencial de acción normal. Centro potencial de acción posterior a la despolarización temprano (arriba) o tardío (abajo). Derecha potencial de acción que alcanza el umbral generado por DAD o EAD en cada caso. PA: potencial de acción. Modificado de 96

5. ANTECEDENTES

5.1. *Drosophila melanogaster* como modelo cardíaco

Drosophila melanogaster ha emergido como modelo de enfermedades cardiovasculares en las últimas décadas. Debido a que su cardiogénesis es similar a la de mamíferos se han podido desarrollar estudios en esta área y desentrañar varios procesos en el desarrollo cardíaco a partir de los hallazgos producidos en *Drosophila*. El hecho de que el desarrollo embrionario y del adulto durante la metamorfosis no requiera de un corazón funcional, ha permitido dilucidar acontecimientos cardíacos que en mamíferos sería imposible dado que ciertas manipulaciones genéticas serían letales.

Los estudios cardíacos no se remiten sólo a estadios tempranos del ciclo de vida de la mosca sino que se ha profundizado el análisis del funcionamiento del corazón adulto de *Drosophila melanogaster*. Por ejemplo, se ha estudiado el transcriptoma y proteoma del corazón adulto de *Drosophila*. La homología genética entre este organismo y el humano ha permitido modelar en *Drosophila*, patologías cardiovasculares comunes en humanos. Además, se han podido identificar genéticamente los canales iónicos que regulan la función cardíaca de *Drosophila melanogaster* y mediante intervenciones farmacológicas, estudiar su influencia en la generación de arritmias (97, 98).

Los primeros estudios en corazón adulto se enfocaron en evaluar la capacidad de tolerancia del tubo cardíaco a estrés externo, concluyendo que el envejecimiento produce una menor tolerancia al estrés, medido como mayor índice de paro cardíaco y tiempo de recuperación de la actividad cardíaca después del estímulo, en moscas adultas con respecto a moscas jóvenes (99).

Otros estudios se enfocaron en evaluar los efectos de la alteración de ciertos genes en el desarrollo de patologías cardíacas. Por ejemplo, utilizando moscas mutantes para el gen de la distrofina (*dys*) se pudo modelar en moscas la cardiomiopatía dilatada asociada a la distrofia muscular. Moscas que presentaron una pérdida de función en el gen *dys* en el corazón mostraron una alteración dependiente

de la edad de la organización miofibrilar dentro del miocardio, así como alteraciones en el rendimiento cardíaco. La disminución de distrofina mediada por ARN interferente en el mesodermo también acorta la esperanza de vida. La eliminación total o la eliminación de las isoformas grandes de *dys* aumenta la frecuencia cardíaca mediante el acortamiento de los intervalos diastólicos (fase de relajación) del ciclo cardíaco. Morfológicamente, la pérdida de las isoformas de distrofina causa un ensanchamiento del tubo cardíaco y una fracción de acortamiento menor, un fenotipo que emula a la cardiomiopatía dilatada (100).

Por otro lado, se han estudiado varios genes implicados en el manejo de la maquinaria contráctil del corazón. Por ejemplo, mutaciones en el gen *Mhc* codificante para la cadena pesada de miosina afectan la función de la miosina y la estructura y el rendimiento del músculo esquelético y cardíaco de *Drosophila* (101). Estudios del gen *KNCQ1*, que codifica para la subunidad α de los canales de potasio y cuyas mutaciones se asocian a un aumento en la probabilidad de padecer arritmias de Torsades de Pointes y muerte súbita, han servido para estudiar su relevancia en la generación de esta patología (102). La evaluación del gen *dSUR* que codifica una proteína transmembrana de unión a ATP que se expresa en el corazón y se asocia a canales de potasio dependientes de ATP, ha permitido demostrar su importancia para el correcto funcionamiento del corazón (103).

Utilizando tomografía de coherencia óptica (en inglés OCT) para examinar la función cardíaca en adultos de *Drosophila* a partir de un conjunto de deficiencias genómicas definidas molecularmente de las colecciones DrosDel y Exelixis, se identificó una cámara cardíaca anormalmente agrandada en una serie de mutantes de deficiencia que abarca el locus romboide 3. *Rhomboid 3* es miembro de una familia altamente conservada de serina proteasas intramembranales y procesa a Spitz, un ligando similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Utilizando enfoques múltiples basados en el examen de reservas de deficiencia, una serie de mutantes en la vía del receptor romboide-Spitz-EGF y rescate transgénico específico cardíaco o represión dominante negativa del receptor de EGF, se pudo demostrar que la activación mediada por el romboide 3 EGFR es la vía necesaria para una función cardíaca adulta adecuada. La importancia de la señalización EGFR en el corazón adulto de *Drosophila* subraya el concepto de que se requieren mecanismos de señalización conservados evolutivamente para mantener la función normal del miocardio (104).

Una de las principales ventajas de *Drosophila melanogaster* como modelo es su capacidad para realizar amplios *screening* genéticos. Utilizando un *screening* cardioespecífico de ARN interferentes se bloquearon 7061 genes conservados y se pudo identificar a NOT3, componente del complejo regulador de la transcripción CCR4-NOT, como regulador del funcionamiento cardíaco adulto (105).

5.2. Envejecimiento cardíaco en *Drosophila melanogaster*

Una de las principales ventajas de este modelo reside en la capacidad de estudiar procesos asociados al envejecimiento. Dado su corto ciclo de vida (aproximadamente 60 días en el laboratorio), la mosca de la fruta permite estudiar procesos relacionados al envejecimiento que en mamíferos podría llevar años. A su vez, la posibilidad de tener grandes cantidades de individuos provee resultados más robustos a la hora del análisis estadístico.

Varios estudios se han llevado a cabo con el fin de dilucidar cómo el envejecimiento afecta al sistema cardiovascular. Como se mencionó anteriormente, el envejecimiento promueve varias condiciones

patológicas. Las más importantes y las que más se asocian a índices de morbi- mortalidad son las enfermedades cardiovasculares.

A partir de análisis de la respuesta al estrés cardíaco en moscas jóvenes y adultas que dio como resultado que estas últimas poseen una menor respuesta al estrés (99), se estudiaron los efectos de varios genes en el envejecimiento, para discernir su participación en este proceso.

Una de las vías de señalización conocidas por modular la expectativa de vida en modelos vertebrados e invertebrados es la que involucra al receptor de insulina (InR). La reducción de los niveles sistémicos de péptidos similares a la insulina, como la mutación de InR o su sustrato, *chico*, produjeron en moscas una reversión de los efectos del envejecimiento cardíaco antes mencionados (disminución de la frecuencia cardíaca y aumento de la tasa de insuficiencia inducida por estrés). Además, interferir con la señalización de InR exclusivamente en el corazón, al sobre expresar la fosfatasa dPTEN o el factor de transcripción de *forkhead* dFOXO, previene la disminución en el rendimiento cardíaco con la edad. Por lo tanto, la señalización de insulina-IGF influye de forma directa y autónoma en la fisiología y senescencia orgánicas dependientes de la edad, además de su efecto sistémico en la duración de la vida (106).

Un factor importante en el progreso del envejecimiento es el daño oxidativo, producido principalmente por el aumento de radicales libres del oxígeno (ROS). Una de las enzimas reguladoras de la producción de ROS es la manganeso superóxido dismutasa mitocondrial (*Sod2*). Las enzimas pertenecientes a la familia SOD producen peróxido de hidrógeno a partir del anión superóxido, para que luego la catalasa pueda convertir el peróxido de hidrógeno en agua, reduciendo así el daño oxidativo en la célula. Estudios llevados a cabo en *Drosophila* demostraron que mutaciones en *Sod2*, y por lo tanto un aumento en la producción de ROS, conducen a un deterioro en el funcionamiento cardíaco medido como una disminución en la frecuencia cardíaca y en la velocidad de relajación, mostrando cómo el daño oxidativo puede afectar el desempeño del corazón (107).

Un grupo de investigadores de la Universidad de California ha desarrollado recientemente un método de obtención y análisis de imágenes *in vivo* de alta resolución que permitió mostrar que, al igual que en los humanos, el envejecimiento normal se manifiesta principalmente como defectos en la relajación (diástole) a la vez que se preserva el rendimiento contráctil. Encontraron que dos subunidades del canal de potasio (K2P), en gran medida prescindibles al principio de la vida, son necesarias para terminar la contracción (sístole) en animales viejos, donde su pérdida culmina en un paro cardio-fibrilatorio (108).

Estos trabajos se encuentran entre el vasto abanico de posibilidades de estudio que presenta este modelo a la hora de abordar el envejecimiento cardíaco. Así, queda demostrada su utilidad y robustez para modelar los mecanismos involucrados en la fisiopatología cardíaca con el potencial de extrapolar resultados a modelos de mamíferos, incluido el humano.

5.3. Efectores de la vía TOR involucrados en el envejecimiento cardíaco

Como se nombró previamente, una de las vías involucradas en el envejecimiento es la vía de señalización de insulina. Además de ésta, se ha mostrado que la vía de señalización TOR participa en el envejecimiento cardíaco. Moscas que presentan una reducción en *dTOR* mostraron una tasa de insuficiencia cardíaca baja y similar tanto en moscas jóvenes como en moscas viejas. De acuerdo con la disminución de la insuficiencia cardíaca, la vida media de estas moscas mutantes se incrementó en un 20% en condiciones normales de alimentación, indicando que la protección de la función cardíaca relacionada con la edad se correlaciona bien con el aumento de la expectativa de vida en este mutante (109).

Estas dos vías participan de manera entrelazada en el mantenimiento de la homeostasis y en el crecimiento celular, compartiendo algunos blancos en común como 4E-BP y S6K.

Wessells y colaboradores (110) llevaron a cabo un estudio donde demostraron que el aumento de la expresión cardíaca de *dTOR* dio como resultado un aumento de la tasa de insuficiencia inducida por el estrés al *marcapaseo* o estimulación eléctrica, a edades tempranas. Esta alta tasa continuó aumentando durante el envejecimiento, permaneciendo más alta que los controles en cada punto de tiempo. En las moscas, como en los mamíferos, la actividad TOR está regulada negativamente por el complejo de proteína sensible a aminoácidos TSC1 y TSC2. La co-sobreexpresión de *dTSC1* y 2 en el corazón de la mosca durante toda la vida redujo la disminución de la respuesta al estrés cardíaco relacionada con la edad. Los corazones que sobreexpresan *dTSC* fueron idénticos a los controles en la tasa de insuficiencia inducida por estrés a edades jóvenes, pero exhibieron un aumento mínimo en la insuficiencia inducida por estrés con el aumento de la edad. Esto indica que la actividad de TOR en el tejido cardíaco es importante para la regulación de la sensibilidad al estrés y que la reducción en la actividad de TOR promueve el mantenimiento de la función cardíaca juvenil durante el envejecimiento.

Moscas mutantes nulas de *d4EBP* en corazón mostraron un aumento temprano en la tasa de insuficiencia inducida por estrés al *marcapaseo* en comparación con los controles. Cuando se sobreexpresó de manera específica en corazón 4E-BP se observó una reducción del deterioro cardíaco relacionado con la edad. La insuficiencia inducida por estrés de las moscas que sobreexpresaron 4E-BP fue tan baja a las cinco semanas como a la semana, indicando un rol beneficioso de 4E-BP en el desempeño cardíaco. Cuando se redujeron por ARN interferente los niveles de 4E-BP, la tasa de insuficiencia cardíaca inducida por estrés aumentó significativamente a edades jóvenes en comparación con los controles. Además, en esas moscas se produjo un pequeño descenso de la respuesta al estrés (*heart failure*) relacionado con la edad, y las moscas de una semana de edad mostraron una respuesta al estrés similar a la de las moscas de cinco semanas de edad en contraste con las moscas control, que exhibieron un aumento de la falla cardíaca en respuesta al estrés con el envejecimiento.

En este mismo trabajo, cuando se evaluaron los efectos de eIF4E mediante su sobreexpresión se observó un aumento en la tasa de insuficiencia cardíaca a edades tempranas, manteniéndose elevada durante el transcurso del tiempo. En estas moscas se midió también el índice de arritmias como medida de la incapacidad de responder al estrés por *marcapaseo*. Este índice fue calculado como la variación estándar en el período cardíaco (tiempo entre el comienzo de dos intervalos diastólicos

consecutivos) normalizado por el promedio del período cardíaco de cada individuo. La sobreexpresión de eIF4E condujo a un aumento en el índice de arritmias desde edades tempranas. Los autores concluyeron que aquellas moscas que sobreexpresan eIF4E se comportan como adultas o envejecidas a edades tempranas y este comportamiento se mantiene a lo largo de la vida.

Estos resultados muestran cómo los efectores de la vía TOR, 4E-BP y eIF4E participan en el envejecimiento cardíaco de *Drosophila melanogaster*.

Los hallazgos expuestos muestran una buena aproximación al comportamiento de *Drosophila melanogaster* durante el envejecimiento, pero poco se sabe aún sobre el desempeño cardíaco mediado por el calcio intracelular, es decir la función contráctil. Esto nos lleva a plantearnos la siguiente

HIPÓTESIS:

Cambios de la expresión y/o actividad de eIF4E y/o su regulador 4E-BP, que integran la vía de señalización TOR, pueden alterar el funcionamiento cardíaco (contractilidad, acoplamiento eléctrico-contráctil) y, ser un factor relevante en la generación de arritmias y de la insuficiencia cardíaca que ocurren durante el envejecimiento.

OBJETIVOS GENERALES:

- 1- Caracterizar el transitorio de Ca^{2+} en líneas de *Drosophila melanogaster* que tengan modificaciones en la expresión de los genes que codifican para las proteínas eIF4E-1/2 y 4E-BP a dos edades diferentes.
- 2- Analizar la participación de eIF4E-1/2 y 4E-BP en la génesis de arritmias con la edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

MANTENIMIENTO DE STOCKS Y CRUCES GENÉTICOS.

Todas las líneas de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron en viales suplementados con harina de maíz, glucosa, levadura y antimicótico (Anexo I) a temperatura ambiente. Fueron criados un promedio de 20 individuos en viales pequeños, 50 en viales medianos y 300 en viales grandes.

Para la realización de los cruzamientos genéticos, se separaron hembras vírgenes de las líneas maternas y se las cruzó con machos de la paterna. Para separar las hembras vírgenes se tomaron los viales donde se amplificaron las líneas y quitaron los adultos. En dichos viales se mantuvieron tanto larvas como pupas. Una vez que las pupas llegaron a estadios avanzados, se extrajeron de las paredes del vial con pincel y se observaron bajo lupa. Los machos en estadio avanzado se pueden distinguir de las hembras por poseer claramente visibles los peines sexuales. A partir de esta identificación se separaron las pupas hembras en un vial y los machos en otro. Una vez emergidos los adultos se confirmó el sexo de los individuos y se procedió a los cruzamientos genéticos.

Trece hembras de la línea materna fueron cruzadas con siete machos de la línea paterna a 28°C. La figura 8 muestra el esquema representativo de cruzamiento. Las cruza se mantuvieron a 28°C dado que el factor de transcripción Gal4, expresado bajo el promotor específico de corazón TinC, mediante el cual se encuentra regulada la expresión de los transgenes controlados por Gal4, se encuentra activo a dicha temperatura. Gal4 es una proteína capaz de unirse a una secuencia nucleotídica en el ADN llamada UAS y promover la transcripción de los genes que se encuentren corriente abajo de esta secuencia. Los transgenes de interés se encuentran asociados a la secuencia UAS, por lo que es posible inducir su expresión con solo mantener las moscas transgénicas a la temperatura adecuada de activación de Gal4 (figura 9). Puesto que las líneas paternas son homocigotas y las F1 resultantes heterocigotas, como control se utilizó la F1 proveniente de la cruce de la línea GCaMP3 (que porta únicamente el sistema reportero fluorescente para sensor Ca^{2+}) con la línea control Canton S. De este modo, todas las líneas estudiadas poseen la misma dosis de la proteína reportera.

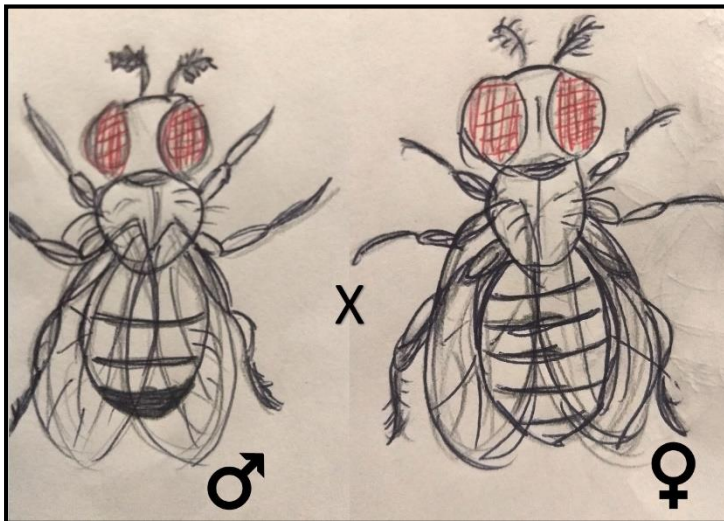
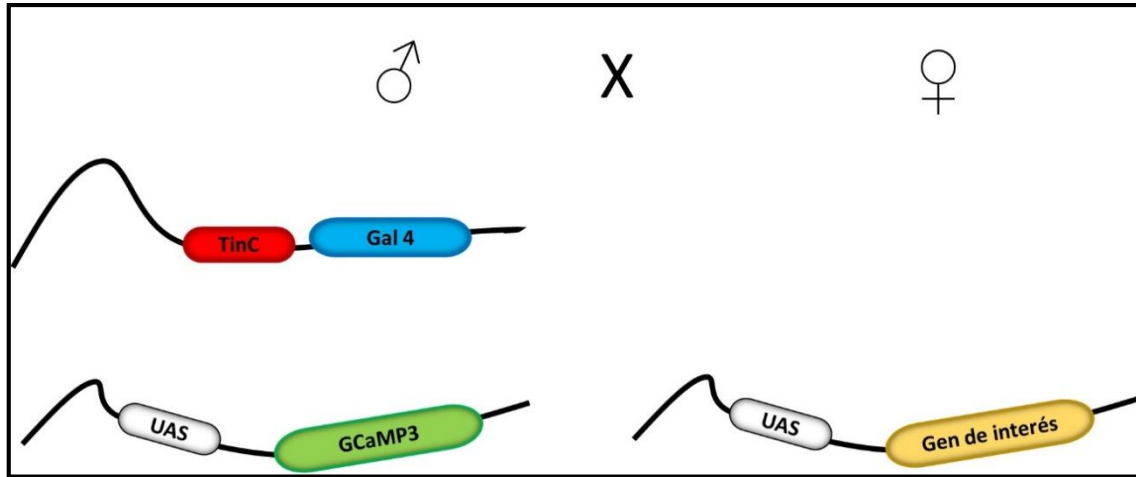


Figura 8. Dibujo representativo de los fenotipos de macho (izquierda) y hembra (derecha) de *Drosophila melanogaster*. La hembra se caracteriza por poseer un tamaño corporal mayor y un patrón de bandeo igual a lo largo de todo el abdomen mientras que el macho es de menor tamaño y las bandas más posteriores de su abdomen están juntas formando una única banda más grande.

A.



B.

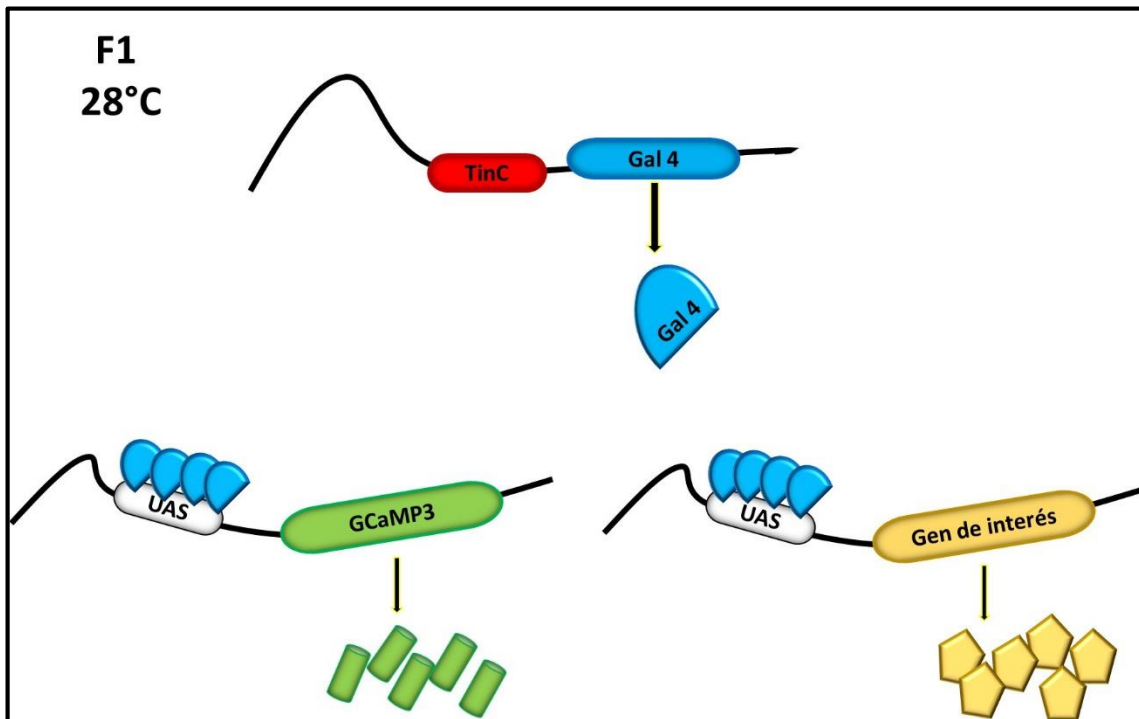


Figura 9 A. Esquema de los genotipos de las líneas transgénicas y sus regulaciones. Los machos poseen en su cromosoma 2 el gen que codifica para el factor de transcripción de levaduras Gal 4 bajo el promotor específico de tejido cardíaco TinC; y la construcción del reportero fluorescente GCaMP3 bajo la secuencia reguladora UAS en el cromosoma 2 y 3. Las hembras poseen en su cromosoma 3 el gen de interés bajo la secuencia reguladora UAS. Este gen de interés puede ser *eIF4E*, *4E-BP* o las construcciones de los ARN interferentes *ARNi-eIF4E* y *ARNi-4E-BP*. **B.** Esquema representativo del genotipo y fenotipo de la F1 producto de las cruizas de interés. La F1 posee en su cromosoma 2 el gen que codifica para Gal 4 bajo el promotor específico de corazón TinC. A 28 °C se produce la expresión de dicho gen. El factor de transcripción Gal 4 se une a las secuencias UAS de los cromosomas 2 y 3 y promueve la transcripción de los genes corriente abajo: GCaMP3 y el transgen de interés.

Los adultos de las líneas paternas fueron pasados a otro vial cuando los viales donde se realizaron las cruizas tenían pupas de la F1. Una vez emergidos los individuos de la F1 se pasaron a un nuevo vial y se mantuvieron a 28°C hasta el momento de uso para los experimentos fisiológicos, siempre pasándolos a nuevos viales antes de que emerjan individuos de la F2.

En todos los casos la línea paterna fue la línea portadora de un sistema reportero que sensa cambios en el calcio intracelular, llamada GCaMP3. Esta línea se destaca por poseer codificada en su genoma una proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) acoplada a

un dominio de calmodulina. Cuando el calcio se une a este dominio la proteína cambia su conformación emitiendo fluorescencia en el rango de 510 nm al ser excitada a 488 nm mientras que, si no se encuentra unida al calcio, la proteína no emite fluorescencia. De esta manera, se pudieron medir los cambios transitorios de calcio producidos durante el latido cardíaco medidos como los cambios de fluorescencia emitidos por la proteína reportera (111).

La línea GCaMP3 (*TinC-Gal4-UASGCaMP3/TinC-Gal4-UASGCaMP3; UAS-GCaMP3/UAS-GCaMP3*) fue gentilmente obsequiada por el doctor Matthew Wolf de la Universidad de Virginia. Las líneas transgénicas UAS-eIF4E (w^* ; $P\{UAS-eIF4E1.R\}2$) y UAS-4E-BP (w^* ; $P\{UAS-Thor.wt\}2$), y la línea control Canton S fueron adquiridas del Bloomington Drosophila Stock Center de la ciudad de Indiana stocks #8650, #9147 y #64349, respectivamente. Las líneas UAS-ARNi-eIF4E (w^{1118} ; $P\{GD1432\}v7800$) y UAS-ARNi-4E-BP (w^{1118} ; $P\{GD12533\}v35439$) fueron adquiridas del Vienna Drosophila Resource Center stocks #v7800 y #v35439, respectivamente.

La tabla 1 resume los cruzamientos genéticos y las F1 resultantes marcadas en rojo.

TABLA 1

♂	♀	TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/TinC-Gal4-UAS-GCaMP3; UAS-GCaMP3/UAS-GCaMP3
Canton S		TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/+
+/+; UAS-eIF4E/UAS-eIF4E		TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/ UAS-eIF4E
+/+; UAS-ARNi-eIF4E/UAS-ARNi-eIF4E		TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/ UAS-ARNi-eIF4E
+/+; UAS-4E-BP/UAS-4E-BP		TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/ UAS-4E-BP
+/+; UAS-ARNi-4E-BP/ UAS-ARNi-4E-BP		TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/ UAS-ARNi-4E-BP

Tabla 1. La tabla muestra los cruzamientos genéticos y sus correspondientes descendencias. En la columna de la izquierda se muestran los genotipos maternos y en la de la derecha los fenotipos de las F1 resultantes de su cruce con el fenotipo paterno mostrado en la primera fila de esa columna.

OBTENCIÓN DEL PREPARADO SEMI-INTACTO

Los individuos de las F1 en estudio fueron colectados a los 7 y 40 días después de la eclosión y usados en los ensayos fisiológicos. Se anestesiaron brevemente con dióxido de carbono 100% y colocaron pegados por la parte dorsal a una placa de Petri de 6mm recubierta con vaselina y que contenía hemolinfa artificial (Anexo II). Se extrajeron cabeza, tórax y patas con pinzas. Luego se hizo una incisión longitudinal a través del abdomen con tijeras y se procedió a la extracción de los órganos abdominales y limpieza del cuerpo graso, dejando solo el tubo cardíaco adosado a la cutícula como se muestra en la figura 10.



Figura 10. Obtención del preparado semi intacto. Izquierda: mosca anestesiada sumergida en hemolinfa. Medio: Cutícula con el tubo cardíaco expuesto (el tubo cardíaco es transparente, puede notarse en la imagen como una sombra marrón vertical). Derecha: imagen de fluorescencia del preparado semi intacto. La flecha indica la fluorescencia en la cámara cónica, donde se realiza el registro de calcio.

OBTENCIÓN DE LA SEÑAL FLUORESCENTE

Luego de la obtención del preparado semi intacto los corazones se llevaron al microscopio confocal Carl Zeiss 410 sumergidos en 225 μ l de hemolinfa artificial en las casillas diseñadas sobre cubreobjetos que se muestran en la figura 11. Una vez en el microscopio, se escaneó cada preparado para identificar las zonas fluorescentes correspondientes al tubo cardíaco. Nos posicionamos sobre la cámara cónica, definiendo la región de escaneo del láser en un punto. Este punto se escaneó durante 120 mseg 1024 veces, resultando en un escaneo total del preparado de 62 seg con una resolución de 1024 x 1024 pixeles. Las imágenes obtenidas se procesaron con un algoritmo para Anaconda desarrollado en nuestro laboratorio para obtener la intensidad de fluorescencia en cada pixel de manera secuencial. Los valores obtenidos en el tiempo analizaron con el software LabChart (AD Instruments, CO, USA). Cada incremento de fluorescencia seguido de una disminución de fluorescencia representa el transitorio de Ca^{+2} citosólico que precede a la contracción cardíaca (Figura 12).

Las intervenciones farmacológicas sobre el preparado semi intacto se llevaron a cabo a los 20 seg de adquisición de la imagen.

Una vez obtenido el registro en el LabChart, los parámetros fisiológicos medidos fueron:

- Frecuencia cardíaca: (transitorios de Ca^{+2} /minuto).
- Amplitud de los transitorios de calcio: diferencia entre el máximo y el mínimo valor de fluorescencia de la onda, normalizado por el valor mínimo. (Unidades arbitrarias de aumento de fluorescencia, UA). ($\Delta F/F_0$)
- Derivada positiva: velocidad máxima de aumento de fluorescencia: $+d\Delta F/F_0/dt$; (UA)/seg).
- Derivada negativa: velocidad máxima de disminución de fluorescencia: $-d\Delta F/F_0/dt$; (UA)/seg).
- Tau: constante de la caída exponencial del transitorio de calcio o constante de relajación (seg).
- Período cardíaco: Intervalo entre dos picos consecutivos de fluorescencia o transitorios de calcio (seg).
- Índice de arritmias: desviación estándar del período cardíaco normalizado por su promedio.

- Carga de calcio del retículo sarcoplasmático: amplitud del transitorio de calcio intracelular inducido por un pulso de 10 mM de cafeína (UA). Durante el pulso de cafeína, el secuestro de calcio por el RS está virtualmente ausente, por lo que la velocidad de caída del pulso de cafeína ($1/\text{Tau}_{\text{caf}}$), indica la velocidad de salida de calcio de la célula por el NCX.
- Fracción de liberación de calcio: relación entre el transitorio de calcio producido por el pulso eléctrico y el producido por el pulso de cafeína. Indica la relación entre lo que libera el RS en una contracción y el contenido de calcio del RS.
- Actividad de la SERCA: La velocidad de relajación está determinada como dijimos por la velocidad de secuestro de Ca por el RS, que evaluamos por el Tau del transitorio de calcio $1/\text{Tau}_{\text{Ca}}$ y el la velocidad de salida de calcio por el NCX ($1/\text{Tau}_{\text{caff}}$). La diferencia entre los dos parámetros, permite estimar la actividad de la SERCA: $(1/\text{Tau}_{\text{caf}} - 1/\text{Tau}_{\text{Ca}})$

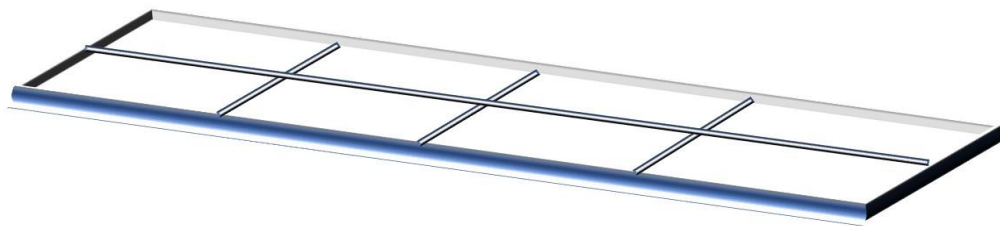


Figura 11: Representación de la gradilla utilizada para la observación de los preparados semi intactos en el microscopio confocal. La gradilla está conformada por un portaobjetos al cual se pegó la gradilla impresa en una impresora 3D. Cada casillero posee una capa de vaselina sobre la cual se pega el preparado semi intacto y se embebe en 225 μl de hemolinfa artificial.

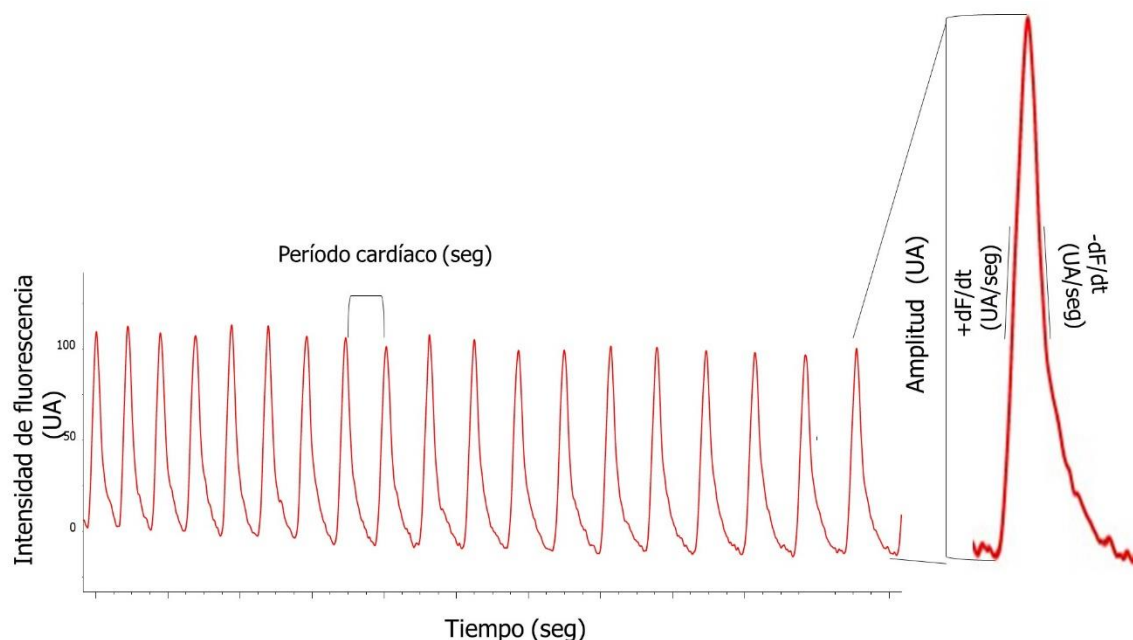


Figura 12: La figura muestra un registro de calcio típico y los parámetros que se midieron. El período cardíaco es el tiempo en segundos entre un latido y otro. Con este valor se calculó luego el índice de arritmias como la variabilidad de los períodos con respecto al promedio. La amplitud del transitorio de calcio está dada por la intensidad de fluorescencia máxima menos la mínima del transitorio de calcio, normalizada por la fluorescencia mínima. Las derivadas positiva y negativa representan la velocidad de contracción y relajación respectivamente.

INTERVENCIONES FARMACOLÓGICAS

Cafeína: se administraron 25 µl de cafeína (Sigma-Aldrich) 100 mM con pipeta sobre el preparado semi intacto logrando una concentración de 10 mM de cafeína en el preparado. La administración se hizo con pipeta automática dejando caer la solución sobre la cámara cónica, indicada por la zona de incidencia del láser del microscopio confocal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis comparativo de los datos funcionales se utilizó ANOVA de una vía con test de Tukey cuando se comparó el efecto de las líneas y test de student cuando se compararon dos muestras. En todos los casos se utilizó un intervalo de confianza del 95%, considerando significativos todos los resultados estadísticos menores a un p de 0,05.

ENSAYOS DE TRADUCCIÓN

Dado que nuestras líneas de estudio presentan modificaciones en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la síntesis proteica o traducción, nos propusimos estudiar si nuestros resultados son dependientes o independientes de la acción canónica de estas proteínas sobre la síntesis proteica en el corazón. Los estudios se enfocaron en analizar si los niveles generales de síntesis proteica varían en líneas transgénicas de moscas con niveles diferenciales de expresión de eIF4E y 4E-BP. Para ello analizamos la síntesis proteica en tejido cardíaco mediante el Click-iT™ Plus OPP Alexa Fluor™ 488 Protein Synthesis Assay Kit (Invitrogen™ #C10456).

Antes de realizar los ensayos en el tejido cardíaco se probó la eficiencia del kit en un cultivo de células HeLa. La elección de estas células se debió a que son un tipo celular traduccionalmente activo, lo que nos permite evaluar cambios en los niveles de síntesis proteica.

Las células se cultivaron de manera convencional en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Scientific™) y una vez alcanzado el 80% de confluencia se levantaron y pasaron a una placa de 3 mm en cuya base se colocó un portaobjetos para que las células se adhirieran y crecieran sobre éste facilitando el posterior montaje y visualización en el microscopio de fluorescencia. Al día siguiente se cambió el medio por DMEM sin metionina (Dulbecco's Modified Eagle's Limiting Medium, Thermo Scientific™ #30030) suplementado con el análogo de metionina OPP (O-propargil-puromicina) 1:1000. Se cultivaron durante 30 min a 37°C y luego se procedió a la fijación y tinción. El grupo de células que se usó como control negativo se incubó con el inhibidor de la traducción cicloheximida (1 mg/ml, Sigma Inc, USA) al momento de la incubación con el medio suplementado con OPP. Después de la incubación se lavaron las células con buffer fosfato salino (PBS) durante 10 min. Luego se incubaron durante 15 min con paraformaldehído (PFA) al 4% y posteriormente con 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 15 min. Tras estos pasos las células se lavaron dos veces con PBS e incubaron durante 30 min en oscuridad con el cóctel de reacción del kit preparado como lo indica el proveedor. Luego se lavaron con el componente F del kit durante 10 min y se incubaron con Nuclear Mask 1:2000 en PBS durante 30 min en oscuridad. Tras dos lavados con PBS se montaron en portaobjetos y observaron al microscopio confocal Olympus FV1000.

Para los ensayos de traducción en el preparado semi intacto de corazón se precalentó el medio Schneider (Gibco™ #21720-024) a 30°C y se adicionó el análogo de metionina OPP en una relación 1:1000 con respecto al medio. Los preparados semi intactos se incubaron durante 45 min a 37 °C en este medio. Como control negativo se bloqueó la traducción con cicloheximida (1mg/ml, Sigma Inc, USA) co-incubando los corazones con ésta al momento de la incubación en el medio con OPP.

Transcurrido este tiempo, se lavaron los corazones con PBS durante 10 min. Luego se fijaron con PFA 4% durante 15 min y permeabilizaron con 0,5% de Tritón X-100 en PBS durante 15 min. En el transcurso

de estos 15 min se procedió al preparado del cóctel de reacción como lo indica el kit. Luego de lavar los corazones dos veces con PBS se incubaron con el cóctel de reacción durante 30 min en oscuridad. Posteriormente a este paso, los corazones se lavaron con el componente F del kit durante 10 min y se incubaron con Nuclear Mask 1:2000 en PBS durante 30 min en oscuridad. Tras realizar dos lavados con PBS se procedió al montaje en puente como lo muestra la Figura 13.

Los portaobjetos con las muestras obtenidas se observaron en microscopio confocal Olympus FV1000.



Figura 13: Representación del método utilizado para el montaje de los corazones. Dado que estos se encuentran adosados a la cutícula y a que ésta posee forma cóncava, el montaje común aplasta el preparado e impide una buena observación. Implementamos este montaje en el que se utilizan dos cubreobjetos como base a la que se adhiere un tercer cubreobjetos por encima con las muestras inmersas en glicerol. De este modo se establece un "puente" de cubreobjetos debajo del cual quedan las muestras sin ser aplastadas y deformadas.

ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO

Para evaluar si eIF4E y SERCA interactúan físicamente se procedió al empleo del ensayo de doble híbrido. El principio de este ensayo se basa en la acción del factor de transcripción de levaduras Gal4. Este factor se encuentra formado por dos dominios, uno de unión al ADN (BD, por sus siglas en inglés *binding domain*) y otro de activación de la transcripción (AD, por sus siglas en inglés *activator domain*). Cuando estos dos dominios se unen, el factor Gal4 es activo y capaz de unirse a una secuencia nucleotídica en el ADN llamada UAS (por sus siglas en inglés *Upstream activating sequence*) promoviendo así la transcripción de cualquier gen que se encuentre corriente abajo de ésta. El hecho de que Gal4 esté conformado por dos dominios permite clonar proteínas de interés asociadas a cada uno de sus dominios y, en caso de que estas proteínas interactúen, se encontrarán lo suficientemente cerca para formar el factor Gal 4 activo y promover la transcripción de aquellos genes que se encuentren corriente abajo de la secuencia UAS. Así, midiendo la expresión de un gen reportero codificado corriente abajo del UAS se puede medir la interacción entre dos proteínas de interés (112, 113).

En el sistema de doble híbrido de levadura Gold Matchmaker (ClonTech) que hemos utilizado, cuando las proteínas del *cebo* y *presa* (proteínas de interés) interactúan, el ADN-BD y AD se acercan para activar la transcripción de cuatro genes reporteros independientes (AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1). La figura 14 muestra un esquema representativo del funcionamiento de éste. El sistema posee cuatro genes reporteros integrados bajo el control de tres promotores distintos que responden a Gal4 y se utilizan para detectar las interacciones de doble híbrido y se describen a continuación.

AUR1 - C. Una versión mutante dominante del gen AUR1 que codifica la enzima inositol fosforil ceramida sintasa. AUR1-C se expresa en la cepa de levadura Y2HGold en respuesta a las interacciones proteína-proteína que llevan a la activación transcripcional por GAL4. En *Saccharomyces cerevisiae*, su expresión confiere una fuerte resistencia al fármaco Aureobasidina A (AbAr).

HIS3. La cepa Y2HGold es incapaz de sintetizar histidina y es por lo tanto incapaz de crecer en medios que carecen de este aminoácido esencial. Cuando las proteínas de *cebo* y *presa* interactúan, la expresión de His3 sensible a Gal4 permite que la célula sintetice histidina y crezca en un medio mínimo.

ADE2. Y2HGold también es incapaz de crecer en medios mínimos que no contengan adenina. Sin embargo, cuando las dos proteínas interactúan, la expresión de Ade2 se activa, permitiendo que estas células crezcan en medio mínimo sin adenina (-Ade).

MEL1. MEL-1 codifica α -galactosidasa, una enzima que existe naturalmente en muchas cepas de levadura. Como resultado del doble híbrido, la α -galactosidasa (MEL1) es expresada y secretada por las células de levadura. Las colonias de levadura que expresan Mel1 se tornarán color azul en presencia del sustrato cromógeno X- α -Gal.



Figura 14. Principio del ensayo de doble híbrido: se expresan dos proteínas separadamente, una (proteína de cebo) fusionada al dominio de unión al ADN de Gal4 (BD) y la otra (proteína de presa) fusionada al dominio de activación transcripcional de Gal4 (AD). En Y2HGold Yeast Strain, la activación de los reporteros (AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1) sólo ocurre en una célula que contiene proteínas que interactúan y permiten la unión de Gal4 al promotor.

Para llevar a cabo el ensayo de doble híbrido se utilizaron cepas de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* que poseen cada uno de los genes codificantes para las isoformas de eIF4E de *Drosophila melanogaster* unidos al dominio de unión al ADN (BD) del factor de transcripción Gal4 y una cepa que posee el gen codificante para SERCA 2A de *Drosophila melanogaster* unido al dominio de activación (AD) de Gal 4. Las cepas fueron provistas por el Dr. Greco Hernández y los ensayos fueron realizados durante mi estancia en su laboratorio en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México.

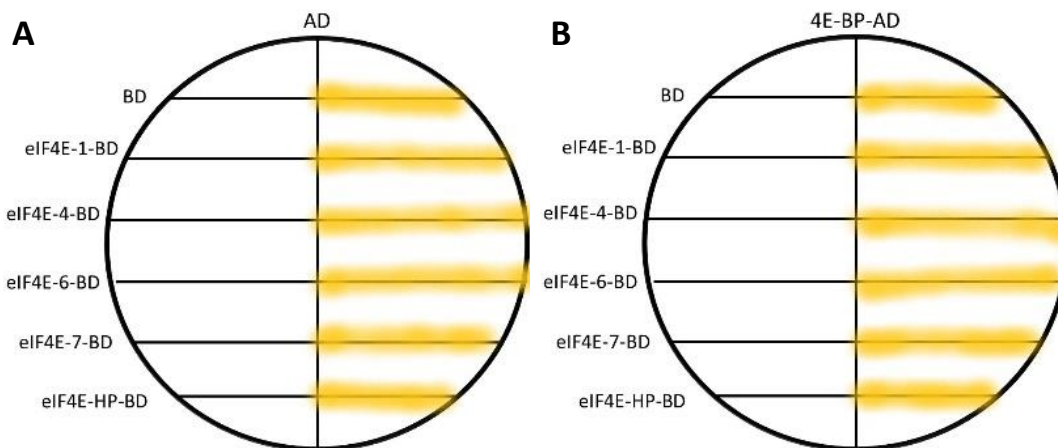
Las levaduras que permanecían guardadas a -70°C fueron descongeladas en hielo, *plaqueadas* en placas YPD-agar (Anexo III) y crecidas a 30°C en estufa. Todas las cepas de partida son haploides. *S cerevisiae* posee 2 formas de vida, una haploide y otra diploide. Cuando 2 cepas haploides se cruzan dan lugar a una cepa diploide.

Una vez que las cepas haploides hubieron crecido se procedió a la cruce en medio YPD-agar para dar lugar a la cepa diploide portadora de las construcciones en los dominios de activación y de unión al ADN de Gal 4 (figura 15). Un día después se realizó una réplica de la placa en medio carente de leucina y triptófano (-LW). Cabe destacar que la cepa portadora del AD es capaz de crecer en medio sin leucina mientras que, la cepa portadora del BD lo es en medio carente de triptófano. De este modo, solo las cepas diploides serán capaces de crecer en el medio carente de ambos permitiendo así su selección. Al día siguiente se tomó una pequeña muestra de células diploides y se esparció en la placa -LW como se muestra en la figura 16. Luego de un día de crecimiento se realizó la réplica de estas placas en los

medios restrictivos para evaluar la interacción proteica. Los medios utilizados fueron: medio sin leucina, triptófano e histidina suplementado con 30 mM de 3-Amino-1,2,4-Triazol (-LWH + 30 mM 3AT) y, medio sin leucina, triptófano, histidina y adenina suplementado con 30 mM de 3-Amino-1,2,4-Triazol (-LWHa + 30 mM 3AT). La elección de estos medios se debe a que las cepas poseen corriente debajo de la secuencia UAS los genes reporteros que permitirán observar la interacción de las proteínas de interés. Uno de ellos es el gen reportero HIS3 que permite la síntesis de histidina en la célula. Así, en un medio carente de histidina, si las proteínas de interés interaccionan los dominios de activación y de unión del ADN del factor de transcripción Gal 4 se encontrarán lo suficientemente cerca como para dar lugar a Gal 4 funcional y de este modo promover la transcripción del gen HIS3. A su vez, para asegurarse que dicha interacción es real se agrega 3AT, un inhibidor competitivo del producto del gen HIS3. La célula será capaz de crecer en presencia de 3AT solamente si el nivel del producto del gen HIS3 es suficiente para producir suficiente histidina y permitir la supervivencia celular. De este modo, las levaduras serán capaces de crecer en medio carente de este aminoácido sí y sólo sí las proteínas de interés interaccionan. ADE2 es también un gen corriente abajo de la secuencia UAS. Dado que las cepas son incapaces de crecer en medio carente de adenina, de igual manera que pasa con el gen HIS3, si las proteínas de interés interaccionan se promoverá la transcripción de ADE2, para promover la síntesis de adenina y el crecimiento celular en medio carente de ésta.

El experimento de interacción se realizó a distintos tiempos de crecimiento y se eligió un tiempo de 72 horas ya que permitía observar con claridad las interacciones y poder discriminar este crecimiento del ruido de fondo.

Como control negativo de interacción se utilizó una cepa portadora del vector con el dominio de activación solo y como control positivo una cepa portadora del dominio de activación acoplado a la proteína 4E-BP, quien se conoce ampliamente que interacciona con algunas de las isoformas de eIF4E.



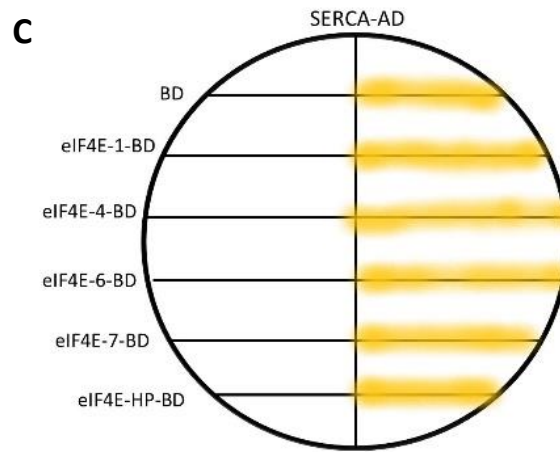


Figura 15. Esquema representativo de las cruces de cepas haploides en medio YPD-agar. Se trazó una línea vertical en la placa con la cepa portadora del dominio de activación solo (A), el dominio de interacción asociado a 4E-BP (B) y el dominio de activación asociado a SERCA (C). Se trazaron líneas horizontales con las cepas portadoras del dominio de unión al ADN (BD), y de las secuencias génicas de eIF4E-1; 4; 6; 7 y HP asociadas al dominio de unión al ADN. Remarcadas en amarillo se encuentran las cepas diploides producto de la cruce que fueron sometidas al ensayo de interacción.

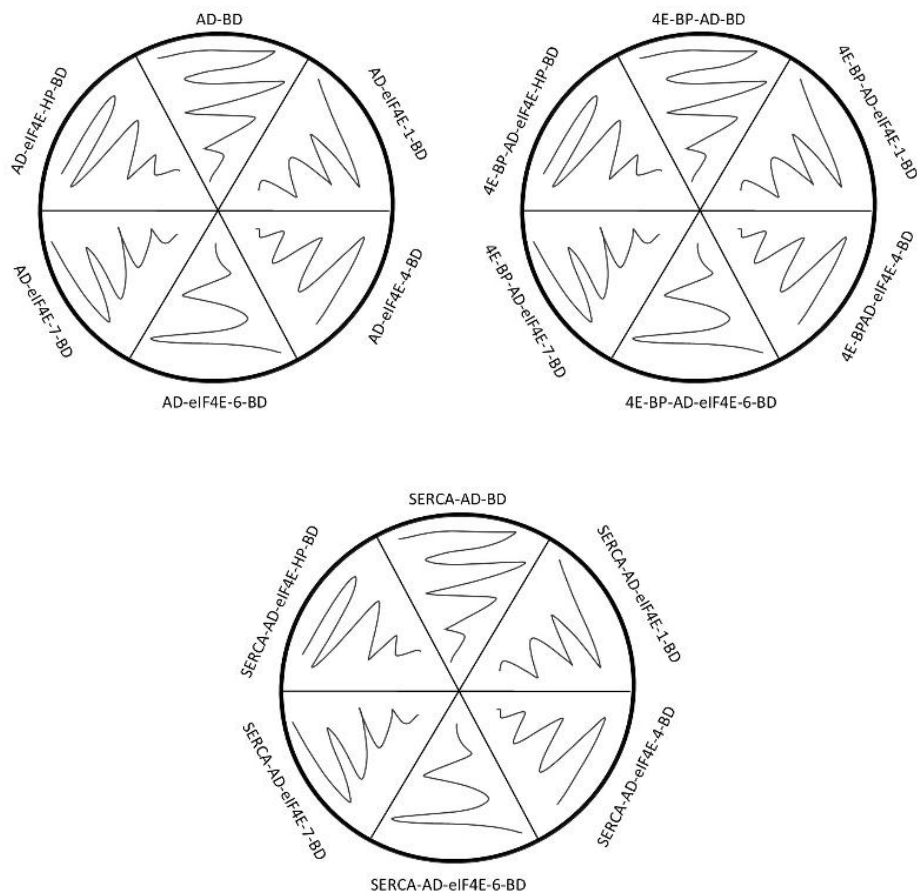


Figura 16. Esquema representativo del crecimiento de las cepas diploides. Se tomaron células diploides producto de los cruzamientos (marcadas en amarillo en la figura 15) y se esparcieron sobre la placa -LW como se muestra en la figura. Se dejaron crecer a 30°C y luego se realizó la réplica en las placas de interacción.

De la misma manera, se realizó un ensayo de doble híbrido cotejando el gen eIF4E-1 humano con el gen de SERCA de humano para evaluar si la interacción propuesta se encuentra conservada en distintas especies.

Para ello, las secuencias de los ADNc de dichos genes fueron provistas por OriGene Technologies, siendo los clones obtenidos los #RC207333 y #RC214911, respectivamente. Todos los ADNc se encontraban insertos en el vector pCMV6-Entry y fueron amplificados por PCR a partir de estos utilizando las siguientes combinaciones de primers:

Human SERCA EcoRI Forw 5' GAATTCATGGAGAACGCGACAACCAAGACG 3'

Human SERCA 744 PstI Rev 5' CTGCAGTTAGGGTGTCTCTCCTGTTCTGTTGC 3'

Human eIF4E EcoRI Forw 5' GAATTCATGGCGACTGTGCAACCGGAAACCA 3'

Human eIF4E PstI Rev 5' CTGCAGTTAAACAACAAACCTATTTTTAGTGGTGG 3'

Luego se ligaron en el vector pTC57R/T con la ligasa T4 durante toda la noche. 5 µl de los plásmidos ligados se utilizaron para transformar 50 µl de bacterias *E coli* DH5α competentes co-incubándolas 20 min en hielo, aplicando un shock térmico de 42°C de 30 seg para luego recuperarlas durante 60 min a 37°C en agitación con 200 µl de LB. Tras este paso se *plaquearon* en placas LB-agar-ampicilina y dejaron crecer durante 17 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se seleccionaron colonias y dejaron crecer en LB líquido durante 17 horas a 37°C en agitación para luego extraer por mini-prep los plásmidos de las colonias transformadas. Estos plásmidos se cortaron con las enzimas de restricción correspondientes (EcoRI y PstI para eIF4E y SERCA). Aquellos clones que tras el corte con las enzimas de restricción liberaron el fragmento insertado fueron considerados como clones positivos y se enviaron a secuenciar. Tras la secuenciación, se procedió a la ligación de eIF4E en el plásmido portador del dominio de unión al ADN de Gal 4 y la ligación de SERCA en el plásmido portador del dominio de activación de Gal 4. Para ello ambos plásmidos fueron cortados con EcoRI y PstI e incubados en una proporción 3:1 y 9:1 inserto: plásmido con la ligasa T4 durante toda la noche a 4°C. Los productos de ligación se utilizaron para transformar bacterias DH5α como se detalló anteriormente, y tras los pasos mencionados, una vez identificados los clones positivos uno de cada uno de ellos se utilizó para la transformación de las cepas de levaduras. Los plásmidos portadores del dominio de unión al ADN fueron clonados en la cepa α de *S cerevisiae* y los plásmidos portadores del dominio de activación en la cepa α. El procedimiento para la transformación de las levaduras se detalla en el apartado "Transformación de levaduras con las construcciones mutantes".

Una vez obtenidas las levaduras con las construcciones de interés para estudiar la interacción entre las proteínas humanas, se procedió al ensayo de doble híbrido propiamente dicho. Como se mencionó anteriormente, las cepas haploides se cruzaron en medio YPD-agar para dar lugar a las cepas diploides. Éstas se crecieron en medio -LW y luego se sometieron a la evaluación de la interacción en los medios restringidos antes mencionados. Las figuras resumen los pasos de cruce y crecimiento de dichas cepas.

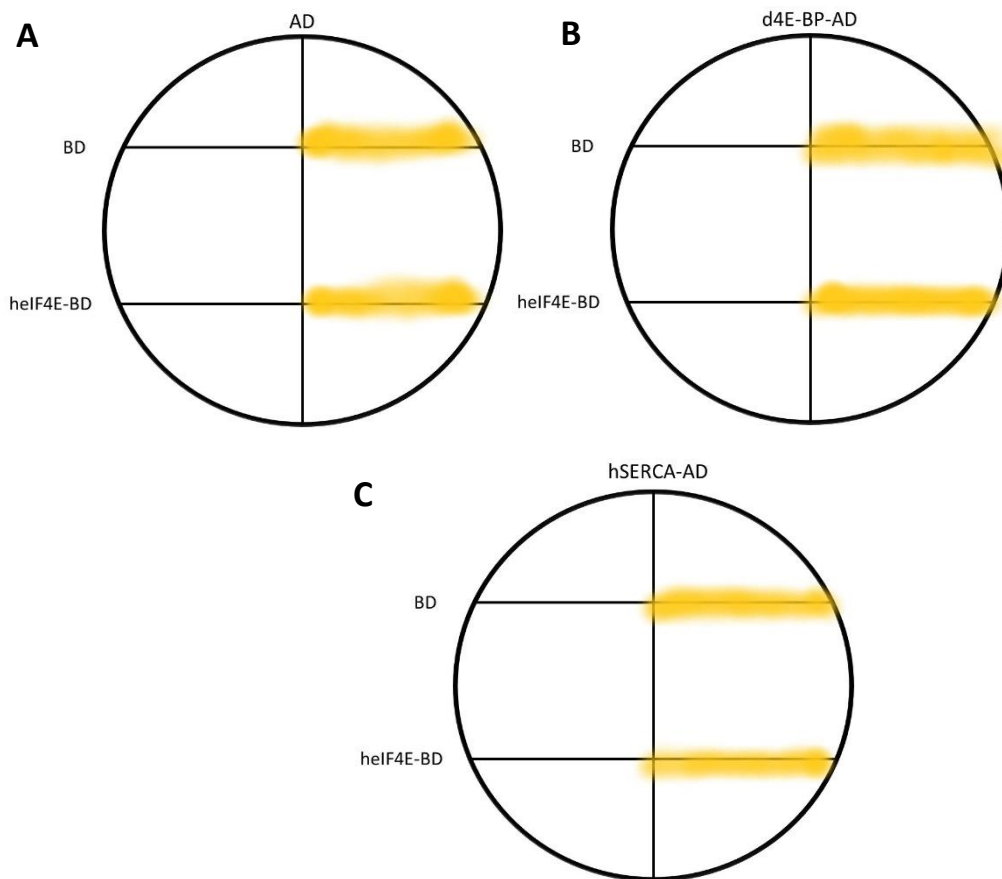


Figura 17. Esquema representativo de las cruces de cepas haploides en medio YPD-agar. Se trazó una línea vertical en la placa con la cepa portadora del dominio de activación solo (A), el dominio de interacción asociado a 4E-BP de *Drosophila melanogaster* (B) y el dominio de activación asociado a SERCA humano (C). Se trazaron líneas horizontales con las cepas portadoras del dominio de unión al ADN (BD), y de la secuencia génica de eIF4E-1 humana asociada al dominio de unión al ADN. Remarcadas en amarillo se encuentran las cepas producto de la cruce que serán diploides.

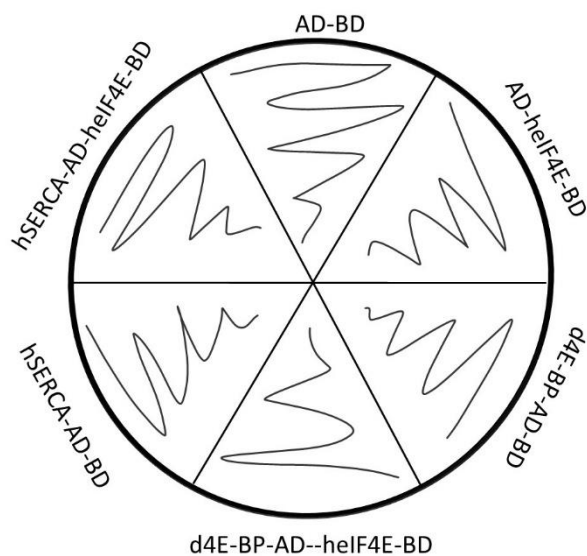


Figura 18. Esquema representativo del crecimiento de las cepas diploides. Se tomaron células diploides producto de los cruzamientos (marcadas en amarillo en la figura 17) y se esparcieron sobre la placa -LW como se muestra en la figura. Se dejaron crecer a 30°C y luego se realizó la réplica en las placas de interacción.

MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA

Para evaluar si la interacción encontrada está determinada por el sitio probable de interacción entre SERCA y eIF4E, se mutaron 3 aminoácidos de este sitio utilizando el Kit QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, 10 rxn (Agilent Technologies #210516). Primero se mutaron las bases T121G, T122C y C124G para dar lugar a los cambios de una leucina por una alanina en la posición 41 y una prolina por una alanina en la posición 42. Los primers utilizados fueron:

T121G_T122C_C124G FOR 5' GAAATACGGACCCAATGAGGCGCCGACTGAGGAAGGAAAGAG 3'

T121G_T122C_C124G REV 5' CTCTTTCCTTCTCAGTCGCCGCTCATTGGGTCCGATTTTC 3'

PROTOCOLO

Buffer	2.5 µl
Template	1 µl (50 ng)
Primer For	1.04 µl (100 ng)
Primer Rev	0.81 µl (100ng)
dNTPs	1 µl
Enzima	1 µl
Agua	17.69 µl

PROGRAMA DE TERMOCICLADO

95 °C	2 min	} 30 ciclos
95 °C	20 seg	
55 °C	30 seg	
65 °C	30 seg/Kb del plásmido (2 min)	

Extensión final a 65 °C, 5 min

Después de la reacción de PCR se agregó 1 µL de DpnI y se dejó incubar a 37 °C por 2 horas. Posteriormente se transformaron XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies). A 50 µl de las células competentes se le agregaron 2 µl β-ME mix y se dejó incubar la mezcla 10 min en hielo. Se agregaron 5 µl del plásmido con el inserto mutado, se dejaron las células 20 min en hielo y luego se les aplicó shock térmico de 42°C durante 30 seg. Luego se recuperaron las bacterias con el agregado de 200 µl de medio LB (anexo IV) y se dejaron en estufa a 37°C con agitación durante 60 min. Posteriormente se *plaquearon* en placa LB-agar-ampicilina y dejaron crecer a 37°C en estufa hasta el día siguiente, momento en que se seleccionaron colonias transformantes y se hicieron crecer en LB-ampicilina a 37°C en agitación por 17 horas. Luego del crecimiento se procedió a la extracción del plásmido por mini-prep con el Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research #D4037) y al corte de éste con las enzimas de restricción flanqueantes del fragmento de SERCA mutante (PstI y Sall) para

identificar las colonias que incorporaron el fragmento. Una vez identificadas se procedió a la preparación de las muestras para secuenciar -3 colonias- por el método de Sanger y corroborar la presencia de las mutaciones dirigidas en la secuencia. Para ello, primero las muestras fueron amplificadas.

PROTOCOLO

Big Dye 1 μ l
Buffer 2 μ l
Molde 2 μ l
Primer M13 0,5 μ l
Agua 4,5 μ l

PROGRAMA DE TERMOCICLADO

96°C 3 min
96 °C 10 seg
55°C 5 seg
60°C 4 min

Luego de la amplificación se lavaron las muestras agregando 2,5 μ l de EDTA 125 mM y 30 μ l de etanol 100%. Se dejaron 30 min a temperatura ambiente, se centrifugaron 30 min a 4000 g a 4°C. Se quitó el sobrenadante y se agregaron al pellet 70 μ l de etanol. Se centrifugaron durante 15 min a 4000 g a 4°C. Se descartó el etanol y se dejaron secar a 37°C. Luego se envió al servicio de secuenciación. Uno de los clones positivos se utilizó para transformar la cepa *a* de *S cerevisiae* como se detalla en el apartado "Transformación de levaduras con las construcciones mutantes".

Por otro lado, luego de la secuenciación, los clones positivos se utilizaron para incorporar la siguiente mutación en los nucleótidos T106G Y A107C para dar lugar al cambio de una tirosina por una alanina en la posición 36. Los primers utilizados fueron:

T106G_A107C_FOR 5' CCAGATCAAGGCTAACCAGAAGAAAGCCGGACCCAATGAG 3'

T106G_A107C_REV 5' CTCATTGGGTCCGGCTTTCTTCTGGTTAGCCTTGATCTGG 3'

El protocolo realizado fue el mismo que se detalló anteriormente.

Se seleccionó un clon doble mutante (incorporó las primeras mutaciones y ésta última) y se utilizó para acoplar al dominio de activación de Gal 4. Para ello se cortaron con las enzimas PstI y Sall tanto los fragmentos mutantes como el vector portador del dominio AD.

Luego de correr y extraer los fragmentos de un gel de agarosa 0,8%, se procedió a la ligación de los fragmentos de SERCA mutante en el vector AD. Para ello se incubaron en una proporción 3:1 y 9:1 (fragmento: vector) con la ligasa T4 y su buffer a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se transformaron 50 μ l de bacterias *E coli* DH5 α competentes con 5 μ l de producto de ligación como se indica en la sección "mutagénesis sitio dirigida". De las colonias que crecieron se extrajeron los plásmidos por mini-prep y cortaron con las enzimas de restricción PstI y Sall para corroborar la inserción del fragmento. Los clones positivos se utilizaron para la transformación de las levaduras de la cepa *a* de *S cerevisiae*.

TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS CON LAS CONSTRUCCIONES MUTANTES

La cepa α es incapaz de crecer en medio carente de leucina, el plásmido AD le confiere la capacidad de hacerlo. Del mismo modo, la cepa α no puede crecer en ausencia de triptófano y es el plásmido BD quien le confiere esta capacidad.

Las levaduras de ambas cepas se hicieron crecer durante 17 horas en medio YPD líquido a 30°C en agitación. Se obtuvieron levaduras competentes luego de lavarlas dos veces con 5 ml de 1x TE+ 0,1M LiOAc con pasos de centrifugación a 3500 rpm durante 5 min entre cada lavado y resuspenderlas en 500 μ l de 1x TE+ 0,1M LiOAc. 50 μ l de las levaduras competentes se incubaron con 10 μ l de ADN de salmón previamente hervido durante 5 min, 5 μ l del plásmido correspondiente y 300 μ l de PEG (Anexo V) durante 30 min a 30°C en agitación. Luego se les aplicó un shock térmico durante 20 min a 42°C. Se centrifugaron a 3000 rpm por 15 seg, se retiró el sobrenadante cuidadosamente con tip y lavaron dos veces con 500 μ l de 1x TE centrifugando entre lavados a 3000 rpm por 15 seg. Por último, se resuspendieron en 100 μ l de 1x TE y plaquearon en placas con medio sin leucina (-L) y sin triptófano (-W) las cepas α y α , respectivamente. Como control se utilizaron levaduras transformadas de la misma manera sin el plásmido.

Las levaduras que crecieron en los medios restrictivos incorporaron el plásmido correspondiente y fueron utilizadas para los ensayos de doble híbrido posteriores.

RT-PCR DE CORAZÓN

Para evaluar los niveles de expresión de la isoforma 4 de eIF4E se aislaron 70 corazones y se extrajo ARN por el método de TRIzol (Thermo Fisher #15596026) según indicaciones del fabricante. Luego se procedió a la amplificación por PCR con el kit OneStep RT-PCR de Qiagen. Este kit posee tanto una retrotranscriptasa como ADN polimerasa, permitiendo realizar la retrotranscripción del ARN y posterior amplificación en un único paso.

Los primers utilizados fueron:

eIF4E-4 Fwd: 5' CCGTTATCAACTTGCGCGG 3'

eIF4E-4 Rev: 5' CCCTGCTTGACATAGTGTC 3'

Tubulina Fwd: 5' ATCAACTACCAGCCTCCCAC 3'

Tubulina Rev: 5' TCCTCCATCCCCTCCCAAC 3'

PROTOCOLO

Solución 5x 5 μ l

Solución Q 5 μ l

dNTPs (10 mM) 1 μ l

Primer Fw 1 μ l

Primer Rv 1 μ l

Mix enzimas 1 μ l

Molde 5 μ l

Agua hasta 25 μ l

PROGRAMA DE TERMOCICLADO

Transcripción reversa	30'	55°C	
Desnaturalización de la			
Retrotranscriptasa	15'	95°C	
Desnaturalización	30''	94°C	} 40 ciclos
Annealing	1'	55°C	
Extensión	30''	72°C	
Extensión final	5'	72°C	

Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa 2% en TAE 1X a 100 V durante 90 min. Se utilizó Gel Red como intercalante y se reveló con transiluminador UV en ChemiDoc™ XRS+.

WESTERN BLOT

Se aislaron 15 corazones de cada una de las líneas de interés y se lisaron en buffer de carga 8 M urea (Anexo VI). Luego, las muestras fueron sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970. Anexo VII) y posterior transferencia a membrana de PVDF previamente activada con metanol. La transferencia se realizó durante 60 min a 60 voltios. Una vez transferidas las proteínas a la membrana se bloqueó con leche al 5% en Tris Buffer Salino con 1% Tween (T-TBS 1%) durante una hora a temperatura ambiente en agitación. La incubación con anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario usado fue anti-dSERCA provisto por el Dr. Sanyal preparado en una proporción 1:10000 en 1% leche en T-TBS 1%. Al día siguiente tras quitarse el anticuerpo primario se lavó la membrana 3 veces con T-TBS 1% durante 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP (Santa Cruz Biotech) 1:10000 en 1% leche en T-TBS 1% durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Tras 3 lavados de 10 min cada uno con T-TBS 1% se procedió al revelado de la membrana en ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad). El análisis de las imágenes se realizó con el software del equipo llamado Quantity One.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se aislaron 300 corazones y se procesaron en buffer de RIPA (Anexo VIII) sonicándolos durante 30 segundos a 65 W/L. 15 µg de la muestra obtenida fueron sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (Laemmli, 1970). Se dejó correr la muestra un centímetro y esta porción del gel fue cortada y tratada para su posterior incorporación al espectrómetro de masas. El procesamiento siguiente de la muestra estuvo a cargo del personal del CEQUBIEM-UBA quienes proveyeron sus servicios de espectrometría de masas. Las muestras fueron digeridas con tripsina. Se analizaron por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permitió en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. Se realizaron dos tipos de análisis espectrométricos:

- *Data Dependent Acquisition (DDA)*: según ciertos criterios de selectividad, basados en la abundancia de los iones que aparecen a cada tiempo de retención del nano HPLC, el software del espectrómetro de masa determina qué relación masa/carga (m/z) fragmentar y realizar MSMS.

- *Targeted Acquisition*: se configuró un listado de m/z que surge de la digestión teórica de eIF4E-4 y de los resultados obtenidos experimentalmente por el servicio o que estén en la literatura para esta proteína y el espectrómetro de masa solo fragmenta y realiza MSMS de esos m/z.

La ionización de las muestras se realiza por electrospray utilizando un ionizador por Electro Spray marca Thermo Scientific, modelo EASY-SPRAY. El voltaje del Spray fue de 2,5kV. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa *Proteome Discoverer*. Éste es un motor de búsqueda en el cual el usuario debe seleccionar la base de datos y ciertas características que se vinculan con la forma en que fue tratada la muestra. En base a esta información y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indica qué proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (High/Medium/Low) y el usuario decide con cual nivel de confianza trabajar, siendo siempre preferible utilizar solo los péptidos de nivel High. Finalizada la búsqueda con el *Proteome Discoverer*, los datos se exportaron a Excel para proceder con la normalización manual de las áreas de cada proteína identificada. Los resultados obtenidos se procesaron con el programa libre *Perseus*.

RESULTADOS

1. Modulación génica de 4E-BP

Dado que la frecuencia cardíaca influye en el ciclado del calcio intracelular en el corazón (114) el primer paso fue evaluar si existe una diferencia significativa entre las frecuencias cardíacas de las líneas estudiadas. Como se puede observar en la figura 19, no existen diferencias significativas entre las frecuencias cardíacas de las líneas, por lo que los efectos observados en el ciclado de calcio que se muestran más adelante puedan adjudicarse a las características propias de las etapas del ciclado intracelular de este ion y no a una variación en la frecuencia. Los resultados indican que no hay diferencia significativa entre los distintos grupos.

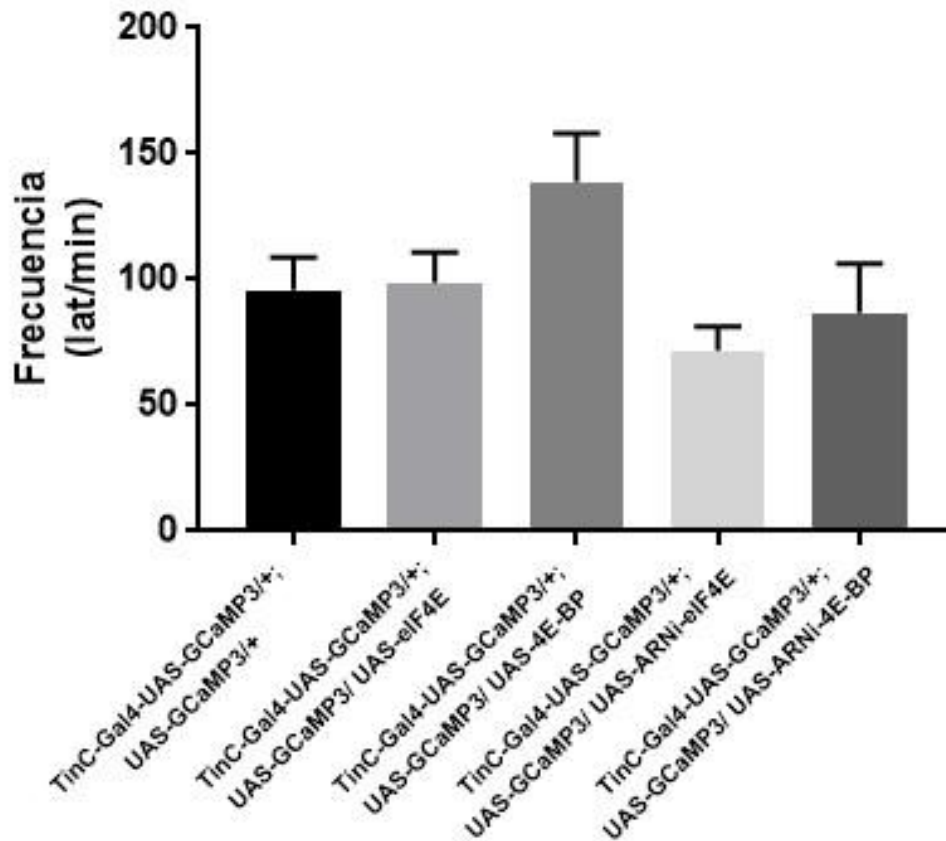


Figura 19: Frecuencia cardíaca de moscas de 7 días de edad. *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/+* n=7; *TinC-Gal4-GCaMP3/+; UAS-elf4E/+* n= 4; *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-4E-BP/+* n=7; *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-ARNi-elf4E/+* n=5; *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-ARNi-4E-BP* n=4. ANOVA de una vía con test de Tukey.

1.1. Rol de 4E-BP en el ciclado del calcio intracelular

Luego de la obtención y procesamiento (Figura 20) de los registros de fluorescencia adquiridos en el microscopio confocal procedimos a evaluar los efectos de la variación en los niveles de expresión de una de nuestras proteínas de interés, 4E-BP. La línea transgénica que sobreexpresa el gen de 4E-BP presenta una mayor amplitud del transitorio de calcio intracelular respecto a la línea control y a la línea que tiene reducido los niveles de 4E-BP mediante ARN de interferencia. Este aumento fue acompañado por un incremento en las velocidades de contracción (derivada positiva) y relajación (derivada negativa) del transitorio de calcio (Figura 21) indicando un posible efecto beneficioso de la sobreexpresión de 4E-BP sobre la contractilidad cardíaca de *Drosophila melanogaster*.

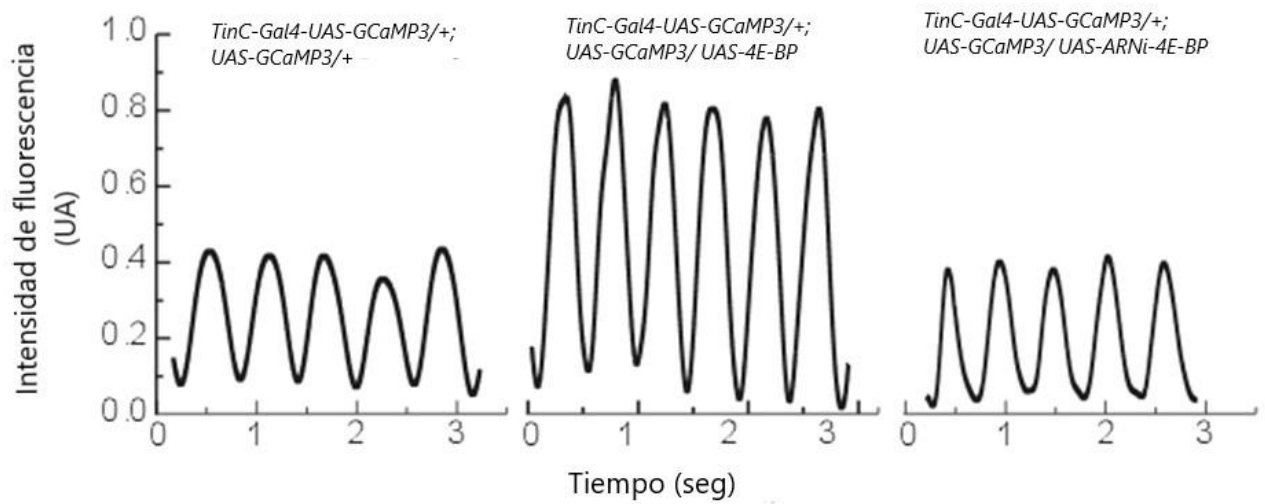
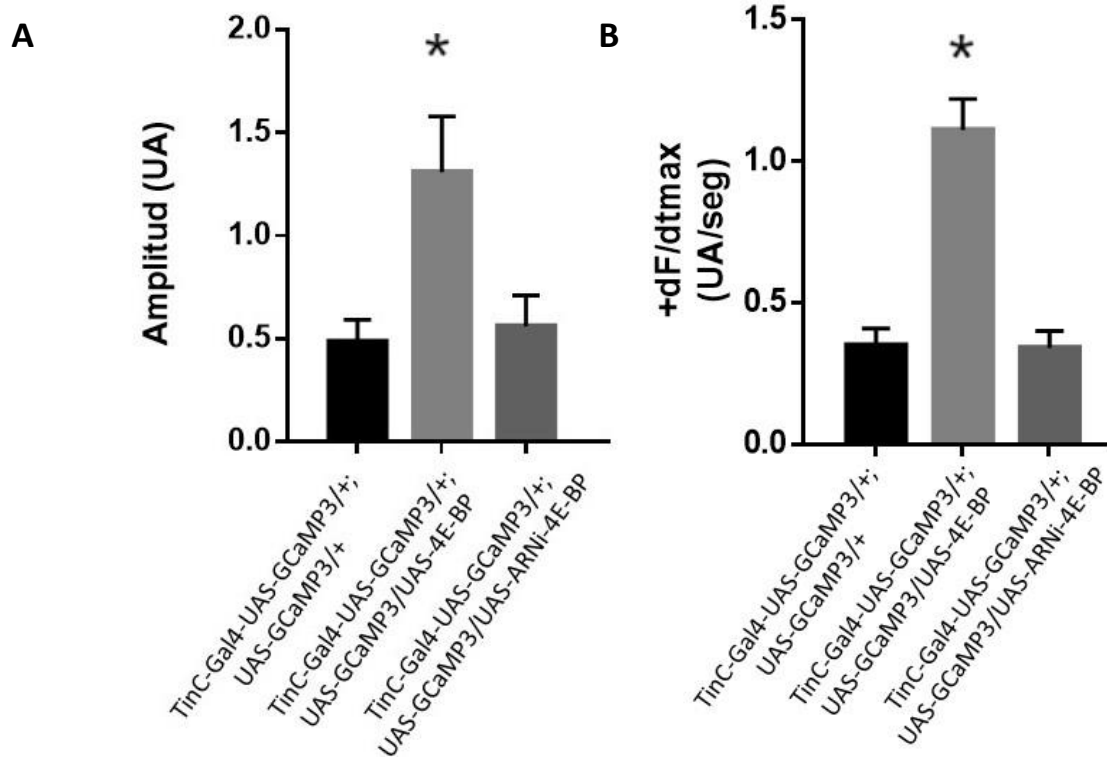


Figura 20. La sobreexpresión de 4E-BP aumenta el transitorio de Ca^{2+} . Transitorios de calcio representativos de las líneas control (izquierda), transgénica que sobreexpresa 4E-BP (centro) y transgénica que expresa un ARN interferente contra 4E-BP (derecha).



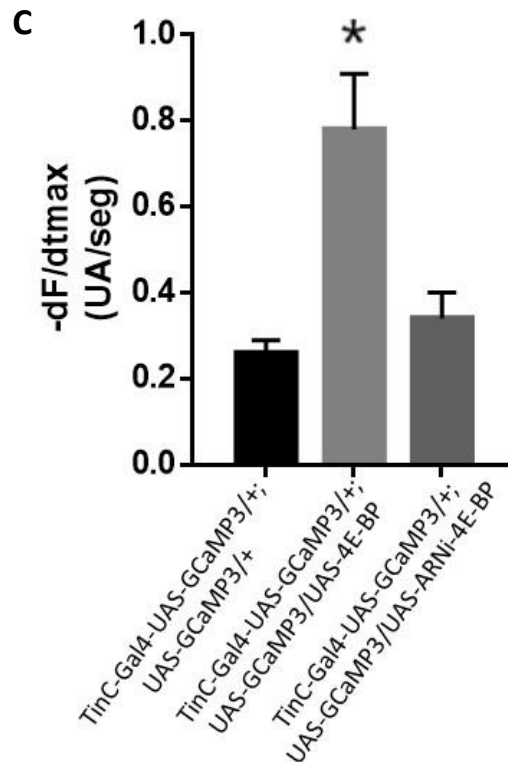


Figura 21. La sobreexpresión de 4E-BP aumenta la amplitud y la velocidad de subida y bajada del transitorio de Ca^{2+} . Valores promedio de la amplitud del transitorio de calcio intracelular (A), velocidad máxima de contracción (B) y velocidad máxima de relajación (C) de las líneas control, con sobreexpresión de 4E-BP y expresión de ARN interferente contra 4E-BP. ANOVA de una vía con test de Tukey. N: 7; 7 y 4, respectivamente. $P < 0,05$ respecto a control y a ARNi-4E-BP.

Con el fin de evaluar el contenido de calcio del retículo sarcoplasmático se administró un pulso de cafeína (Figura 22), estrategia ampliamente utilizada experimentalmente en mamíferos. Esta intervención permite también calcular la fracción de liberación del retículo sarcoplasmático y la actividad de la bomba calcio ATPasa (SERCA). Esto es posible dado que la cafeína aumenta la probabilidad de apertura de los canales de rianodina (RyR2) del retículo sarcoplasmático, provocando así una liberación del contenido total de calcio del retículo. A su vez, inhibe a la bomba SERCA. Evaluando la constante de relajación (Tau) del transitorio producido por la cafeína (donde solo participa el NCX de la membrana plasmática), y el Tau del transitorio de calcio (determinado tanto por la actividad del NCX como de la SERCA) se puede inferir la actividad de la bomba SERCA. Ésta resulta de la sustracción entre la inversa del Tau del transitorio y la inversa del Tau del pulso de cafeína.

Los resultados arrojados indicaron que la línea portadora de la sobreexpresión de 4E-BP presenta una mayor liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático y una tendencia a un aumento de la carga del retículo sarcoplasmático ($p = 0,27$) (Figura 23). La actividad de la SERCA se vio aumentada con respecto al control, acompañado este efecto de una disminución de la constante de relajación (Tau) en relación tanto al control como a la línea que presenta un silenciamiento de 4E-BP. Este aumento en la velocidad de relajación puede deberse a la mayor actividad registrada de la SERCA (Figura 24). Dada la mayor actividad de la SERCA, éste puede ser el motivo por el cual la carga de Ca^{2+} tiende a aumentar, llevando esto a una mayor fracción de liberación de calcio.

La línea que porta el ARN interferente contra 4E-BP se comporta en todos los parámetros de manera similar a la línea control. Esto puede deberse a que la reducción de los niveles de 4E-BP no afecta al ciclado del calcio o, a que la reducción con el ARN interferente no es completamente suficiente para desenmascarar sus efectos, por lo que esta línea se comporta como si fuera la línea control.

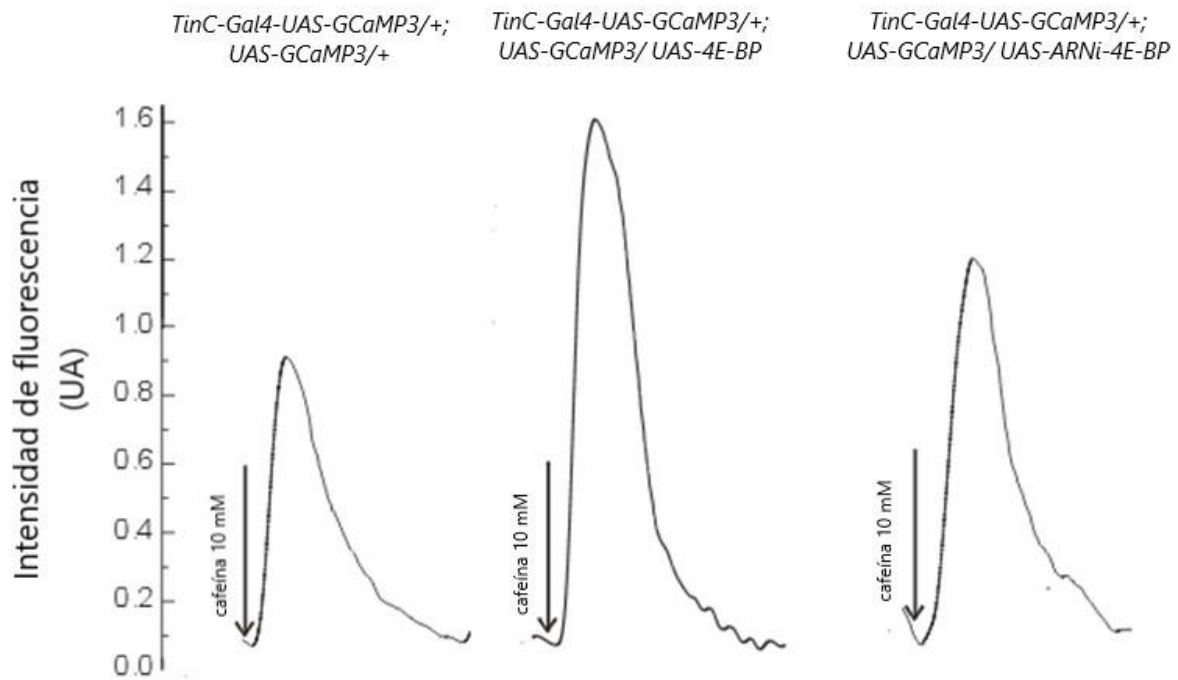


Figura 22. La sobreexpresión de 4E-BP aumenta el transitorio de Ca^{2+} producido por un pulso de cafeína. Transitorio de calcio inducido por cafeína representativo de cada una de las líneas transgénicas estudiadas, control (izquierda), sobreexpresión de 4E-BP (centro) e interferencia de 4E-BP (derecha).

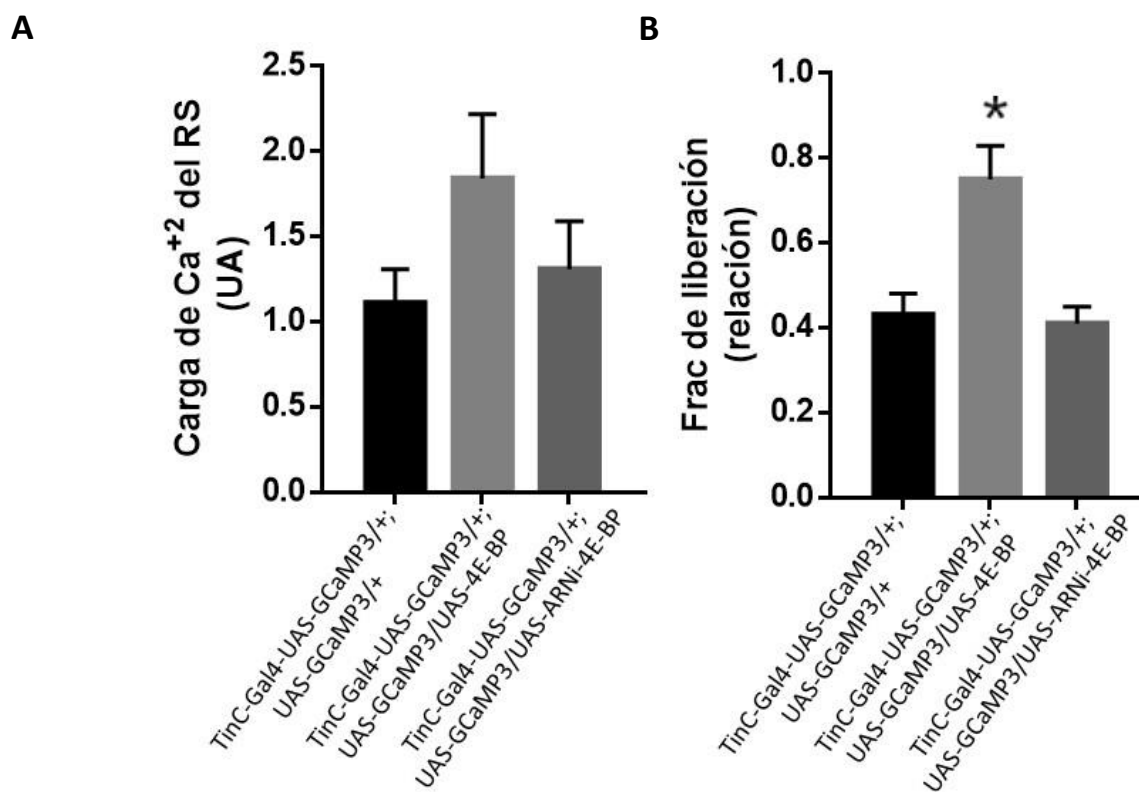


Figura 23: La sobreexpresión de 4E-BP aumenta el contenido de Ca^{2+} del RS y la fracción de liberación de Ca^{2+} . Valores promedio de carga de calcio del retículo sarcoplasmático y fracción de liberación de las líneas control, la que sobreexpresa 4E-BP y la que presenta interferencia de 4E-BP. La línea que sobreexpresa 4E-BP exhibe una clara tendencia a aumentar la carga de Ca^{2+} del RS y una mayor fracción de liberación respecto a las otras 2 líneas analizadas. N=7, 7 y 4 respectivamente. ANOVA de una vía con test de Tukey. * $P < 0,05$ respecto a control y a ARNi-4E-BP.

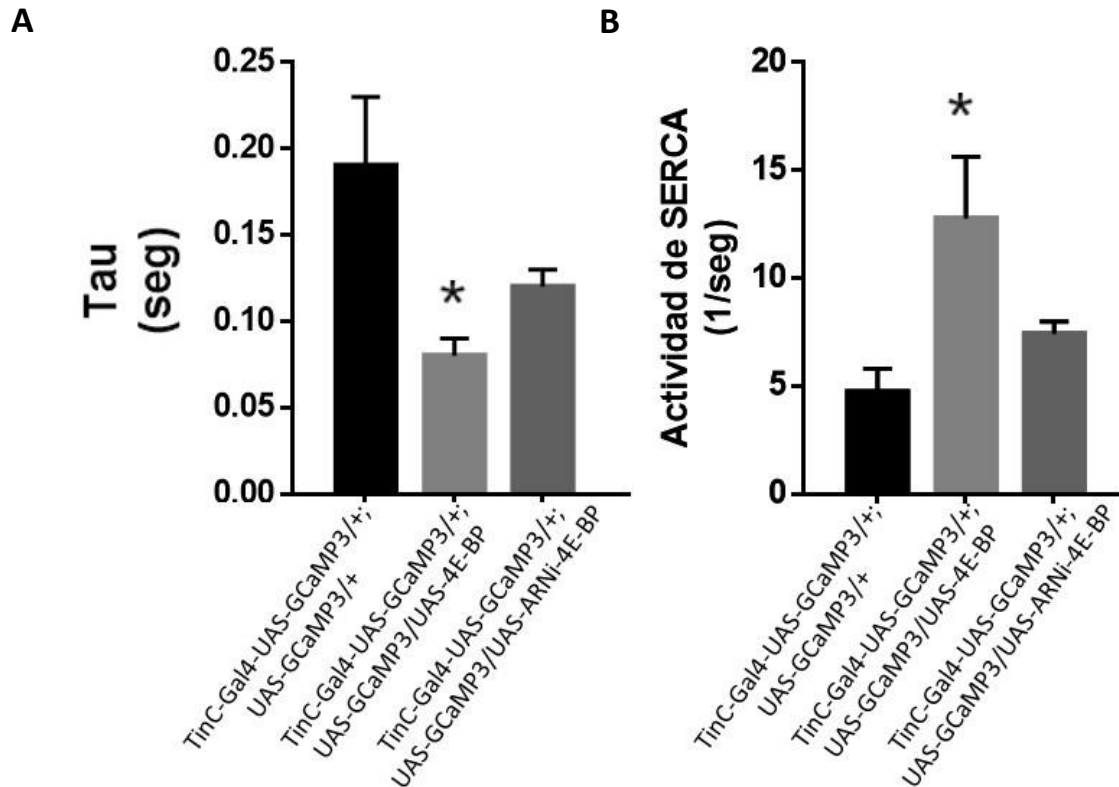


Figura 24: La sobreexpresión de 4E-BP disminuye el tiempo de relajación y aumenta la actividad de la SERCA. Tau (A) y actividad de la SERCA (B) promedios de las líneas control, UAS-4E-BP y UAS-ARNi-4E-BP. La línea portadora de la sobreexpresión de 4E-BP presenta una disminución en la constante de relajación Tau y un aumento de la actividad de la bomba SERCA respecto a las otras líneas analizadas. N=7; n=7 y n=4 respectivamente. ANOVA de una vía con test de Tukey. * P < 0,05 respecto a control y a ARNi-4E-BP.

1.2. Relación entre envejecimiento cardíaco y acción de 4E-BP sobre el ciclado del calcio intracelular

Dado que la sobreexpresión de 4E-BP mostró un efecto inotrópico positivo a edades tempranas del adulto (7 días), nos propusimos estudiar si este efecto se mantiene durante el envejecimiento. Para ello se evaluaron los mismos parámetros en moscas transgénicas que sobreexpresan 4E-BP en adultos de 40 días de edad. El grupo de moscas que expresan el ARN interferente contra 4E-BP no sobrevivió hasta la edad experimental planteada (40 días), indicando un posible efecto de la interferencia en la expectativa de vida. Por esto, esta línea no se incluyó en este análisis. La línea control mostró un patrón de envejecimiento típico, experimentando una disminución en la frecuencia cardíaca y en la amplitud del transitorio de Ca^{+2} junto con una reducción en las velocidades de contracción y relajación y en la constante de tiempo relajación Tau como mostramos en trabajos previos (115).

Al evaluar la frecuencia cardíaca de la línea con sobreexpresión de 4E-BP se observó que el envejecimiento produce un aumento con respecto a las moscas control. Éste se vio acompañado por un incremento en la amplitud del transitorio de Ca^{+2} (Figura 25).

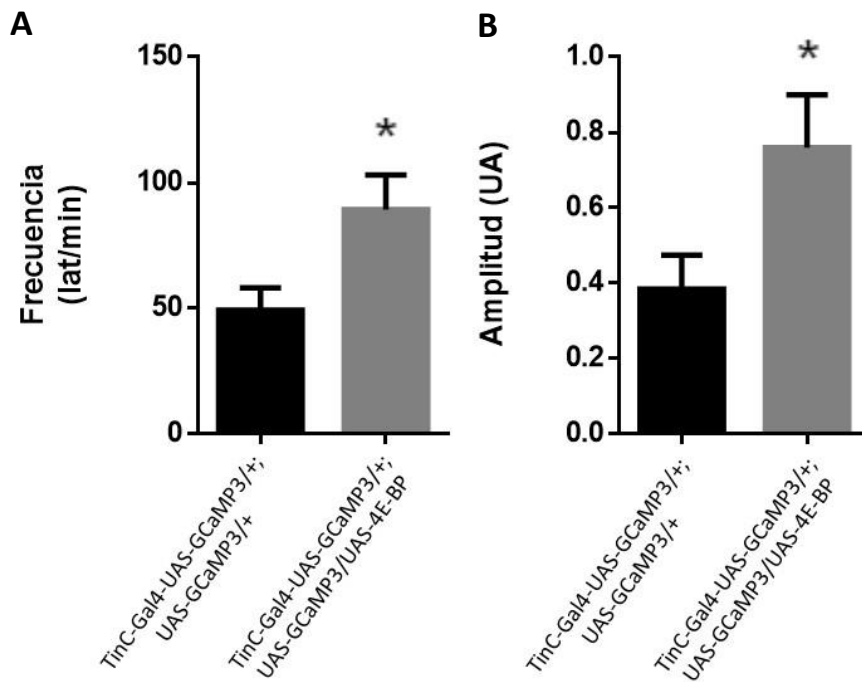


Figura 25: La sobreexpresión de 4E-BP aumenta la frecuencia cardíaca y la amplitud del transitorio de Ca^{2+} en corazones de moscas envejecidas. Frecuencia cardíaca y amplitud de moscas control y de aquellas que sobreexpresan 4E-BP a los 40 días de edad. N: 6 y 6. Test de Student. * $p < 0,05$.

La velocidad de subida del transitorio de Ca^{2+} manifestó un aumento, mientras que la de relajación presentó una tendencia a aumentar aunque no significativa ($p = 0,91$) en la línea que sobreexpresa 4E-BP a los 40 días con respecto al control (Figura 26).

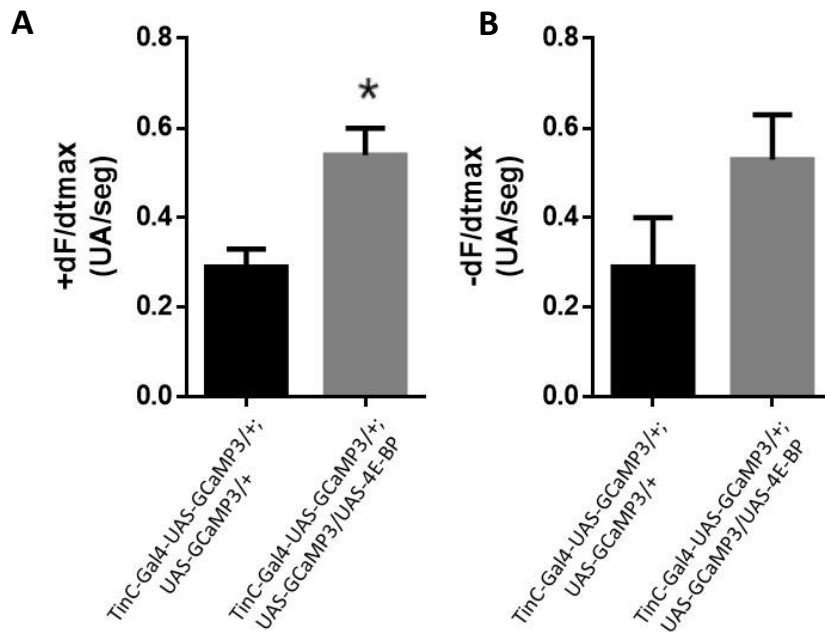


Figura 26: La sobreexpresión de 4E-BP aumenta la velocidad de subida y tiende a aumentar la de relajación del transitorio de Ca^{2+} en corazones de moscas envejecidas. Velocidades de contracción (izquierda) y relajación (derecha) del transitorio de calcio de moscas control y con sobreexpresión de 4E-BP a los 40 días de edad. N: 6 y 6. Test de Student. * $p < 0,05$

En un subgrupo de moscas se estudiaron los parámetros de relajación. Este subgrupo estuvo integrado por aquellas moscas que respondieron a la cafeína de manera tal que se pudieran analizar todos los datos de interés. Así encontramos que el tiempo de relajación (Tau) y la actividad de la SERCA, que presentaba una disminución y un aumento, respectivamente, a los 7 días de edad en las moscas que sobreexpresan 4E-BP, no cambian significativamente con el envejecimiento (Figura 27). Y los datos de carga de calcio del retículo sarcoplasmático y la fracción de liberación permanecieron inalterables entre líneas durante el envejecimiento, si bien ambos parámetros mostraron una tendencia a aumentar (valores p de 0,08 y 0,09, respectivamente) (Figura 28).

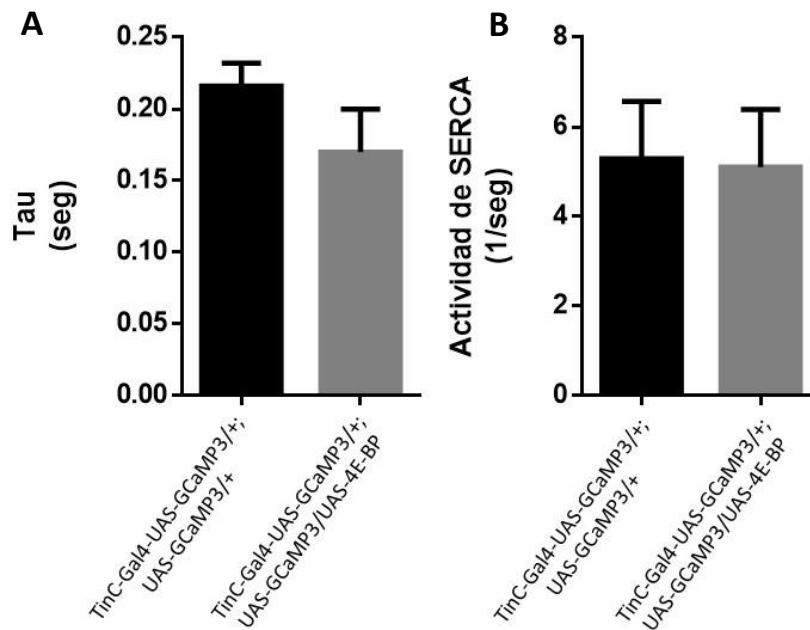


Figura 27: La sobreexpresión de 4E-BP no modifica la relajación ni la actividad de la SERCA2a en moscas envejecidas. Constante de relajación Tau (izquierda) y actividad de la SERCA (derecha) de moscas control y con sobreexpresión de 4E-BP a los 40 días. N tau: 6 y 6; n actividad de SERCA: 4 y 6. Test de Student.

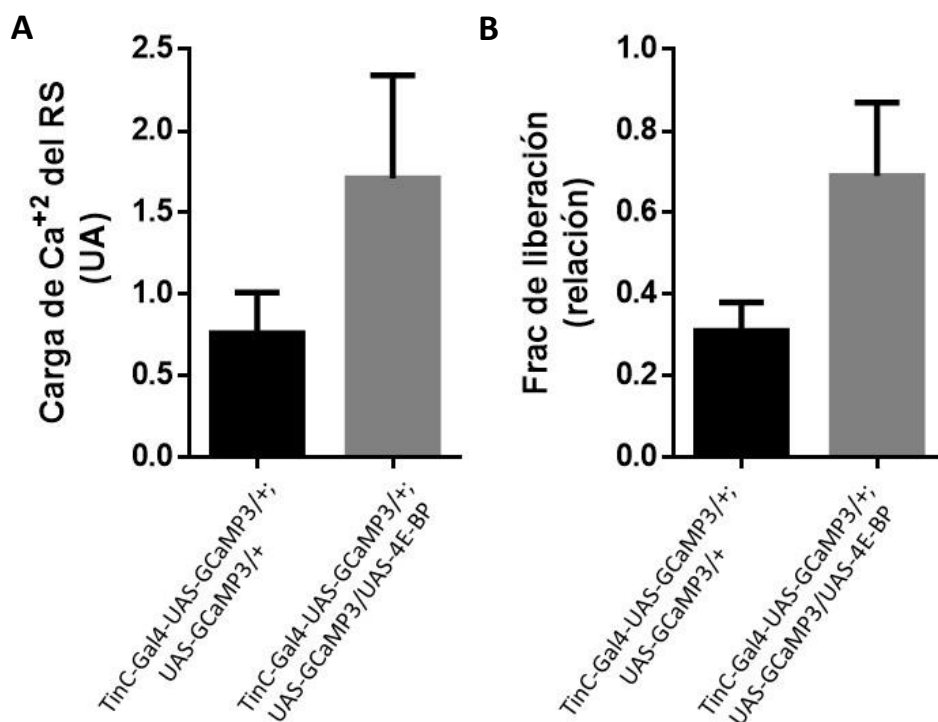


Figura 28: La sobreexpresión de 4E-BP a los 40 días tiende a aumentar la carga de Ca⁺² del RS y la fracción de liberación. Carga del retículo sarcoplasmático y fracción de liberación de moscas control y con sobreexpresión de 4E-BP a los 40 días. N: 4 y 6. Test de Student.

En conjunto, estos resultados indican que los efectos beneficiosos de sobreexpresar 4E-BP a edades tempranas se manifiestan parcialmente durante el envejecimiento. En las moscas envejecidas la actividad de la SERCA y la constante de tiempo de relajación Tau que se encontraban modificadas a los 7 días de edad no muestran diferencias a los 40 días cuando se sobreexpresa 4E-BP. Estos resultados pueden explicar que la carga de Ca⁺² del RS y la fracción de liberación no se encuentren alteradas a los 40 días de edad.

La línea que sobreexpresa 4E-BP muestra una función cardíaca mejorada a los 40 días de edad. Esto puede concluirse al observar una mayor amplitud del transitorio de Ca⁺² de esta línea respecto a la línea control, acompañada de una mayor velocidad de contracción y relajación.

2. Modulación génica de eIF4E

2.1. *Rol de eIF4E en el ciclado del calcio intracelular*

El mismo análisis se realizó para las líneas con niveles diferenciales de expresión del gen eIF4E (sobreexpresión de eIF4E o de su ARN de interferencia). Se observó un aumento de la amplitud del transitorio de calcio intracelular en la línea en la que eIF4E se encuentra interferido. Este aumento se vio acompañado por un aumento en las velocidades máximas de contracción (derivada positiva) y de relajación (derivada negativa) del transitorio de Ca⁺² (Figura 30) con respecto a las otras 2 líneas analizadas.

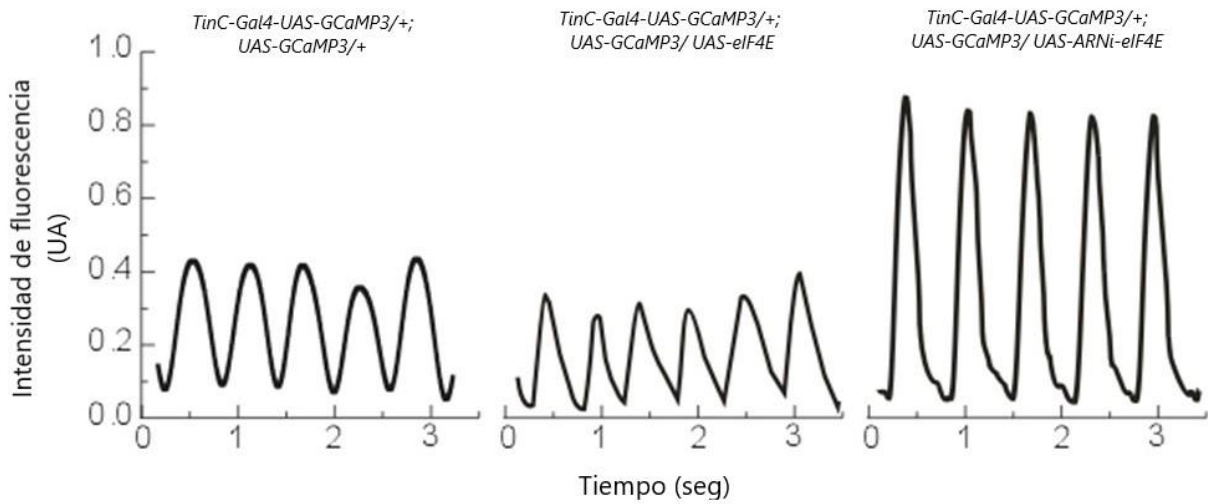
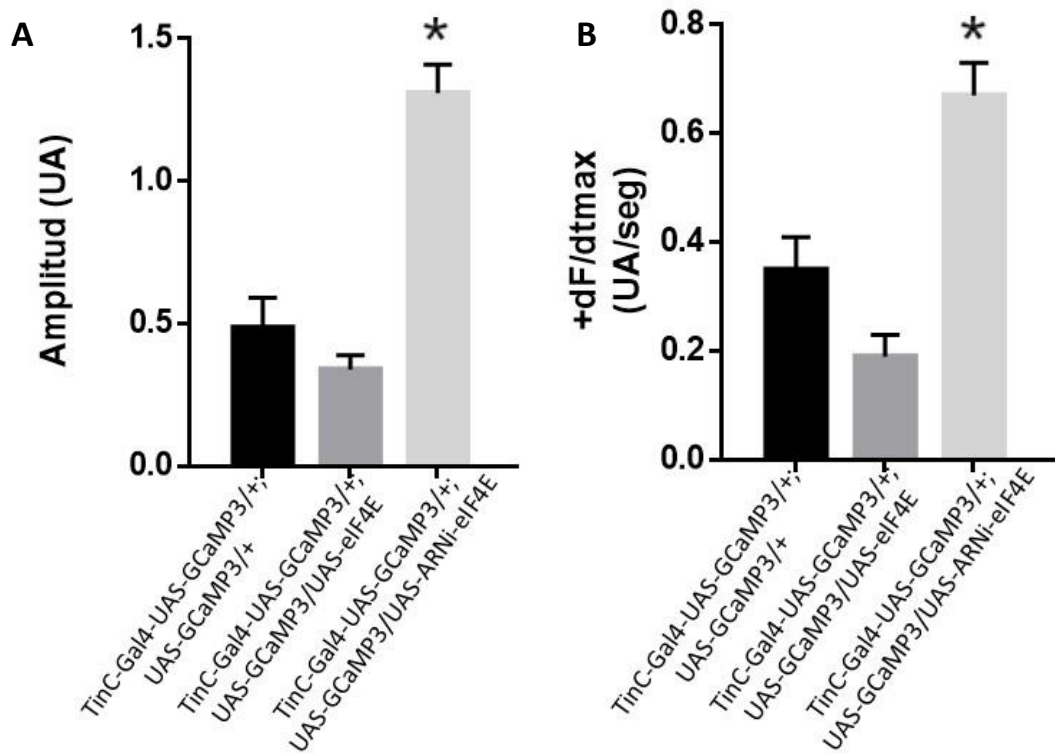


Figura 29. La interferencia de eIF4E aumenta el transitorio de Ca^{2+} . Trazos representativos de los transitorios de calcio de las líneas control (izquierda), transgénica que sobreexpresa eIF4E (centro) y transgénica que expresa un ARN interferente contra eIF4E.



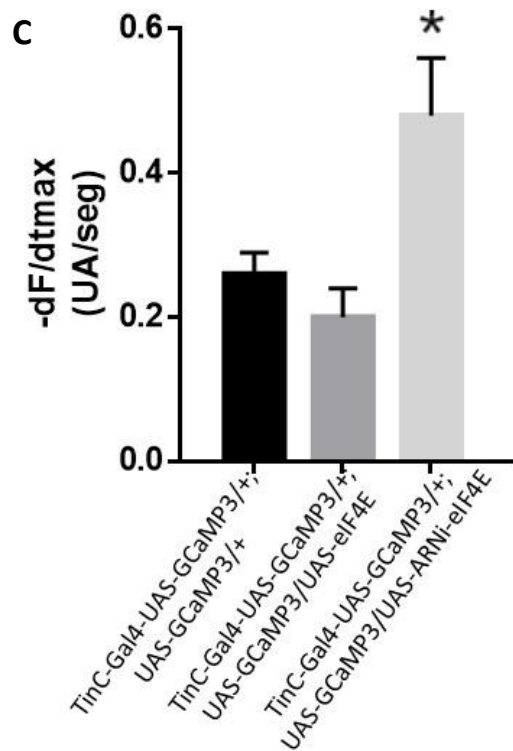


Figura 30. La interferencia de eIF4E aumenta el transitorio de Ca^{+2} y las velocidades de subida y relajación del transitorio de Ca^{+2} Valores promedio de la amplitud del transitorio de calcio intracelular (A), velocidad máxima de contracción (B) y velocidad máxima de relajación (C) de las líneas control, con sobreexpresión de eIF4E y expresión de ARN interferente contra eIF4E. ANOVA de una vía con test de Tukey. N: 7; 5 y 4, respectivamente. *P < 0,05 vs. Control y sobreexpresión de eIF4E.

Al momento de evaluar los parámetros que se desprenden de la intervención con cafeína (Figura 31) se encontró que la línea que posee el ARN interferente contra eIF4E presenta una mayor carga de Ca^{+2} del retículo sarcoplasmático sin experimentar cambios en la fracción de liberación. Esta última presentó una tendencia a aumentar ($p=0,35$) en la línea que sobreexpresa eIF4E. Por otro lado la actividad de la SERCA se vio afectada por la sobreexpresión de eIF4E y no por su interferencia. Este aumento se vio acompañado por una tendencia a la reducción en la constante de relajación Tau de la línea que sobreexpresa eIF4E (Figuras 32 y 33).

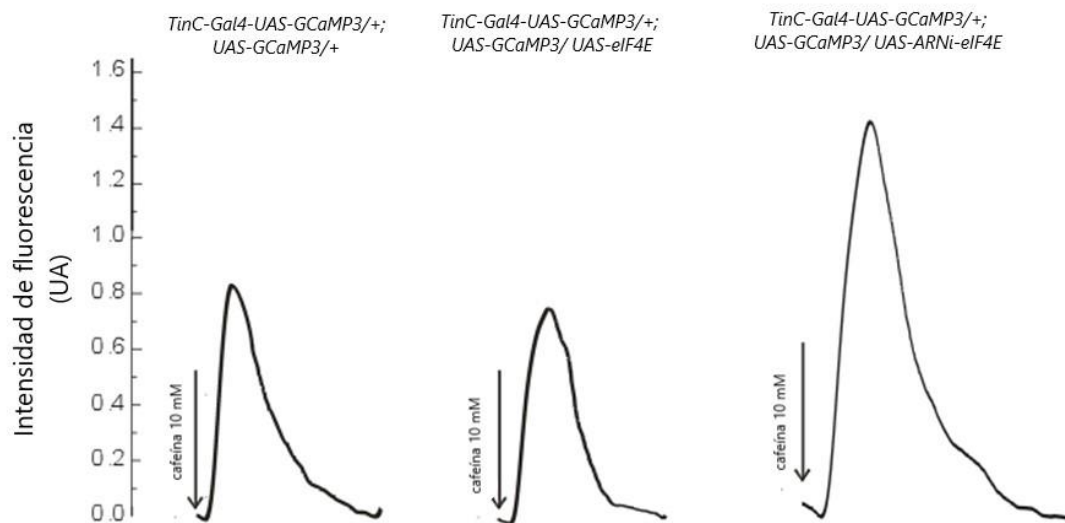


Figura 31. La interferencia de eIF4E aumenta el transitorio de Ca^{+2} del pulso de cafeína. Transitorio de calcio provocado por cafeína representativo de cada una de las líneas transgénicas estudiadas, control (izquierda), sobreexpresión de eIF4E (centro) e interferencia de eIF4E (derecha).

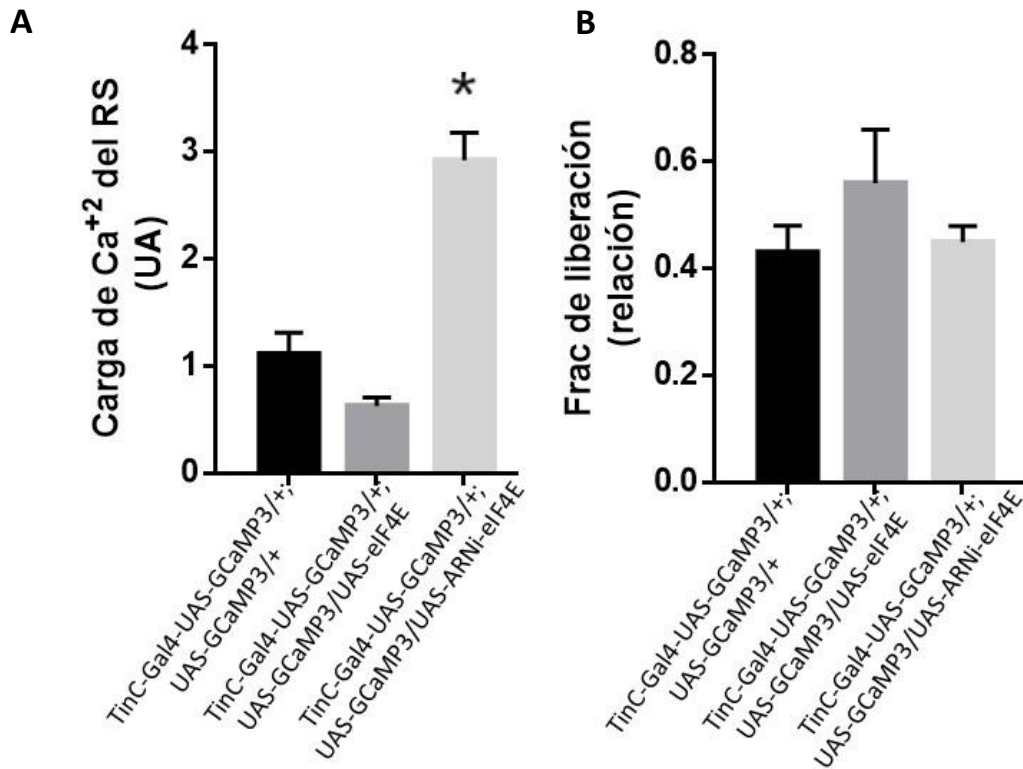


Figura 32: La interferencia de eIF4E aumenta el contenido de Ca^{+2} del RS pero no la fracción de liberación de Ca^{+2} . Valores promedio de carga de calcio del retículo sarcoplasmático (A) y fracción de liberación (B) de las líneas control, la que sobreexpresa eIF4E y la que presenta interferencia de eIF4E. La línea que expresa un ARNi contra eIF4E presenta una mayor carga de calcio del retículo respecto a las otras dos líneas analizadas, mientras que la fracción de liberación es igual en las tres líneas. N=7, 5 y 4 respectivamente. ANOVA de una vía con test de Tukey. *P < 0,05 con vs. Control y sobreexpresión de eIF4E

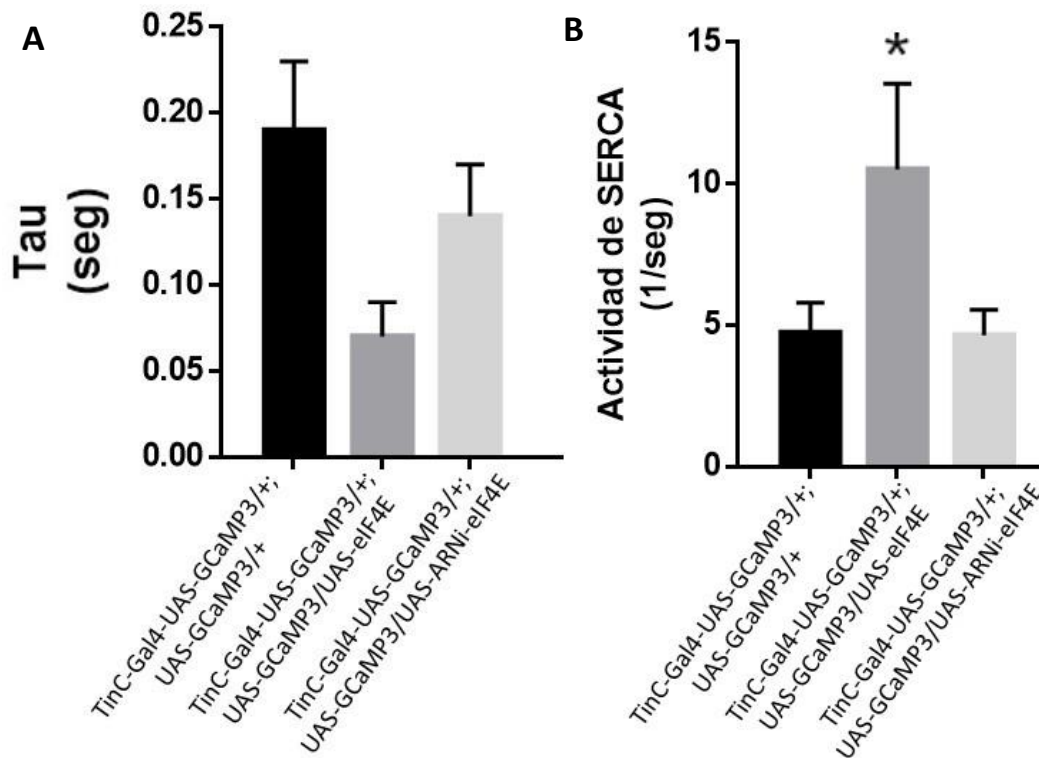


Figura 33: Tau (A) y actividad de la SERCA (B) promedios de las líneas control, UAS-eIF4E y UAS-ARNi-eIF4E. La línea portadora de la sobreexpresión de eIF4E presenta una tendencia no significativa a la disminución en la constante de relajación Tau y un aumento de la actividad de la bomba SERCA respecto a las otras líneas analizadas. N=7; n=5 y n=4 respectivamente. ANOVA de una vía con test de Tukey. P < 0,05 vs. control y ARNi-4E-BP

En conjunto estos resultados indican que en varios parámetros, la interferencia de eIF4E se comporta de manera similar a la sobreexpresión de 4E-BP. Teniendo en cuenta que sobreexpresar 4E-BP podría equivaler a reducir los niveles de eIF4E libres, estos datos nos muestran que estas moléculas, dependiendo de sus niveles, estarían contribuyendo al ciclado del Ca^{+2} intracelular en el corazón de *Drosophila melanogaster*.

2.2. Relación entre envejecimiento cardíaco y acción de eIF4E sobre el ciclado del calcio intracelular

Dado que la línea que presenta una reducción a nivel cardíaco de eIF4E no sobrevive hasta la edad planteada para realizar los estudios de envejecimiento, hecho que también ocurre con la línea que expresa un ARN interferente contra 4E-BP indicando un posible efecto de la activación del sistema de interferencia en la viabilidad con el correr del tiempo en las líneas, nos enfocamos en estudiar los efectos de la sobreexpresión de eIF4E en el tejido cardíaco con el paso del tiempo.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto la frecuencia cardíaca como la amplitud del transitorio de Ca^{+2} intracelular no se vieron afectados por el envejecimiento (Figura 34). A su vez, las velocidades de contracción y relajación que no presentaron cambios entre las líneas a los 7 días tampoco lo hicieron a los 40 (Figura 35).

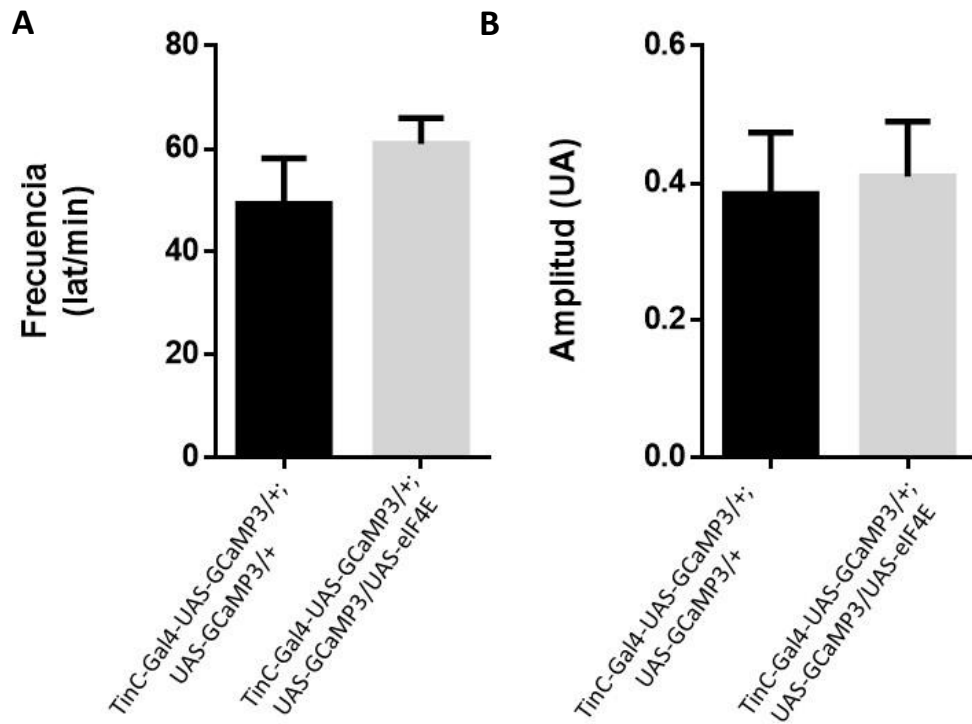


Figura 34: La sobreexpresión de eIF4E no produce cambios en la frecuencia cardíaca y el transitorio de Ca²⁺ en moscas envejecidas. Frecuencia cardíaca (A) y la amplitud del transitorio de Ca²⁺ (B) de moscas control y de aquellas que sobreexpresan eIF4E a los 40 días. N: 6 y 5. Test de Student.

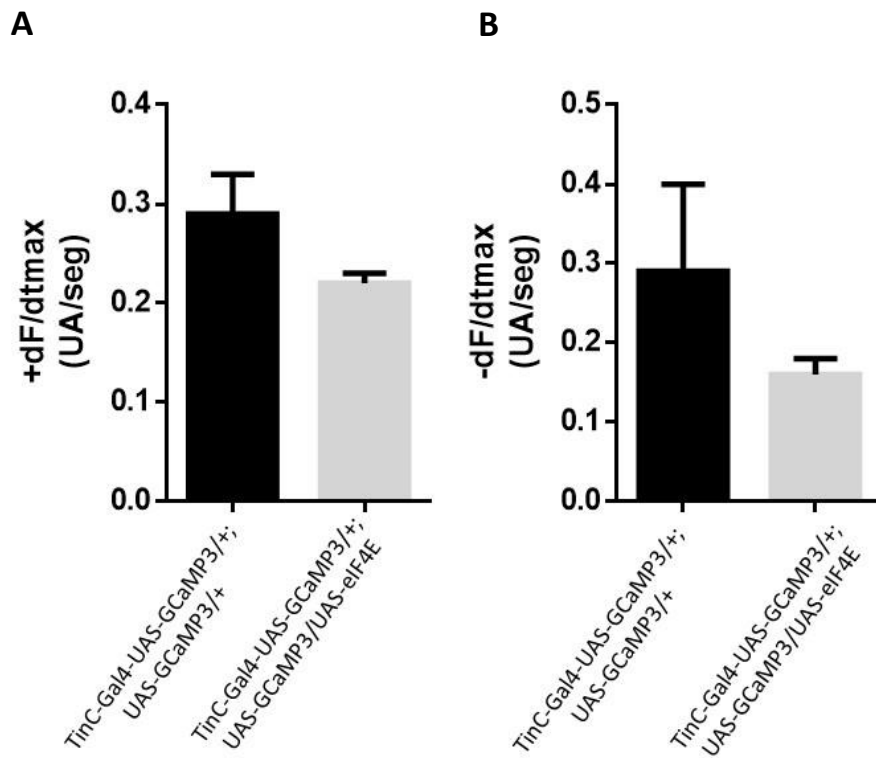


Figura 35: La sobreexpresión de eIF4E no produjo cambios en las velocidades de subida y relajación del transitorio de Ca²⁺ en moscas envejecidas. Velocidades de contracción (A) y relajación (B) del transitorio de calcio de moscas control y con sobreexpresión de eIF4E a los 40 días. N: 6 y 4. Test de Student.

Nuevamente, para el análisis de los datos arrojados por el pulso de cafeína se seleccionaron aquellas moscas que presentaron todos los parámetros medibles. Como resultado se obtuvo que la constante de tiempo de relajación Tau no se modifica al sobreexpresar eIF4E y, que el aumento de la actividad de la SERCA que se observa a los 7 días en la línea que sobreexpresa eIF4E desaparece con el envejecimiento, teniendo la línea con sobreexpresión de eIF4E a los 40 días de edad igual actividad de SERCA que la línea control (Figura 36).

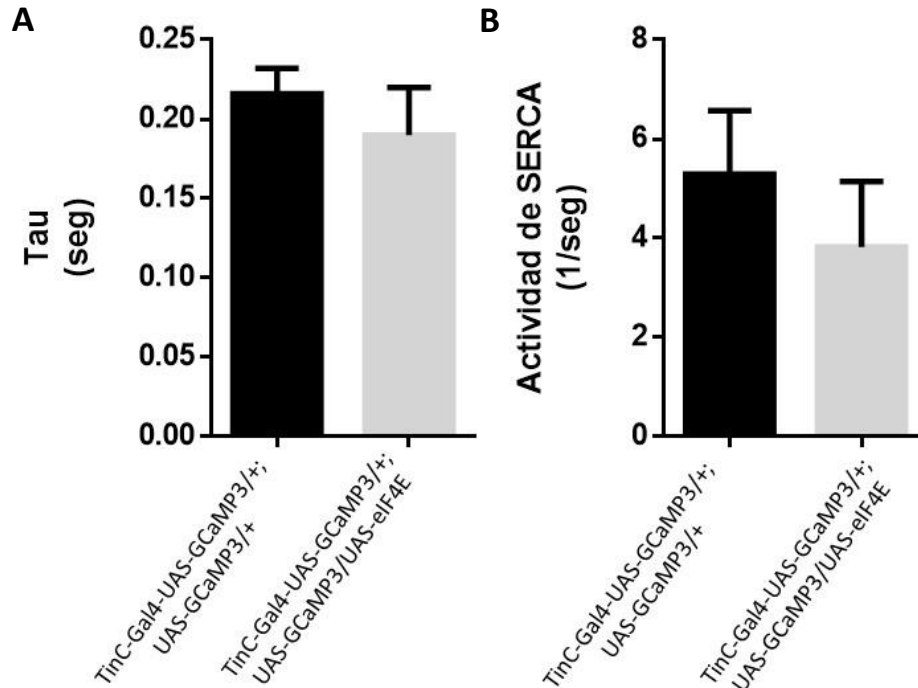


Figura 36: La sobreexpresión de eIF4E no modifica la constante de tiempo de relajación Tau y la actividad de la SERCA en moscas de 40 días. Constante de relajación Tau (A) y actividad de la SERCA (B) de moscas control y con sobreexpresión de eIF4E a los 40 días. N Tau: 6 y 4; N actividad de SERCA: 4 y 4. Test de Student.

Al analizar el contenido de Ca^{+2} del retículo sarcoplasmático, que se encontraba aumentado a los 7 días de edad, no se encontraron diferencias con respecto al control. En cuanto a la fracción de liberación se observó que la sobreexpresión de eIF4E no modifica este parámetro, como se había observado a los 7 días (Figura 37).

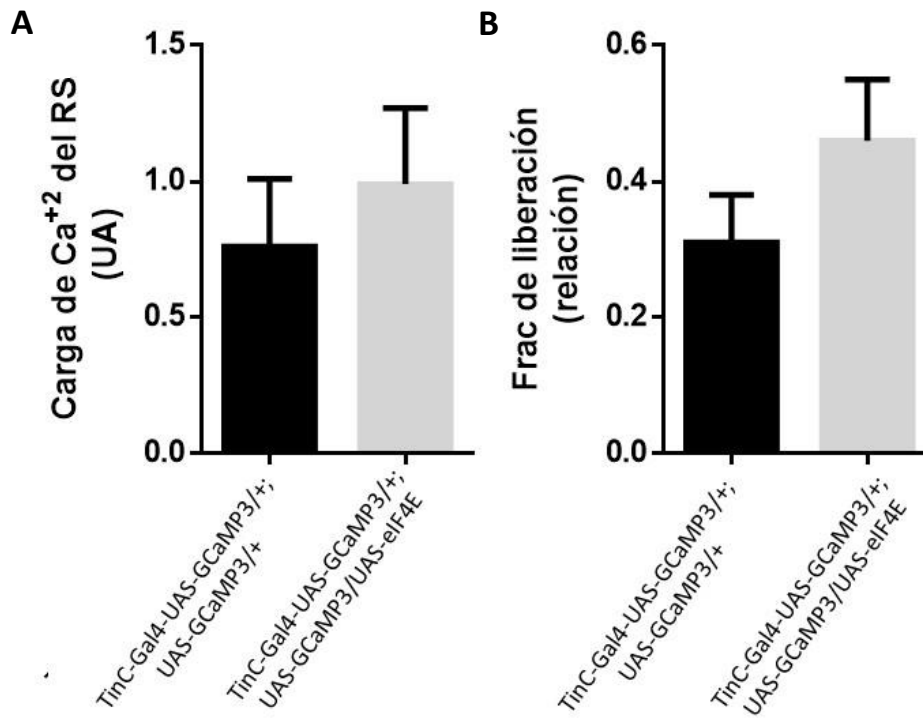


Figura 37: La sobreexpresión de eIF4E no modifica la carga de Ca²⁺ del RS ni la fracción de liberación a los 40 días. Carga del retículo sarcoplasmático (A) y fracción de liberación (B) de moscas control y con sobreexpresión de eIF4E a los 40 días. N: 4 y 4. Test de Student.

En conjunto, estos resultados indican que el aumento en la expresión de eIF4E no produce efectos en el desempeño cardíaco durante el envejecimiento. Esto mismo se había observado a los 7 días de edad. Aunque la sobreexpresión de eIF4E a edades tempranas produce un aumento en la actividad de la SERCA éste se pierde a edades tardías. La línea que sobreexpresa eIF4E muestra un patrón de envejecimiento similar que la línea control.

3. Inactivación de TOR por inanición

3.1 Impacto de la inactivación de TOR en el ciclado del calcio intracelular

La vía reguladora TOR participa en el crecimiento y homeostasis celular. Esta vía responde a los cambios nutricionales del entorno de modo tal que ante un aumento de nutrientes, se activa promoviendo la síntesis proteica en la célula, mientras que cuando la célula se ve afectada por una disminución de nutrientes, la vía se ve inhibida. Cuando esto sucede, la quinasa TOR es incapaz de fosforilar a 4E-BP permitiendo así que ésta se una a su interactor eIF4E. Así, bloquea su interacción con las demás proteínas que conforman el complejo activador de la traducción, eIF4F. Como resultado de esto, la síntesis proteica en la célula se ve detenida (35).

Dado que la inhibición de la vía TOR se presenta con un aumento de la fracción de 4E-BP no fosforilado (118), nos propusimos inhibirla de manera sistémica mediante inanición para evaluar los efectos producidos a nivel cardíaco. Para ello individuos de la línea control de 5 días de edad se sometieron a 48 horas de inanición. Luego se analizaron los parámetros fisiológicos del ciclado del calcio y se compararon con los de los individuos de la misma línea no expuestos a la deficiencia alimenticia.

La frecuencia cardíaca de los individuos sometidos a hambruna presentó un aumento con respecto a los alimentados con el medio convencional consecuente con datos presentes en bibliografía (119). Este aumento de frecuencia se acompañó de una disminución en la amplitud del transitorio de calcio intracelular. Estos resultados indicarían una escalera negativa en este organismo, fenómeno que no se encuentra descrito hasta el momento y en el cual nuestro grupo se encuentra trabajando. Por otro lado, el índice de arritmias no se vio afectado por la inanición coincidente con resultados previos donde moscas seleccionadas resistentes a la hambruna presentan un índice de arritmias similar a las moscas control (120) (Figura 38).

Cuando se analizaron las velocidades máximas de contracción (derivada positiva) y relajación (derivada negativa) se encontró que ambas estaban aumentadas en los individuos sometidos a inanición (Figura 39). Este fenómeno podría explicar la disminución de amplitud observados, ya que siendo las velocidades de contracción y relajación más rápidas, el tiempo de liberación de calcio sería menor, produciendo una menor amplitud del transitorio.

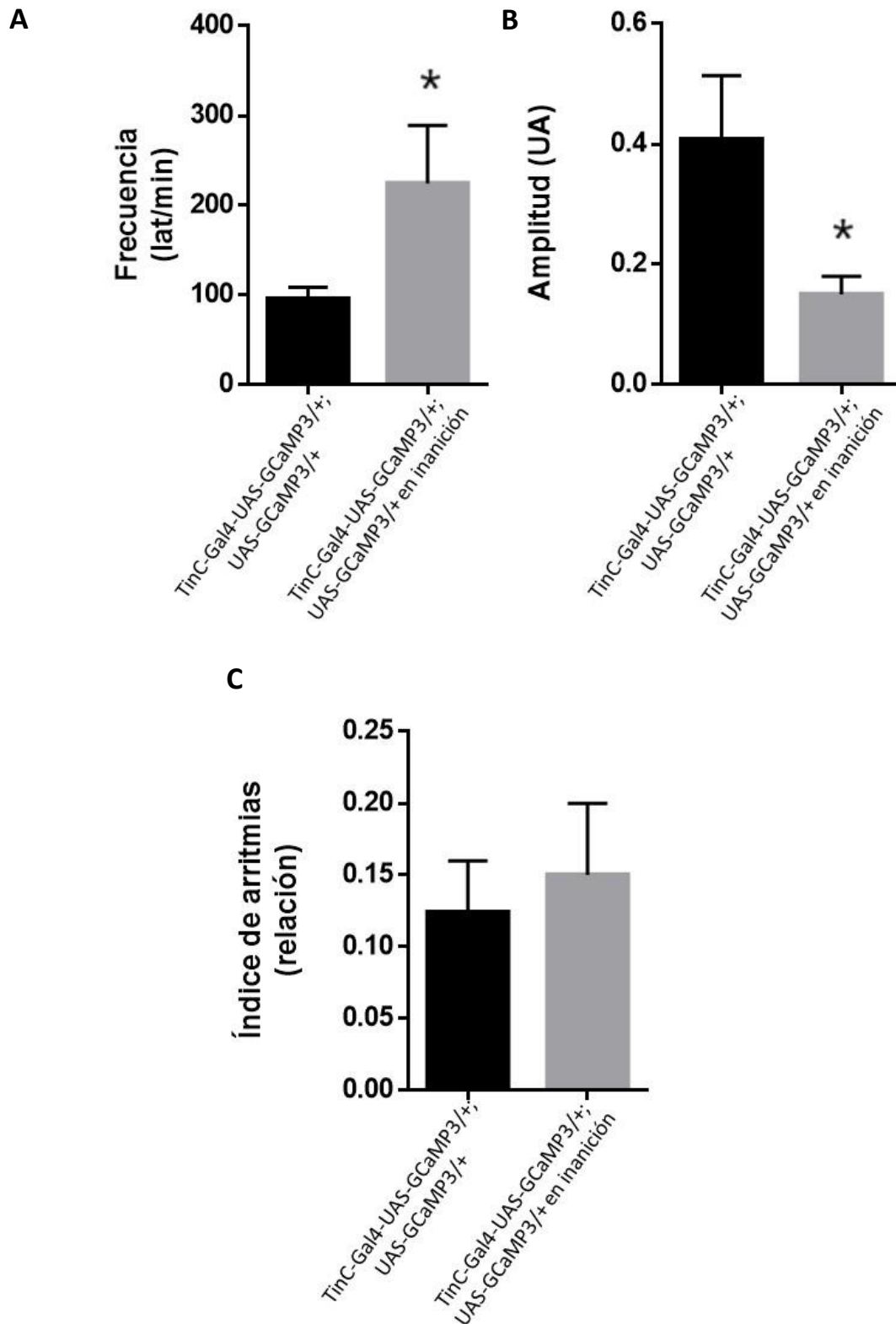


Figura 38: La inanición aumenta la frecuencia cardíaca y disminuye la amplitud del transitorio de Ca^{2+} sin modificar el índice de arritmias. Frecuencia cardíaca (A), amplitud del transitorio de calcio (B) e índice de arritmias (C) de moscas control sometidas a 48 horas de inanición comparadas con las moscas control alimentadas normalmente. N control: 7; n inanición. Test de Student, * $p < 0,05$ vs control.

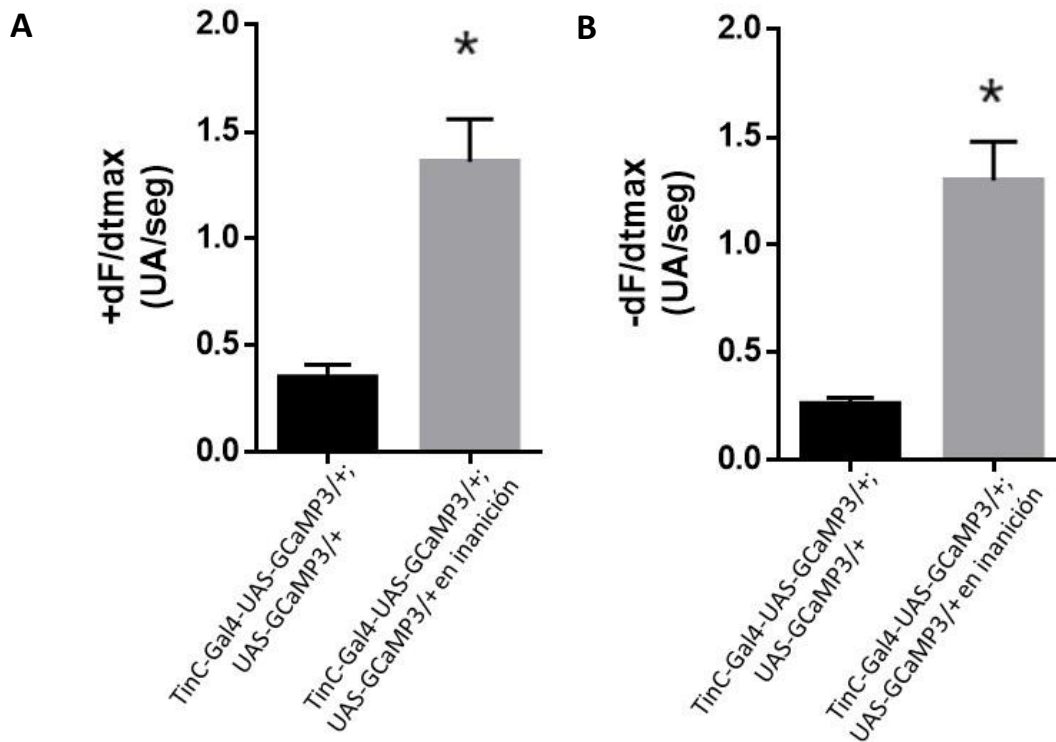


Figura 39. La inanición aumenta las derivadas de subida y relajación del transitorio de Ca^{2+} . Valores promedio de velocidad máxima de contracción (A) y relajación (B). La inanición provocó un aumento en ambas velocidades con respecto al control. N control: 7; n inanición: 4. Test de Student, * $p < 0,05$ vs el control.

Los datos desprendidos de la intervención con cafeína arrojaron que el sometimiento a inanición modifica la fracción de liberación y disminuye la carga del RS (Figura 41). A su vez, produce una disminución en el Tau y aumento de la actividad de la SERCA (Figura 42), resultados semejantes a la sobreexpresión de 4E-BP. Cabe recordar que la inactivación de la vía TOR produce un aumento en la cantidad de 4E-BP sin fosforilar, capaz de unirse a eIF4E y de este modo bloquear la iniciación de la síntesis proteica. Aumentar la cantidad de 4E-BP desfosforilada se asemeja a aumentar la cantidad total de 4E-BP mediante su sobreexpresión. Fue así como pudimos observar el mismo efecto desde dos aproximaciones distintas, una a nivel funcional (inanición) y otra a nivel genético (sobreexpresión).

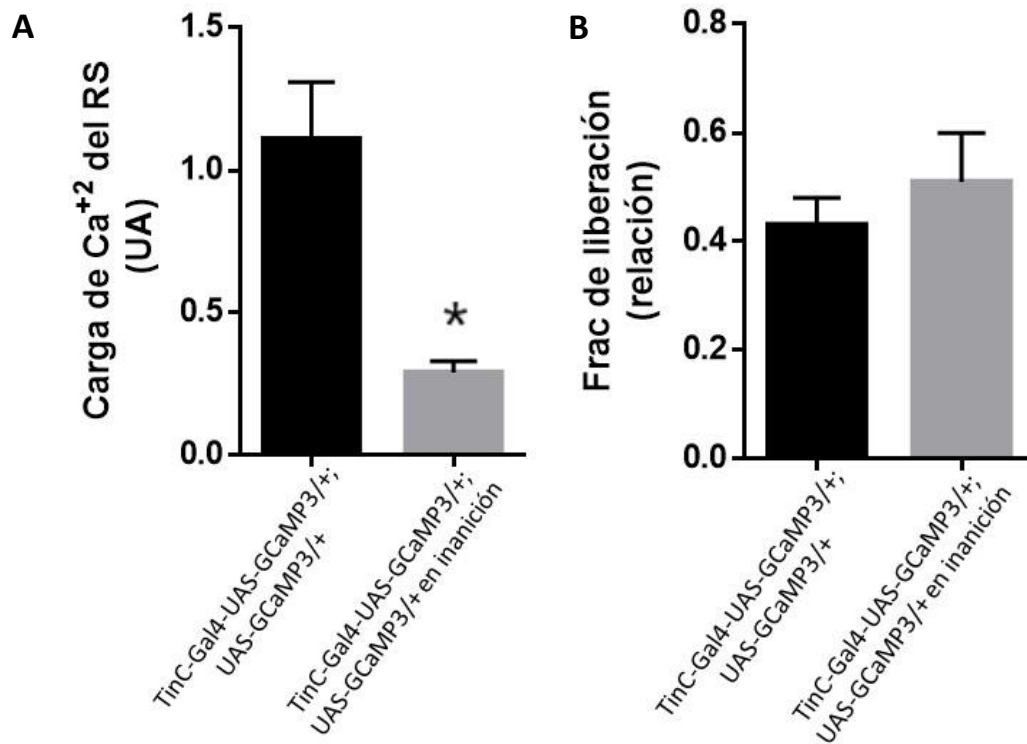


Figura 40: La inanición reduce la carga de Ca⁺² del RS y no modifica la fracción de liberación. Valores promedio de carga de calcio del retículo sarcoplasmático (A) y fracción de liberación (B) de la línea control alimentada normalmente y sometida a inanición. La inanición produjo una disminución en la carga de calcio del retículo, mientras que la fracción de liberación se mantuvo igual. N control=7; n inanición: 4. Test de Student, $p < 0,05$ vs. Control.

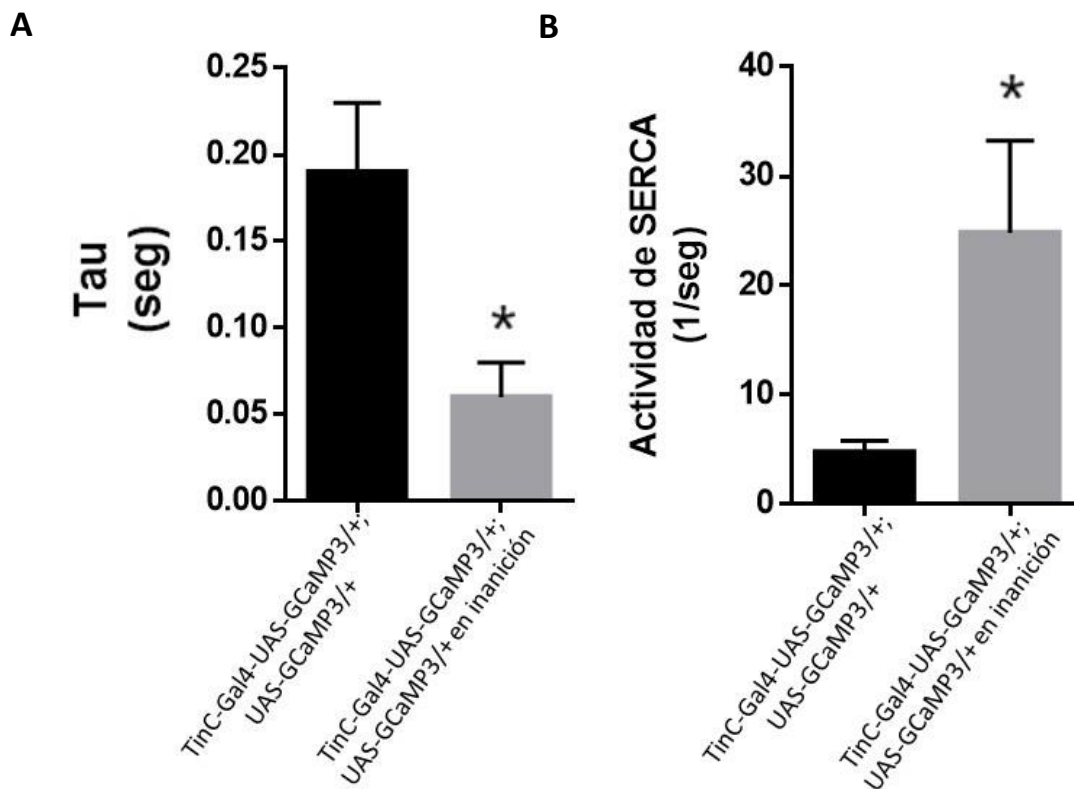


Figura 41: La inanición disminuye el tiempo de relajación y aumenta la actividad de la SERCA. Valores promedio de la constante de relajación Tau (A), donde se observa una disminución provocada por el sometimiento a inanición y, de la actividad de la SERCA (B) que se encuentra aumentada por la inanición. N control=7; n inanición: 4. Test de Student, $p < 0,05$ vs. control.

4. Arritmogénesis

4.1 Influencia de eIF4E en la generación de arritmias cardíacas

Dado que se ha vinculado la modulación de la expresión de eIF4E y 4E-BP con un efecto en la variabilidad de la respuesta cardíaca al estrés por *marcapaseo* (110), estudiamos el índice de arritmias como medida de la variabilidad de la frecuencia cardíaca a los 7 días de edad en todas las líneas. Como ya se mencionó, esta medida se calculó como el desvío estándar del período cardíaco normalizado por el promedio del período cardíaco de cada línea.

Como se puede observar en el gráfico de barras, la línea que sobreexpresa eIF4E presenta un mayor índice de arritmias, Estos resultados coinciden con los mostrados previamente por otros grupos de trabajo (110).

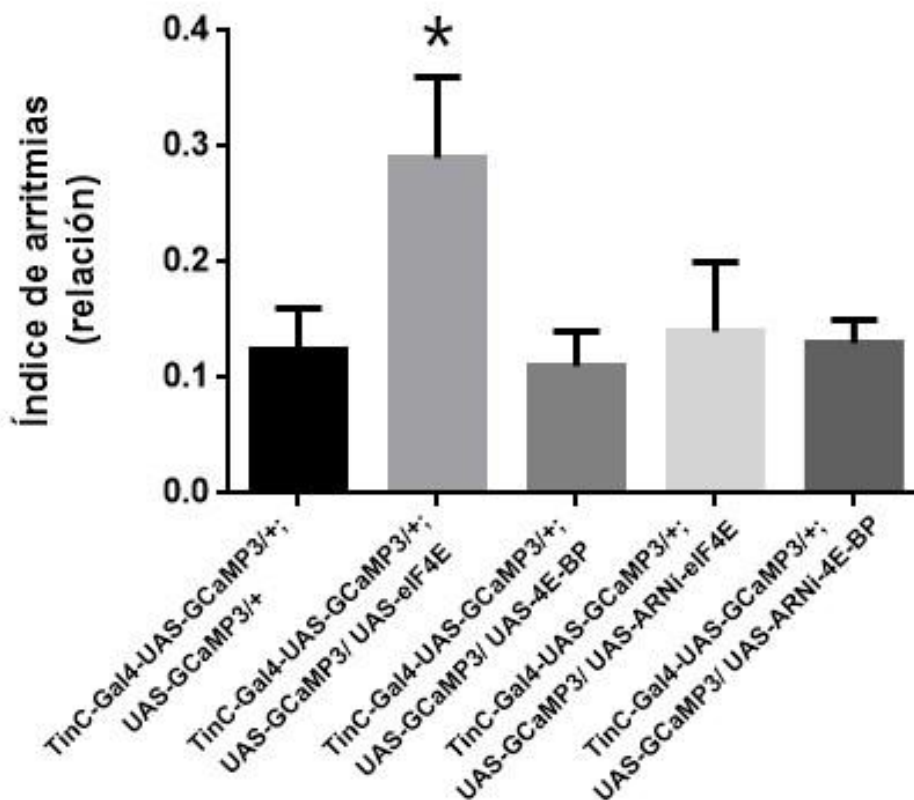


Figura 42. La sobreexpresión de eIF4E aumenta el índice de arritmias. Índice de arritmias a los 7 días de edad. La sobreexpresión de eIF4E produce un aumento en el índice de arritmias mientras que el resto de las líneas se comportan como el control. *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/+* n=7; *TinC-Gal4-GCaMP3/+; UAS-eIF4E/+* n=4; *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-4E-BP/+* n=7; *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-ARNi-eIF4E/+* n=5; *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-ARNi-4E-BP* n=4. ANOVA de una vía con test de Dunnet. $P < 0,05$ vs. Control y las otras líneas.

Al evaluar la variabilidad de la frecuencia cardíaca a los 40 días de edad encontramos que las 3 líneas estudiadas a esta edad presentan valores similares de este parámetro, indicando que el envejecimiento produce el mismo efecto sobre el índice de arritmias en las 3 líneas. De este modo, se puede observar que el posible efecto arritmogénico de la sobreexpresión de eIF4E observado a edades tempranas se pierde con el envejecimiento.

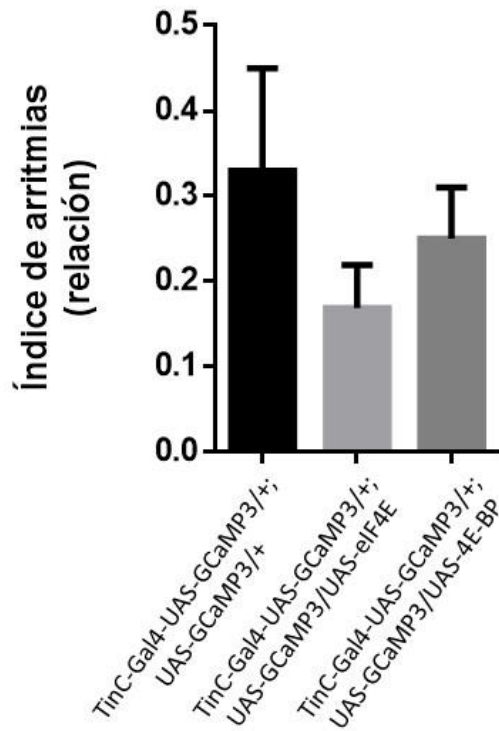


Figura 43. El índice de arritmias no se modifica en las líneas transgénicas Índice de arritmias a los 40 días de edad. *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-GCaMP3/+* n=4; *TinC-Gal4-GCaMP3/+; UAS-eIF4E/+* n= *TinC-Gal4-UAS-GCaMP3/+; UAS-4E-BP/+* n=6. ANOVA de una vía con test de Dunnet.

Estos resultados indican un posible rol de eIF4E en la generación de arritmias cardíacas a edades tempranas sin afectar el ciclado de calcio intracelular. Probablemente la sobreexpresión de eIF4E, afecta los centros marcapaso que controlan la ritmicidad y frecuencia cardíacas. Aunque la frecuencia cardíaca de la línea que sobreexpresa eIF4E no sea diferente al resto de las líneas estudiadas, la ocurrencia de los latidos cardíacos en el período analizado se desarrolla con mayor variabilidad.

5. Traducción de proteínas

Impacto de las modificaciones en la expresión de eIF4E y 4E-BP en los niveles de síntesis proteica en el tejido cardíaco

Como hemos mencionado a lo largo de la presente tesis, nuestras proteínas de interés participan en la síntesis de proteínas de la célula. Por este motivo, decidimos evaluar si las sobreexpresiones de eIF4E y 4E-BP modifican este proceso en el corazón. Para ello utilizamos un kit de traducción que consta de un análogo de metionina (OPP) capaz de unirse a las proteínas neo-sintetizadas. La adición de Alexa Fluor® 488 picolil azida y los reactivos de reacción conduce a una unión quimiosselectiva entre el colorante de azida y el alquino de OPP, permitiendo que las proteínas modificadas se detecten mediante análisis de fluorescencia de las imágenes. Así, las proteínas neo-sintetizadas fluorescerán en verde al excitar el fluoróforo con la longitud de onda correspondiente.

Para probar el kit se utilizaron primero células HeLa. Esta es una línea tumoral establecida proveniente de un tumor cervicouterino y como tal, se encuentra en constante división por lo que es traduccionalmente activa. Como control negativo de la traducción se utilizó cicloheximida, un conocido inhibidor de la traducción. La Figura 44 muestra el correcto funcionamiento del kit. A la izquierda se observan en las células puntos fluorescentes correspondientes a las proteínas neo-sintetizadas mientras que, a la derecha se observan las células incubadas con cicloheximida sin puntos correspondientes a nuevas proteínas.

Una vez probado el funcionamiento del kit se procedió a su utilización en el tejido cardíaco. Los preparados semi intactos fueron procesados como se mencionó en el apartado “Materiales y métodos” y se incubaron con el kit de traducción según indicaciones del fabricante.

Como se puede observar en la Figura 45 no se encontraron diferencias en la síntesis proteica entre las líneas analizadas.

El corazón es un tejido completamente diferenciado con una actividad traduccional muy baja, por lo que se utilizó como control interno un tejido activo traduccionalmente próximo al cardíaco como lo son las células pericárdicas. La Figura 45 muestra cómo estas células presentan actividad traduccional observada por la presencia de puntos fluorescentes en su citoplasma. Esto indica el correcto funcionamiento del kit en el preparado semi intacto y demuestra que la ausencia de señal proveniente de proteínas neosintetizadas en las distintas líneas no se debe a un incorrecto funcionamiento del kit sino a una real ausencia de éstas en este tejido.

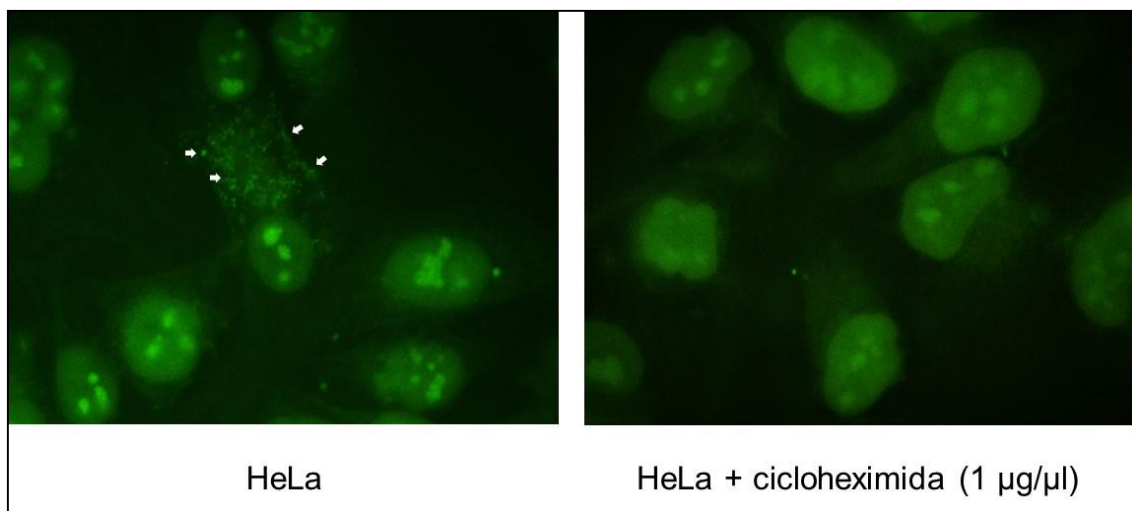


Figura 44: Ensayo de traducción en células HeLa. Las puntas de flecha muestran cúmulos de proteínas neosintetizadas (izquierda). Esta síntesis es bloqueada por el inhibidor de la traducción cicloheximida (derecha). Imagen representativa de 3 experimentos.

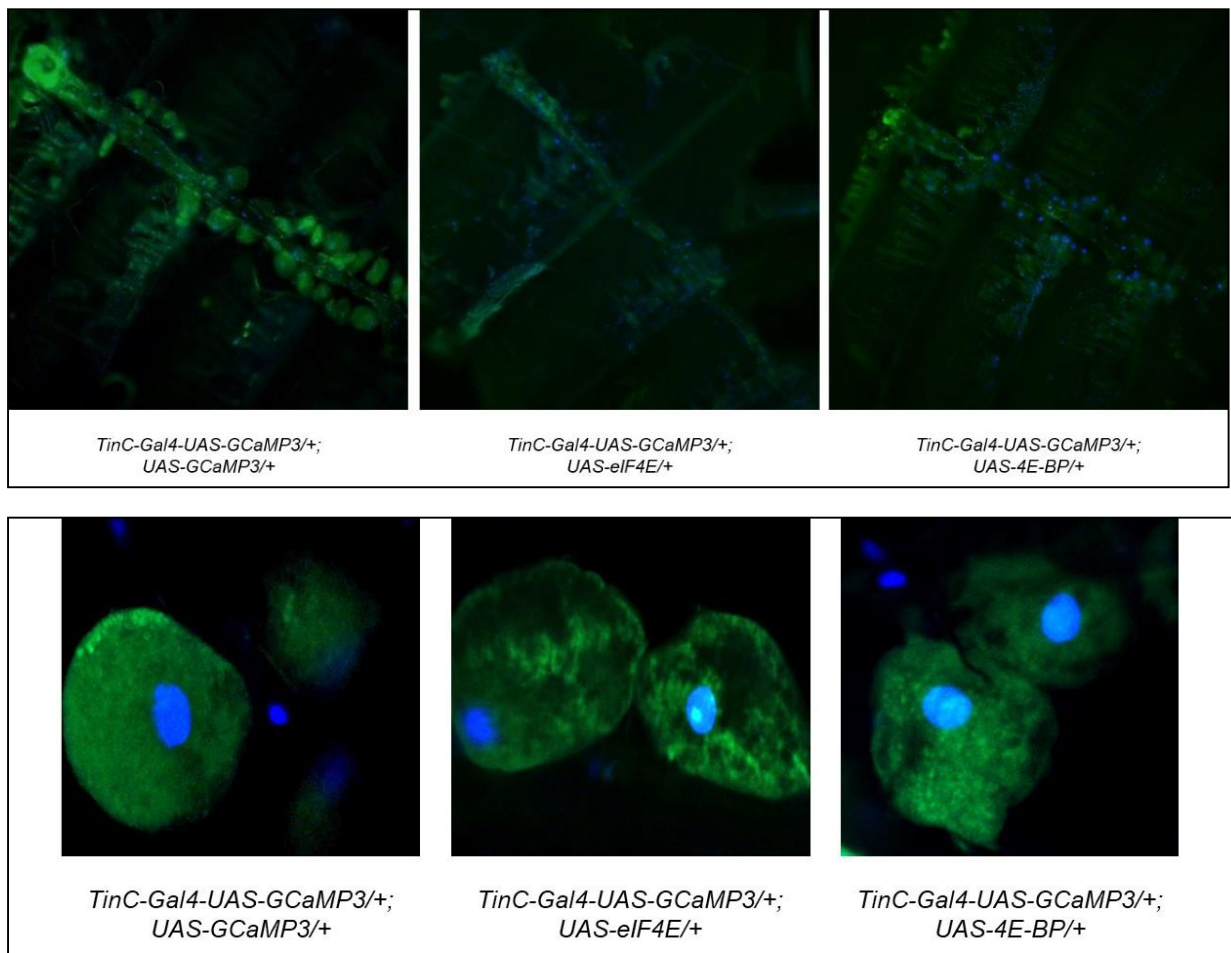


Figura 45. Ensayo de traducción mostrando que no existe variabilidad en la síntesis proteica entre las líneas estudiadas. Arriba: ensayo de traducción de corazones de las líneas control, sobreexpresión de eIF4E y sobreexpresión de 4E-BP a los 7 días de edad. Abajo: control interno de síntesis proteica, células pericárdicas traduccionalmente activas correspondientes al mismo preparado en el que se observa el corazón. Imágenes representativas de 9 experimentos.

Cabe mencionar que el kit es capaz de identificar la síntesis proteica en general, pero no de proteínas específicas, por lo que mediante esta aproximación no podemos descartar que la síntesis de alguna/s de las proteínas involucradas en el ciclado del calcio se halle modificada. Pero sí podemos afirmar que la síntesis proteica global del corazón no se ve afectada mediante la sobreexpresión de eIF4E y 4E-BP.

6. Interacción entre proteínas

Hallazgo de nuevas interacciones proteicas

Los resultados hallados hasta el momento muestran que las modificaciones en los niveles de las proteínas estudiadas afectan el ciclado del calcio intracelular. En particular, la actividad de la SERCA se ve modificada. Dado que los niveles proteicos generales parecen no estar alterados, nos preguntamos si es posible que los resultados observados se deban a una interacción entre las proteínas en cuestión. La primera aproximación fue realizar un análisis bioinformático con el fin de buscar posibles sitios de interacción entre las proteínas de interés. De esta manera, hallamos en la secuencia proteica de SERCA el dominio consenso de interacción con eIF4E. Es decir, SERCA posee en su extremo N-terminal una secuencia aminoacídica homóloga a la presente en 4E-BP que permite su interacción directa con eIF4E (Figura 46). Teniendo en cuenta que la localización de esta secuencia es en el dominio citosólico de SERCA, lo que permitiría su interacción con eIF4E, nos propusimos evaluar si esta interacción directa entre proteínas estaba ocurriendo. Para ello realizamos un ensayo de doble híbrido cotejando las diferentes isoformas de eIF4E presentes en *Drosophila melanogaster* y la SERCA. Como control de interacción se utilizó 4E-BP ya que es ampliamente conocido que interacciona de manera directa con eIF4E. Como control negativo de interacción se utilizó el vector de doble híbrido vacío.

Sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, isoform I [Drosophila melanogaster]	
Sequence length: 999	Pattern Hit: YXXXXL(Phi)
Number of matches: 1	
Pattern	*****
Query 1 MEDGHSKTVEQSLNFFGTDPERGLTLDQIKANQKKYGPNELPTEEGKSIWQLVLEQFDDL 60	
	MEDGHSKTVEQSLNFFGTDPERGLTLDQIKANQKKYGPNELPTEEGKSIWQLVLEQFDDL
Sbjct 1 MEDGHSKTVEQSLNFFGTDPERGLTLDQIKANQKKYGPNELPTEEGKSIWQLVLEQFDDL 60	
Query 61 LVKILLLAAIISFVLALFEEHEETFAFVEPLVILLILIANAVVGWQERNAESAIEALK 120	
	LVKILLLAAIISFVLALFEEHEETFAFVEPLVILLILIANAVVGWQERNAESAIEALK
Sbjct 61 LVKILLLAAIISFVLALFEEHEETFAFVEPLVILLILIANAVVGWQERNAESAIEALK 120	

Figura 46. Secuencia de aminoácidos de los primeros 120 aminoácidos de la proteína SERCA de *Drosophila melanogaster*. Remarcados en cuadrado azul y con asteriscos, se observan los aminoácidos que comprenden el sitio.

El ensayo de doble híbrido se basa en la utilización del factor de transcripción Gal4 de levaduras. Este factor está compuesto por dos subunidades, una comprende el dominio de unión al ADN (BD por sus siglas en inglés *binding domain*) y el de activación (AD por sus siglas en inglés *activator domain*). Cuando estos dos dominios están próximos el factor Gal4 es capaz de unirse a una secuencia nucleotídica en el ADN llamada UAS y promover la transcripción de un gen corriente abajo de esta secuencia. Si se desea conocer si dos proteínas interactúan, pueden clonarse en los dominios de activación y unión al ADN, respectivamente. En caso de que las proteínas interactúen, los dominios de Gal4 se encontrarán próximos y de este modo se producirá la transcripción de genes reporteros independientes (112, 113) (Figura 14).

Para el ensayo de doble híbrido de *Drosophila melanogaster* se utilizaron cepas de levadura aportadas por el Dr. Greco Hernández. Las cepas α expresan las isoformas de eIF4E clonadas en el vector de unión al ADN y las cepas α expresan 4E-BP y SERCA en el vector de activación. Se llevó a cabo el ensayo cruzando las cepas haploides ($\alpha \times \alpha$). Cada cepa α portadora de las distintas isoformas de eIF4E se cruzó por un lado con la cepa α portadora de 4E-BP y por el otro con la cepa α portadora de la secuencia de SERCA. Como control negativo se cruzaron las cepas α con una cepa α que tiene el vector con el dominio de activación y a las cepas α con una cepa α portadora del vector dominio de unión al ADN. Como producto de la cruce se obtuvieron cepas diploides portadoras de ambos vectores. Estas cepas se llevaron a medios restrictivos carentes de adenina e histidina. En caso de existir interacción entre

las proteínas unidas a los dominios de unión al ADN y de activación, las células podrán crecer en los medios restrictivos ya que la aproximación entre los dominios volverá a Gal4 activo, promoviendo la expresión de los genes que conferirán a la célula la capacidad de sintetizar adenina e histidina.

Como se puede observar en la Figura 47, cuando eIF4E-4 y SERCA se co-expresan en una cepa, interactúan, promoviendo el crecimiento celular en los medios restrictivos. Esto no se observa cuando SERCA se co-expresas con las otras isoformas de eIF4E, por lo que se podría asumir que esta interacción es exclusiva de la isoforma 4.

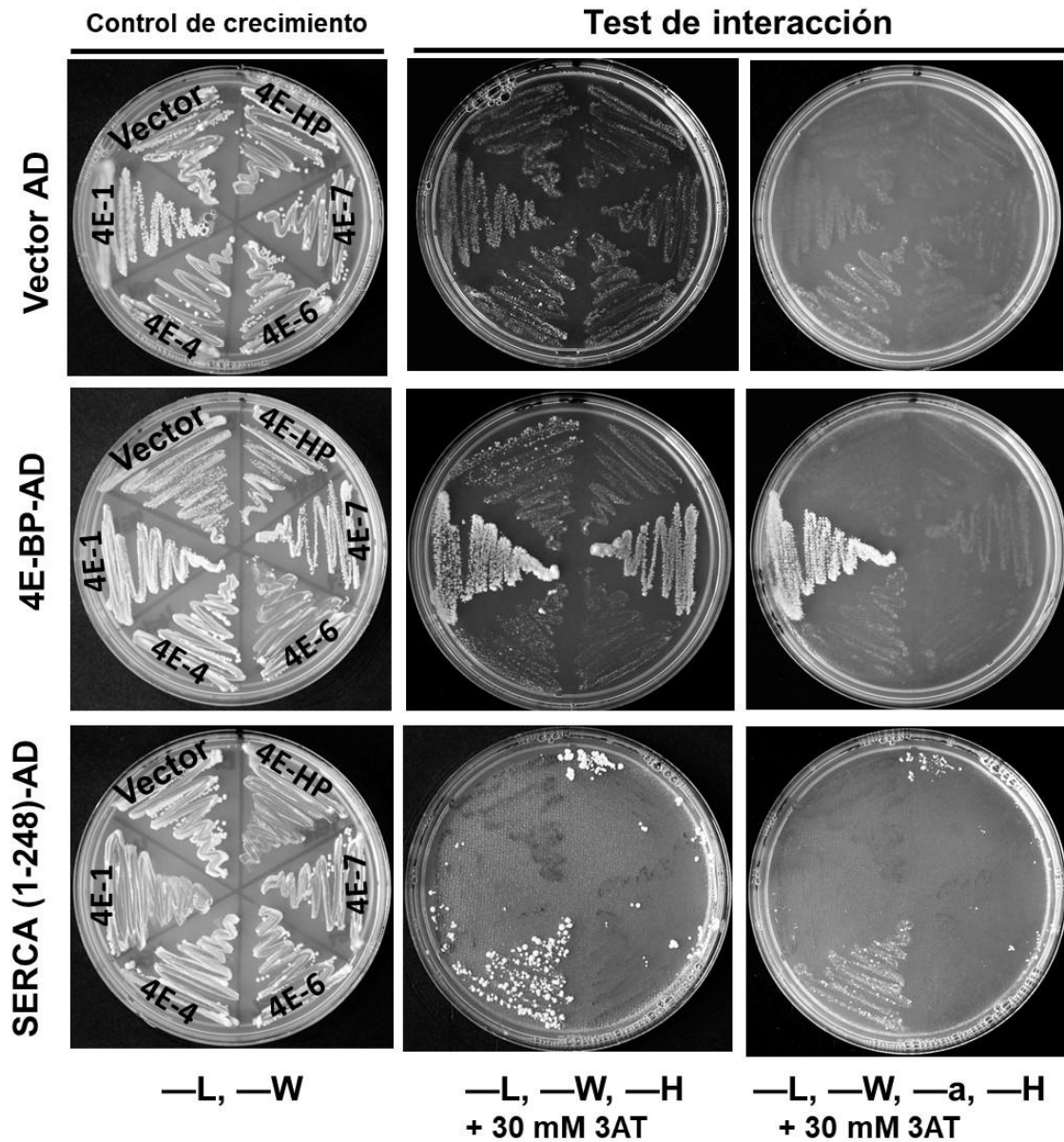


Figura 47. Ensayo de doble híbrido para evaluar interacción entre proteínas. Izquierda, controles de crecimiento. Las cepas diploides portadoras de las isoformas de eIF4E en el vector de unión al ADN y de vector de activación vacío (arriba), 4E-BP en el vector de activación (medio) y dominio N-terminal de SERCA en el vector de activación (abajo). La columna central y la de la derecha muestran las réplicas de las placas de la columna de la izquierda en medios restrictivos (-LWH+ 30 mM 3AT y -LWHa + 30 mM de 3AT). Las isoformas 1 y 7 de eIF4E interactúan con 4E-BP, y en medio muy restringido como es -LWHa + 30 mM de 3AT solo lo hace la isoforma 1 (medio). La isoforma 4 de eIF4E interactúa con SERCA, de manera fuerte ya que la interacción se observa en ambos medios (abajo). Imagen representativa de 9 experimentos.

Para probar si la interacción entre eIF4E-4 y SERCA estaba determinada por el dominio de interacción putativo hallado se mutó esta secuencia en el ADN de SERCA y se realizó el ensayo de doble híbrido

con un doble mutante que posee 3 cambios de aminoácidos (Y36A, L41A, P42A). Los resultados hallados mostraron que la mutación en estos sitios no impide la interacción entre eIF4E-4 y SERCA, por lo que el sitio de interacción entre estas proteínas estaría dado en otro sector de la secuencia proteica (Figura 48).

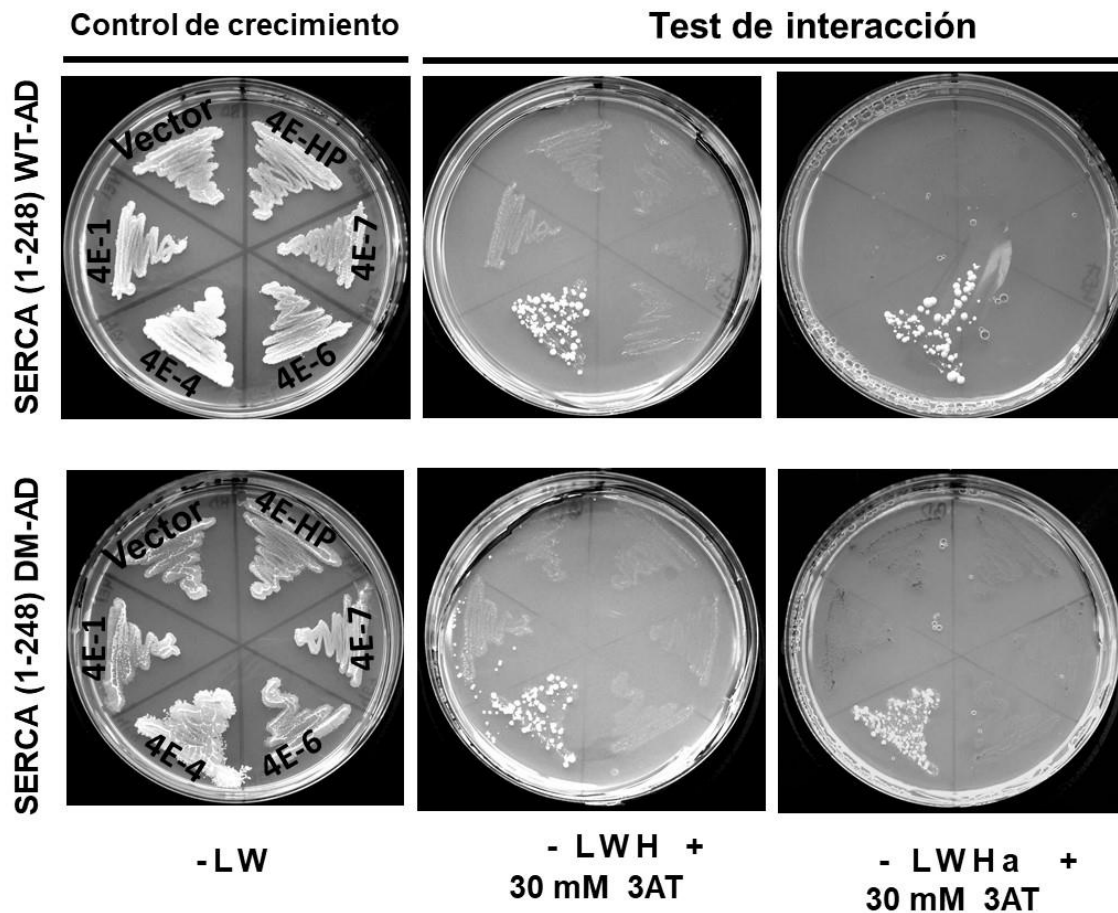


Figura 48. Ensayo de doble híbrido para evaluar si la interacción entre proteínas se mantiene al mutar el posible sitio de interacción de eIF4E-4 y SERCA. Izquierda, controles de crecimiento. La columna central y la de la derecha muestran las réplicas de las placas de la columna de la izquierda en medios restrictivos (-LWH+ 30 mM 3AT y -LWHa + 30 mM de 3AT). Los resultados muestran que la interacción entre eIF4E-4 y SERCA (arriba) se mantiene cuando se muta el posible sitio de interacción (abajo), demostrando que la interacción no se encuentra dada por este sitio. Imagen representativa de 3 experimentos.

Además, quisimos evaluar si la interacción hallada se encuentra conservada en humanos. Se procedió al clonado de las secuencias de SERCA y eIF4E humano en los vectores de activación y de unión al ADN, respectivamente. Como control de interacción se utilizó el vector portador de 4E-BP de *Drosophila* unido al dominio de unión al ADN ya que probamos que 4E-BP de *Drosophila* interacciona con eIF4E humano.

Los ADNc de eIF4E y SERCA humano se obtuvieron de OriGene. Se amplificaron las secuencias por PCR y se clonaron en el vector TA. Luego se clonaron en el vector de dominio de unión al ADN y de activación respectivamente. Una vez que las secuencias fueron incorporadas a los vectores de doble híbrido, se procedió a la transformación de las cepas de levadura correspondientes (α para el dominio de unión al ADN y a para el dominio de activación). Una vez transformadas las levaduras se cruzaron para dar lugar a la cepa diploide portadora de ambas construcciones. Las cepas diploides fueron sometidas al ensayo de interacción en los medios restrictivos.

Como se puede observar en la figura 49, sólo hubo crecimiento celular en la cepa diploide portadora de eIF4E humano y 4E-BP de *Drosophila* indicando una interacción entre estas dos proteínas, pero no se observó interacción entre eIF4E y SERCA en humanos en estas condiciones de selectividad de los medios de cultivo.

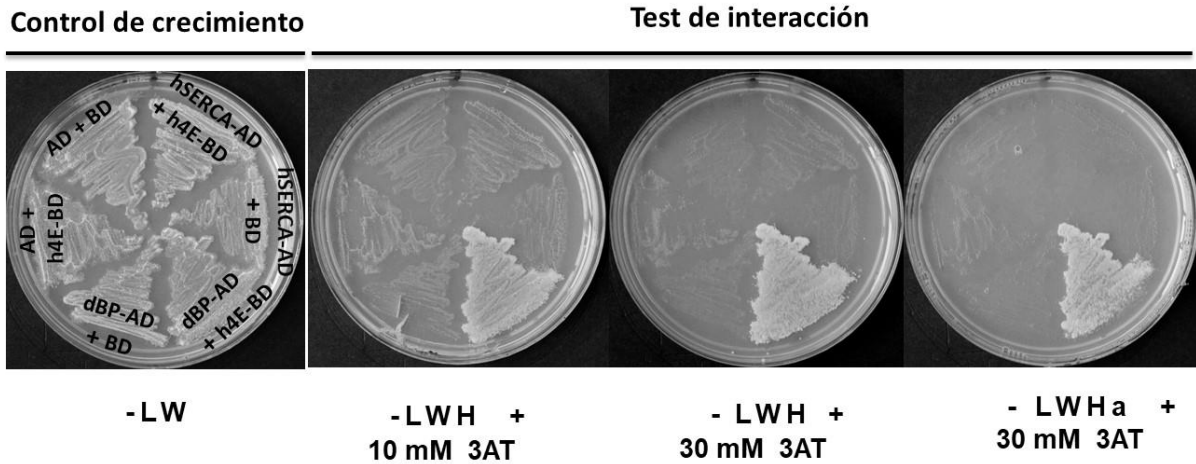


Figura 49. Ensayo de doble híbrido para evaluar si la interacción entre SERCA y eIF4E se encuentra conservada en humanos. Ensayo de doble híbrido entre hSERCA y heIF4E-1. Izquierda, control de crecimiento en medio completo. Derecha, ensayo de interacción en medios restringidos (-LWH + 30 mM 3AT y -LWHa + 30 mM de 3AT). Las bacterias crecidas en medios restrictivos representan la interacción entre heIF4E y d4E-BP. Imagen representativa de 3 experimentos.

7. Expresión de eIF4E-4 y SERCA

La isoforma 1 de eIF4E es conocida como la isoforma ubicua, habiendo sido reportada su expresión en todos los tejidos de *Drosophila melanogaster* durante todo el desarrollo y vida del individuo. Las demás isoformas han sido poco reportadas y aún no se sabe con claridad cuál es el rol particular de cada una (48). Dado que nuestros resultados indican una interacción entre la isoforma 4 de eIF4E y la SERCA, nos preguntamos si esta isoforma se expresa en tejido cardíaco, explicando su posible función en corazón. Para ello evaluamos la expresión del ARN mensajero de eIF4E-4 mediante la realización de una RT-PCR de tejido cardíaco. Luego de la retrotranscripción con posterior amplificación del ADN copia obtenido, pudimos observar la expresión a nivel ARNm de la isoforma 4 de eIF4E.

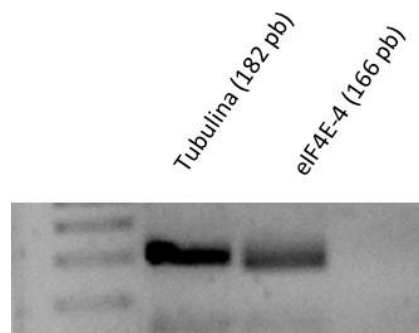


Figura 50. RT-PCR utilizando primers específicos para levantar un fragmento de 182 pb de tubulina y uno de 166 pb de eIF4E-4. Imagen representativa de 4 experimentos.

Para corroborar la expresión de la proteína SERCA en tejido cardíaco de *Drosophila melanogaster* llevamos a cabo un western blot, mostrando que esta proteína se encuentra expresada en el corazón de la mosca de la fruta.

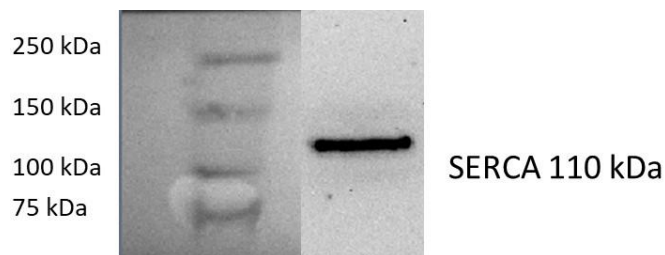


Figura 51. Western blot revelado con anticuerpo anti-SERCA de *Drosophila melanogaster*, cuyo peso molecular es 110 kDa. Imagen representativa de 11 experimentos.

8. Expresión de eIF4E-4

Dado que no existen anticuerpos disponibles para detectar la isoforma 4 de eIF4E, nos propusimos evaluar su expresión mediante espectrometría de masas del corazón de *Drosophila melanogaster*.

Se colectaron 300 corazones que fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas contenidas en las muestras fueron analizadas por espectrometría de masas para identificar en el conjunto, la presencia de eIF4E-4. Las proteínas ionizadas, separadas en los péptidos que las constituyen, fueron comparadas con los péptidos presentes en una base de datos de *Drosophila melanogaster* con el objetivo de hallar coincidencias entre los péptidos conocidos y los presentes en la muestra. A continuación, las tablas muestran el resultado de dos análisis en la búsqueda de péptidos cuya secuencia sea coincidente con los hallados empíricamente mediante la espectrometría de masas.

MS01 <i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly).xlsx	Resultados del análisis DDA. Base de datos: <i>Drosophila melanogaster</i> Nivel de confianza de péptidos: alta No se encuentra la proteína eIF4E-4
MS01 eIF4E Medium.xlsx	Resultados del análisis DDA. Base de datos: Santalla eIF4E-4 Nivel de confianza de péptidos: media Se obtienen todos péptidos medium

Con estos resultados no fue posible afirmar que la proteína eIF4E-4 se encuentra en la muestra. Por lo tanto, se procedió a realizar el análisis dirigido o *Targeted*. Este consiste en cargar en el equipo una lista de péptidos provenientes de la digestión triptica *in silico* de nuestra proteína de interés con el fin de cotejar si se encuentran dentro de la muestra.

Para seleccionar los valores de masa carga (m/z) que pudieran ser representativos de los péptidos correspondientes a eIF4E-4, se realizó una búsqueda en Peptide Atlas (www.peptideatlas.org) de la proteína de interés con el objetivo de encontrar resultados de análisis previos de la misma. Sólo se encontró el péptido HPLENTWTLWYLENDR con carga +2. El resto del listado se realizó a partir de los péptidos de confianza media hallados en MS01 eIF4E Medium.xlsx.

Este análisis arrojó el siguiente resultado:

MS01_Target medium.xlsx	<i>Drosophila melanogaster</i>	Resultados del análisis Targeted. Base de datos: <i>Drosophila melanogaster</i> Nivel de confianza de péptidos: media Se encuentra la proteína eIF4E-4 con un péptido de alta confianza y uno de mediana confianza.
----------------------------	--------------------------------	---

La Figura 52 corresponde a un extracto del listado en donde se volcaron las proteínas identificadas en el espectrómetro de masas. En verde se resalta eIF4E-4, quien fue identificada a través del hallazgo de dos péptidos, uno de alta confianza (señalado con la leyenda *High*) y uno de mediana confianza (señalado con *Medium*).

Master	Accession	Description	Coverage	# Peptides	# PSMs	# Unique Peptides	# Protein	Gr # AAs	MW [kDa]
Master Prote	A0A0B4JCZ0	Oxysterol-binding protein OS=Drosophila melanogaster GN=Dm	1,51515152	1	1	1	1	990	108,3
Master Prote	A0A0B4JCZ8	Missing-in-metastasis, isoform F OS=Drosophila melanogaster G	0,39447732	1	2	1	1	2028	218,3
Master Prote	A0A0B4JD40	Uncharacterized protein OS=Drosophila melanogaster GN=CG18	2,40963855	1	5	1	1	415	46,6
Master Prote	A0A0B4K6A1	CG2082, isoform O OS=Drosophila melanogaster GN=BcDNA:GH0	2,08955224	1	2	1	1	335	37
Master Prote	A0A0B4K6D5	Molecule interacting with CasL, isoform L OS=Drosophila melanc	0,59034366	2	2	2	1	4743	527
Master Prote	A0A0B4K6I0	Uncharacterized protein, isoform A OS=Drosophila melanogaster	8,75012400	2	2	2	1	127	16,2
Master Prote	Q9VRY0	GH23527p OS=Drosophila melanogaster GN=eIF4E4 PE=2 SV=1	8,29694323	2	3	2	1	229	26,4
Checked	Confidence	Sequence	Modification	# Protein	Gr # Proteins	# PSMs	Master Prote	# Missed Cle	Theo. MH+ [I
FALSO	High	WVINMGRGSKAELDK	1xOxidation	1	1	2	Q9VRY0	2	1719,88467
FALSO	Medium	FGRRWVINMGR		1	1	1	Q9VRY0	1	1292,66807

Figura 52. Tabla Excel donde se marca el hallazgo de eIF4E-4 (resaltada en verde) mediante la identificación de dos péptidos, uno de alta y otro de confianza media (*High* y *Medium*, respectivamente).

El espectro del péptido con alta confianza es bueno; aparece en el mismo tiempo de retención comparando contra la secuencia específica de la proteína o contra *Drosophila* (Figura 53). Además, haciendo un análisis de homología por *Blast* entre este péptido y la base de datos de *Drosophila melanogaster* el único hit que aparece contra el péptido WVINMGRGSKAELDK con 100 % de identidad es el factor de traducción eIF4E-4 indicando que éste es un péptido único de nuestra proteína de interés.

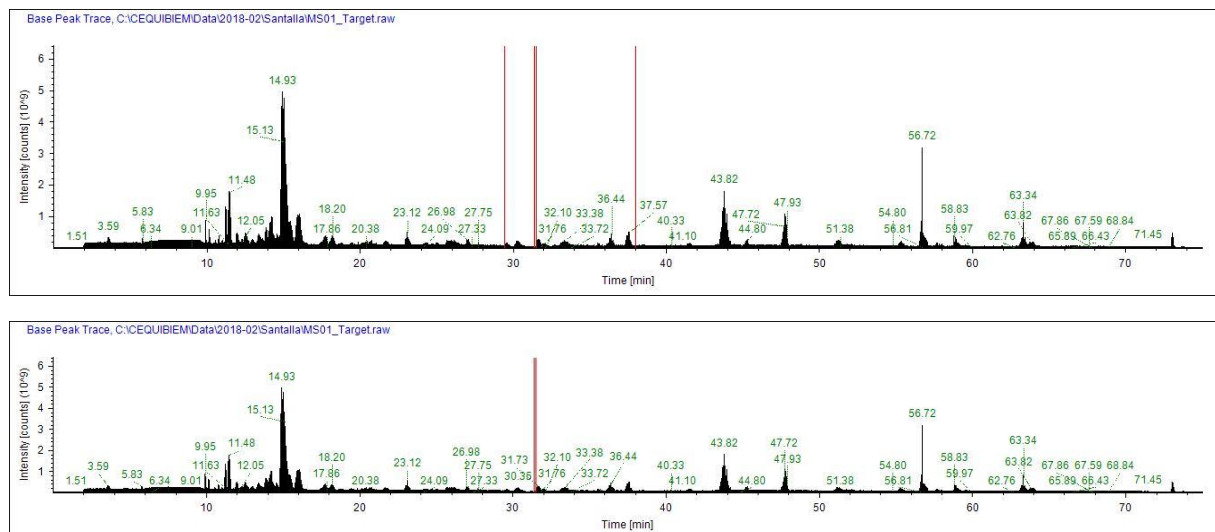


Figura 53. Arriba. Tiempo de retención analizado contra la secuencia específica de la proteína. Abajo. Tiempo de retención analizado contra el proteoma de *Drosophila melanogaster*. En rojo se marca el momento de elución del péptido de alta confianza. Ambos eluyen en el mismo momento, poco después de los 20 min.

Como control de la espectrometría se buscaron proteínas de expresión conocida en tejido cardíaco, entre las que pudimos identificar con un amplio número de péptidos de alta confianza a la cadena pesada de la miosina (MHC) y la bomba calcio-ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA). La figura 54 muestra la aparición de estas dos proteínas en el archivo Excel.

Checked	Master	Accession	Description	Coverage	# Peptides	# PSMs	# Unique Pep	# Protein	Grc # AAs	MW [kDa]
FALSO	Master Proté	P05661	Myosin heavy chain, muscle OS=Drosophila melanogaster GN=Mhc PE=1 SV=4	34,811417	64	529	1	1	1962	224,3
FALSO	Master Proté	M9ND95	Myosin heavy chain, isoform U OS=Drosophila melanogaster GN=Mhc PE=1 SV=1	35,454079	66	528	3	1	1949	222,8
FALSO	Master Proté	E1JHJ3	Myosin heavy chain, isoform O OS=Drosophila melanogaster GN=Mhc PE=1 SV=1	35,270133	65	523	1	1	1962	224,4
FALSO	Master Proté	P35415	Paramyosin, long form OS=Drosophila melanogaster GN=Prm PE=1 SV=1	33,788396	24	132	24	1	879	102,3
FALSO	Master Proté	P22700	Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type OS=Droso	27,745098	20	102	20	1	1020	111,6

Figura 54. Identificación de MHC y SERCA (resaltadas en amarillo) en el conjunto de proteínas provenientes del espectrómetro de masas. El número de péptidos indica la cantidad de péptidos de alta confianza hallados para cada una, 64 para MHC y 20 para SERCA.

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que la isoforma 4 del factor eIF4E se encuentra expresada en el corazón de *Drosophila melanogaster*. Esto puede deducirse a partir de la identificación por espectrometría de masas de dos péptidos, uno de alta y otro de mediana confianza, que resultan de la digestión triptica de la proteína y sólo corresponden a eIF4E-4. El hecho de que en el primer análisis no se haya encontrado eIF4E-4 puede deberse a que la cantidad de muestra ingresada no fue suficiente para detectar la proteína. Al ajustar los parámetros del espectrómetro para analizar sólo un determinado número de péptidos tripticos, sí fue posible identificarla.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye un avance relevante en la consolidación del uso de *Drosophila melanogaster* como nuevo modelo de enfermedades cardiovasculares en nuestro país.

Haciendo uso de la mosca de la fruta como herramienta genética, pudimos mostrar: 1) cómo la variación en los niveles de expresión de las proteínas efectoras de la vía TOR: eIF4E y 4E-BP, producen una modificación en la fisiología cardíaca de *Drosophila melanogaster*, más específicamente, en el ciclado del calcio intracelular; 2) cómo la sobreexpresión de 4E-BP ejerce un efecto beneficioso sobre la función cardíaca que se mantiene parcialmente con el envejecimiento y; 3) cómo eIF4E y 4E-BP modifican el ciclado de Ca^{+2} mediante la modulación de la actividad de la SERCA, por un posible mecanismo que implica una interacción directa entre la Ca^{+2} ATPasa y la isoforma 4 de eIF4E, regulado por 4E-BP.

Cambios en los niveles de expresión de eIF4E y 4E-BP, su incidencia en el ciclado del calcio y función cardíaca.

Nuestros experimentos han permitido demostrar que la sobreexpresión de 4E-BP mejora la contractilidad cardíaca a través de mecanismos fisiológicos que regulan el ciclado del Ca^{+2}_i . A los 7 días de edad se observó un aumento en la amplitud del transitorio de Ca^{+2}_i , acompañado por un aumento en las velocidades de contracción y relajación ($+d\Delta F/F_0/dt$ y $-d\Delta F/F_0/dt$). La constante de relajación Tau mostró una disminución siendo ésta coincidente con un aumento en la actividad de la SERCA. La carga de Ca^{+2}_i del retículo sarcoplasmático no se vio afectada, mientras que la fracción de liberación se encontró aumentada, siendo esto último posiblemente producto de una mayor actividad de los RyR2, cuyo análisis está comprendido fuera del marco de este estudio. Nuestros hallazgos soportan los efectos observados tanto de la ausencia del gen como la sobreexpresión sobre la función cardíaca (110). Estos efectos beneficiosos de la sobreexpresión de 4E-BP se observaron parcialmente a los 40 días de edad. Presentando las moscas envejecidas un aumento en la amplitud del transitorio de Ca^{+2}_i y de las velocidades de contracción y relajación respecto a las moscas control.

Por otro lado, cuando se sobreexpresó eIF4E no se observaron cambios significativos en los parámetros fisiológicos medidos. Esto muestra que una reducción en la disponibilidad de eIF4E (mediante sobreexpresión de 4E-BP) pero no un exceso de ésta (sobreexpresión de eIF4E) sería el motivo por el cual se producen cambios en el ciclado de calcio. Sin embargo, la actividad de la SERCA está aumentada y la constante de relajación Tau tiende a disminuir a los 7 días de edad. Efectos que no se observan a los 40 días. Si bien la SERCA posee una mayor actividad ésta no se ve reflejada en los otros parámetros medidos, como son la fracción de liberación y el contenido de calcio del retículo. Esto puede deberse a una pérdida de calcio en diástole. De este modo, el mayor calcio introducido por la bomba SERCA más activa no se traduce en un aumento de carga en el retículo o de liberación durante la sístole. Por lo tanto, sobreexpresar eIF4E podría estar de algún modo aumentando la frecuencia de los fenómenos de pérdida de calcio hacia el citosol por los canales de rianodina en un estado "leaky" llamados ondas o chispas de Ca^{+2} (121). De igual manera, la sobreexpresión de eIF4E no produjo modificaciones en el ciclado del Ca^{+2}_i a los 40 días de edad, envejeciendo estas moscas de manera similar a las moscas control.

La interferencia de 4E-BP muestra que los parámetros medidos se comportan de manera semejante que en la línea control (amplitud del transitorio de Ca^{+2}_i , derivadas negativa y positiva, carga de Ca^{+2}_i del retículo sarcoplasmático, fracción de liberación, actividad de la SERCA y tiempo de relajación Tau no cambian). En cambio, en la línea que porta la interferencia de eIF4E tales parámetros tienden a comportarse de manera similar a los observados mediante la sobreexpresión de 4E-BP (aumento de la amplitud del transitorio de Ca^{+2}_i , aumento en las derivadas tanto positiva como negativa). Dado que la sobreexpresión de 4E-BP conduciría a un mayor secuestro de eIF4E por parte de éste, si bien los resultados de esta línea fueron parcial pero no completamente similares a los de la sobreexpresión de 4E-BP, esto puede deberse a que la reducción por ARNi no alcanzó a disminuir de modo suficiente los

niveles de eIF4E disponibles. Cabe destacar que las moscas que poseen ARN interferentes suelen poseer niveles variables de efectividad en el silenciamiento de los mensajeros diana, por lo que no se le puede atribuir un efecto significativo en la reducción de las proteínas que regulan de modo negativo.

Cuando se utilizó la estrategia de inanición con el fin de probar los resultados hallados mediante las modificaciones génicas de las proteínas de interés, se encontró que inhibir de manera sistémica la quinasa TOR mediante la exposición a 48 horas de inanición arrojó resultados similares a la sobreexpresión de 4E-BP en tejido cardíaco (en ambos casos la amplitud del transitorio de Ca^{+2}_i aumentó, acompañada de un aumento en las velocidades de contracción y relajación, de la actividad de la SERCA y una disminución en el tiempo de relajación Tau) . Esto es debido a que inhibir TOR conduce a un aumento en la cantidad de 4E-BP hipofosforilada en el citosol (118). Este aumento puede compararse con su aumento mediante sobreexpresión génica, observándose así que es la mayor cantidad de 4E-BP en citosol lo que produce los efectos observados, resultados que se conciben con lo visto previamente por otros autores (109). Las diferencias observadas entre la inhibición de TOR y la sobreexpresión de 4E-BP pueden deberse a que la inhibición por inanición está dada a nivel sistémico. Un ejemplo de esto es el aumento en la frecuencia cardíaca. Está documentado que la inanición produce un aumento en la frecuencia cardíaca, no por la disminución de la actividad de TOR en tejido cardíaco sino por la activación de mecanismos de señalización que conducen a una mayor frecuencia cardíaca (119). Para poder discernir los efectos de la inhibición de TOR más allá de la inanición, ya que ésta produce otros efectos además de la inhibición de esta quinasa, la mejor estrategia es administrar Rapamicina. Estos experimentos quedaron pendientes por el momento debido a la falta de esta droga, pero pronto a realizarse.

Si bien desde el punto de vista del ciclado del calcio las modificaciones en los niveles génicos de eIF4E y 4E-BP mostraron variaciones con respecto al control, a la hora de evaluar la función cardíaca en función de la generación de arritmias no se observaron cambios más que en la línea que sobreexpresa eIF4E. Este resultado hallado a los siete días de edad es sostenido por los hallazgos previos realizados por Wessells y colaboradores (110). Sin embargo, cabe mencionar que los resultados obtenidos por ellos hacen referencia a un índice de arritmias calculado como la respuesta de los corazones a un estrés inducido por *marcapaseo*. En cambio, nuestros resultados devienen de calcular el índice de arritmias como la variabilidad de la frecuencia en condiciones espontáneas, sin someter a los corazones a ninguna intervención estresante. Esto puede explicar por qué nosotros no observamos variación en el desarrollo de arritmias en otras líneas a diferencia de lo reportado por Wessells y colaboradores.

Posible mecanismo molecular de los efectos cardíacos de 4E-BP y descubrimiento de una nueva interacción proteína-proteína.

Hemos mostrado que la modulación de la actividad cardíaca por las proteínas eIF4E y 4E-BP se relaciona con cambios en el ciclado de Ca^{+2}_i . Uno de los fenómenos subcelulares afectados fue la actividad de la bomba Ca^{+2}_i ATPasa del retículo sarcoplasmático o SERCA. Dado que no se conoce una influencia directa de las proteínas 4E-BP y eIF4E sobre los efectores que regulan el Ca^{+2}_i , posiblemente estos resultados constituyen la evidencia de una función no canónica de ambas proteínas en corazón, diferente a la síntesis proteica que es la función conocida en las que tanto eIF4E como 4E-BP participan. Nuestros ensayos de traducción aportaron evidencias de las que se concluye que la síntesis general de proteínas no se modifica ante la sobreexpresión de eIF4E y 4E-BP, si bien no descartamos que existan aumentos o reducción de la síntesis proteica de algún efector particular que interviene en el ciclado del calcio, no detectables por este método. Esto debe corroborarse mediante Western Blot, pero al momento no se encuentran disponibles anticuerpos contra muchas de las proteínas involucradas en el ciclado del calcio en *Drosophila* y los anticuerpos desarrollados en mamíferos no reaccionan de manera cruzada con las proteínas de *Drosophila melanogaster*.

Entre las acciones no vinculadas a la traducción, pensamos una posible interacción directa entre la SERCA, proteína involucrada en el ciclado del Ca^{2+}_i y alguno de estos efectores de la vía TOR. La búsqueda informática arrojó como resultado que dentro de la secuencia aminoacídica de la proteína SERCA de *Drosophila melanogaster* se encuentra la secuencia consenso de interacción con eIF4E presente en la familia de proteínas 4E-BP (YXXXXLϕ). Dada la existencia de esta secuencia en el extremo N terminal citosólico de SERCA podría ser posible que estas dos proteínas estuvieran interaccionando físicamente en el citosol del cardiomiocito. El ensayo de doble híbrido nos permitió corroborar que SERCA interacciona físicamente con la isoforma 4 de eIF4E, pero no con la isoforma eIF4E-1/2. Proponemos a eIF4E4 como la isoforma cardíaca de eIF4E. De esta manera, eIF4E-4 en corazón sería responsable de regular mediante una interacción física a una de las proteínas involucradas en el acoplamiento eléctrico contráctil del cardiomiocito, la SERCA, aun cuando eIF4E-1/2 se encuentre interferida. Esto explicaría además, que los parámetros funcionales medidos en corazón, mediante la sobreexpresión en tejido cardíaco de la isoforma 1 de eIF4E, no se modificaran respecto del control. El aumento de la variabilidad de la frecuencia cardíaca podría estar relacionado con la regulación de los centro marcapaso y no del ciclado del calcio.

A su vez, la línea portadora del ARN interferente posee un silenciamiento de la isoforma 1/2 de eIF4E y no de la isoforma 4. Los resultados hallados en esta línea, coincidentes parcialmente con lo observado en la línea que sobreexpresa 4E-BP, pueden deberse a una disminución de la expresión de la isoforma 4 mediante este ARN interferente dada el parecido entre las secuencias génicas de ambas isoformas o, a que, reducir la isoforma 1 de eIF4E (por quien 4E-BP posee mayor afinidad) dejaría más unidades de 4E-BP libres capaces de unirse a eIF4E-4 y provocar los efectos encontrados. De esta manera, reducir eIF4E-1 provocaría un aumento en la cantidad de 4E-BP libres por falta de sustrato y, por lo tanto, una mayor disponibilidad para interactuar con eIF4E-4 para con quien posee una menor afinidad.

Es posible que en el corazón de *Drosophila melanogaster* eIF4E-4 cumpla un rol regulando la actividad de la SERCA. En mamíferos la SERCA se encuentra regulada negativamente por una proteína llamada fosfolamban (81, 82). *Drosophila* no presenta homólogo alguno para esta proteína. Si bien, se han encontrado pequeños péptidos homólogos a fosfolamban (84) aún no se sabe con claridad si estos se expresan en tejido cardíaco y si cumplen un rol regulatorio de la SERCA.

El análisis por espectrometría de masas nos permitió identificar péptidos provenientes de la digestión trípica de eIF4E-4, lo que nos permite inferir la expresión de esta isoforma en el corazón de *Drosophila melanogaster*. De esta manera, mostrando la expresión de eIF4E-4 en tejido cardíaco, donde hasta el momento no se había descrito, reforzamos la idea de una interacción específica en corazón entre eIF4E-4 y SERCA.

Además, existen varias proteínas denominadas “4E-IP” (4E *interaction proteins*) que no pertenecen a la familia de 4E-BPs pero que interaccionan con distintas isoformas de eIF4E en diversos organismos. Estas 4E-IP no poseen origen evolutivo en común y suelen desempeñar roles celulares distintos a la regulación de la traducción. Entre ellas se hallan Maskin, una proteína de *Xenopus* cuya función canónica es el montaje del uso mitótico durante la mitosis y es capaz de unirse a eIF4E-1A en esta especie; HOXA9 en humanos, quien se une a eIF4E1 pero cuya función es como factor de transcripción participando principalmente en la hematopoyesis; Bicoid de *Drosophila*, un factor de transcripción que participa en la embriogénesis y además puede unirse a la isoforma 8 de eIF4E; entre muchas otras (122). Teniendo en cuenta esto, nos es posible plantear a la SERCA como una 4E-IP, interactuando con eIF4E-4 en el tejido cardíaco de *Drosophila*. En gran medida, las llamadas 4E-IP se plantean como una ventaja evolutiva en cada organismo, donde se “recicla” una proteína para poder llevar a cabo más de una función, confiriéndole a la célula un menor gasto energético sin perder funcionalidad.

Del mismo modo, se han encontrado varias proteínas que interactúan y modulan a la bomba SERCA en el cardiomiocito. Es así como se ha demostrado la existencia de un “*reguloma*” de SERCA compuesto por proteínas no involucradas en el manejo del calcio como lo son HAX-1 (*HS-1 associated protein X-1*), Hsp20 (*heat shock protein 20*) y SUMO1, entre otras (123). Cada vez son más las proteínas que se encuentran en este *reguloma*, por lo que no descartamos la posibilidad de que eIF4E forme parte de éste.

Si bien el análisis bioinformático nos valió para encontrar secuencias consenso de interacción, a la hora de chequear si la unión entre SERCA y eIF4E-4 estaba dada por el sitio putativo encontramos que al menos la mutación de 3 aminoácidos esenciales para la interacción de 4E-BP con las proteínas eIF4E, no impide la interacción entre SERCA y eIF4E-4. Además, nuestros resultados de doble híbrido no muestran interacción entre eIF4E-4 y 4E-BP. Estos resultados se contradicen con lo publicado en bibliografía, donde se ha mostrado la interacción entre eIF4E-4 y 4E-BP (48). Las diferencias encontradas se deben a que para la realización de nuestro ensayo de doble híbrido utilizamos medios muy astringentes, que nos permitieran observar solo las interacciones muy fuertes entre proteínas. Dado que en estos medios no observamos interacción de eIF4E-4 con 4E-BP pero sí con SERCA, podemos decir que la interacción con SERCA es más fuerte, pudiéndose observar en medios muy astringentes y soportando la idea de que se requiere mucha 4E-BP para lograr competir con esta interacción, efecto que se ve al sobreexpresar 4E-BP.

A partir de los datos arrojados en la presente tesis, proponemos una relación entre 4E-BP, eIF4E-4 y SERCA en tejido cardíaco, donde la SERCA actúa como una 4E-IP. Esta interacción, a su vez, modularía la actividad de la SERCA supliendo la ausencia de fosfolamban en *Drosophila melanogaster*. Dado que eIF4E-4 en el adulto solo se ha hallado expresada en corazón (resultados presentados en esta tesis), esta interacción le conferiría una ventaja funcional al cardiomiocito del corazón adulto de *Drosophila melanogaster*.

Conclusión gráfica

Ante niveles basales de 4E-BP, eIF4E-4 se encuentra unida a la SERCA modulando su actividad.

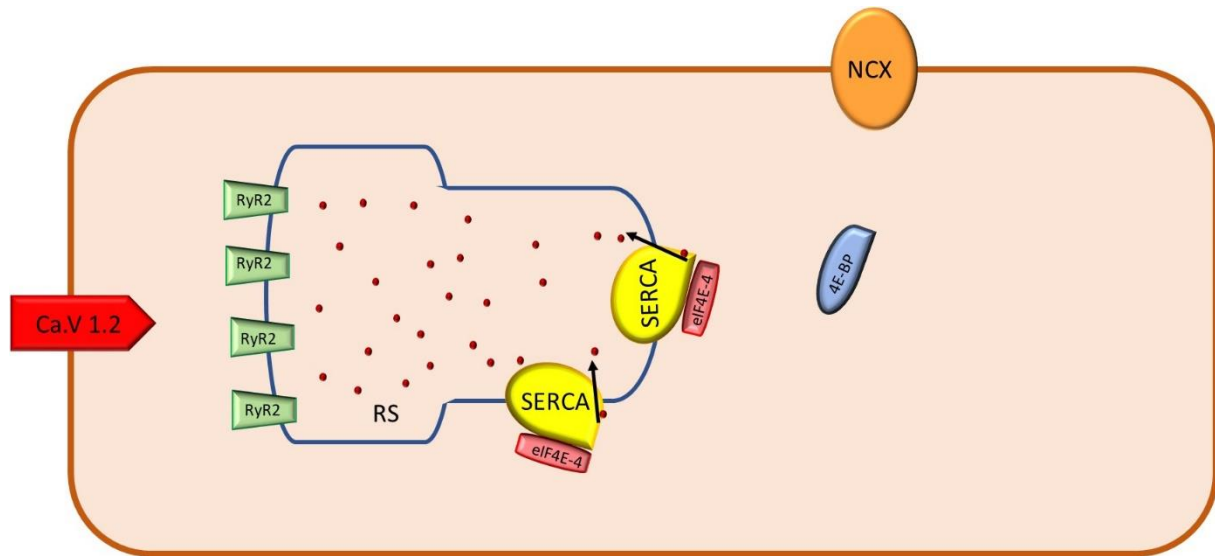


Figura 55: Esquema representativo del cardiomiocito de *Drosophila melanogaster* donde CaV1.2 corresponde al canal de calcio tipo L de la membrana plasmática; RyR2 al receptor de rianodina de la membrana del retículo sarcoplasmático (RS); SERCA la bomba calcio/ATPasa del RS; eIF4E-4 es la isoforma 4 del factor eucariótico de inicio de la traducción eIF4E; 4E-BP es la proteína de unión a eIF4E y NCX el intercambiador sodio/calcio de la membrana del cardiomiocito; los puntos rojos corresponden al ion Ca^{*2} .

Mediante la sobreexpresión de 4E-BP se produce un aumento de esta proteína en el citosol del cardiomiocito. Ésta compete con SERCA por su unión con eIF4E-4. Al haber más cantidad de 4E-BP libre eIF4E-4 se une a ésta, dejando a la bomba SERCA libre y modificando así su actividad.

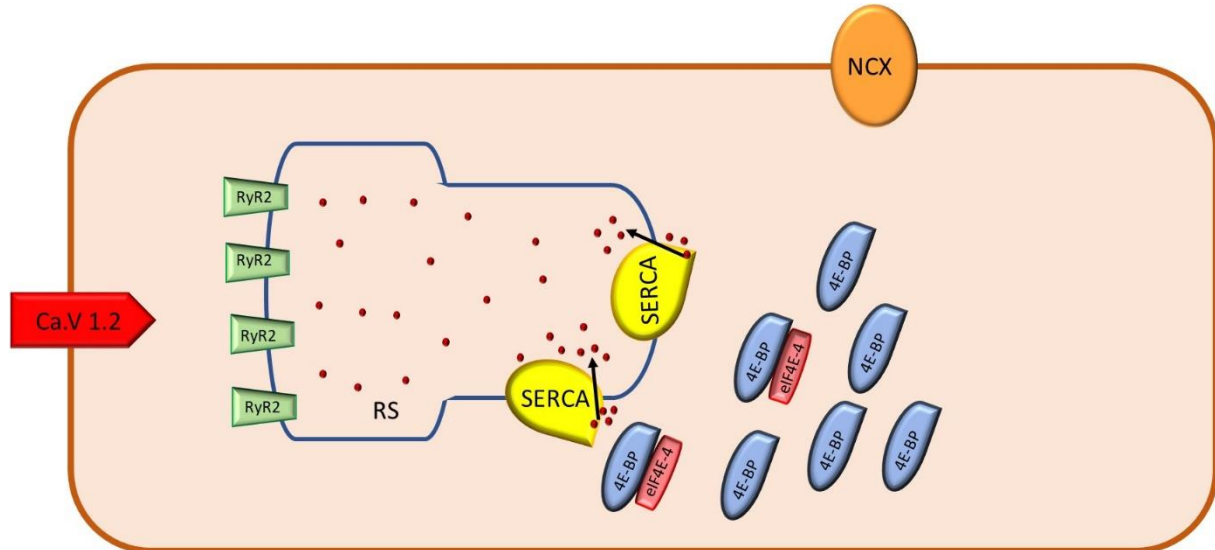


Figura 56: Esquema del cardiomiocito en condiciones de aumento de 4E-BP, en las cuales eIF4E se une a éste dejando a SERCA libre desencadenando el aumento en su actividad.

La presente tesis muestra por primera vez un rol de las proteínas eIF4E y 4E-BP en la fisiología cardiovascular, utilizando a Drosophila melanogaster como modelo genético de estudio. Pudimos demostrar una nueva interacción física entre proteínas aparentemente no relacionadas, planteando nuevos roles a la familia de proteínas eIF4E más allá del rol canónico de eIF4E y 4E-BP en la regulación del inicio de la traducción.

REFERENCIAS

1. MORGAN T. THE MECHANISM OF MENDELIAN HEREDITY. 1915. HENRY HOLT AND COMPANY. NEW YORK
2. VAN HEYNINGEN V. MODEL ORGANISMS ILLUMINATE HUMAN GENETICS AND DISEASE. *MOL MED.* 1997 APR;3(4):231-7.
3. RASMUSON-LESTANDER A. THE DROSOPHILA STOCK CENTERS AND THEIR IMPLICATIONS FOR DEVELOPMENTAL BIOLOGY. *INT J DEV BIOL.* 1995 OCT;39(5):765-8.
4. ADAMS MD, CELNIKER SE, HOLT RA ET AL. (2000) THE GENOME SEQUENCE OF DROSOPHILA MELANOGASTER. *SCIENCE* 287: 2185Y2195.
5. CHIEN S, ET AL. HOMOPHILA: HUMAN DISEASE GENE COGNATES IN DROSOPHILA. *NUCLEIC ACIDS RES* 2002;30 (1):149–51.
6. FORTINI ME, ET AL. A SURVEY OF HUMAN DISEASE GENE COUNTERPARTS IN THE DROSOPHILA GENOME. *J CELL BIOL* 2000;150(2):F23–30.
7. REITER LT, ET AL. A SYSTEMATIC ANALYSIS OF HUMAN DISEASE-ASSOCIATED GENE SEQUENCES IN DROSOPHILA MELANOGASTER. *GENOME RES* 2001;11(6):1114–25.
8. RULIFSON EJ, KIM SK, NUSSE R. ABLATION OF INSULIN-PRODUCING NEURONS IN FLIES: GROWTH AND DIABETIC PHENOTYPES. *SCIENCE* 2002; 296(5570):1118-20.
9. PAK WL. DROSOPHILA IN VISION RESEARCH. THE FRIEDENWALD LECTURE. *INVEST OPHTHALMOL Vis Sci.* 1995 Nov;36(12):2340-57.
10. MECHLER BM, STRAND D, KALMES A, MERZ R, SCHMIDT M, TÖRÖK I. DROSOPHILA AS A MODEL SYSTEM FOR MOLECULAR ANALYSIS OF TUMORIGENESIS. *ENVIRON HEALTH PERSPECT.* 1991 JUN;93:63-71.
11. CHAN HY, BONINI NM. DROSOPHILA MODELS OF HUMAN NEURODEGENERATIVE DISEASE. *CELL DEATH DIFFER.* 2000 Nov;7(11):1075-80.
12. AMBEGAOKAR SS, ROY B, JACKSON GR. NEURODEGENERATIVE MODELS IN DROSOPHILA: POLYGLUTAMINE DISORDERS, PARKINSON DISEASE, AND AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. *NEUROBIOL Dis* 2010; 40(1):29-39.
13. TAN FHP, AZZAM G. DROSOPHILA MELANOGASTER: DECIPHERING ALZHEIMER'S DISEASE. *MALAYS J MED SCI.* 2017 MAR;24(2):6-20. DOI: 10.21315/MJMS2017.24.2.2. EPUB 2017 APR 14.
14. BIER, E. DROSOPHILA, THE GOLDEN BUG, EMERGES AS A TOOL FOR HUMAN GENETICS. *NAT REV GENET* 2005; 6(1):9–23.
15. BIER E, BODMER R. DROSOPHILA, AN EMERGING MODEL FOR CARDIAC DISEASE. *GENE.* 2004 NOV 10;342(1):1-11.
16. WOLF MJ, ROCKMAN HA. DROSOPHILA MELANOGASTER AS A MODEL SYSTEM FOR GENETICS OF POSTNATAL CARDIAC FUNCTION. *DRUG DISCOV TODAY Dis MODELS.* 2008 OCT 1;5(3):117-123.
17. PIAZZA N, WESSELLS RJ. DROSOPHILA MODELS OF CARDIAC DISEASE. *PROG MOL BIOL TRANSL Sci.* 2011;100:155-210.
18. PASTOR PAREJA JC, BLANCO, EM, GARCIA-BELLIDO, A. EVERSIÓN Y CIERRE DE LOS DISCOS IMAGINALES. *INVESTIGACIÓN Y CIENCIA* 2006:72-81.
19. WIGGLESWORTH, V. B. (1984). "INSECT PHYSIOLOGY," 4TH ED. CHAPMAN AND HALL, LONDON.
20. RIZKI, T. M. (1978). THE CIRCULATORY SYSTEM AND ASSOCIATED CELLS AND TISSUES. IN "THE GENETICS AND BIOLOGY OF DROSOPHILA" (M. ASHBURNER, AND T. R. F. WRIGHT, Eds.), VOL. 2B, PP. 397–452. ACADEMIC PRESS, NEW YORK.
21. MOLINA, M. R., AND CRIPPS, R. M. (2001). OSTIA, THE INFLOW TRACTS OF THE DROSOPHILA HEART, DEVELOP FROM A GENETICALLY DISTINCT SUBSET OF CARDIAL CELLS. *MECH. DEV.* 109, 51–59
22. CRIPPS RM, OLSON EN. CONTROL OF CARDIAC DEVELOPMENT BY AN EVOLUTIONARILY CONSERVED TRANSCRIPTIONAL NETWORK. *DEV BIOL.* 2002 JUN 1;246(1):14-28

23. BODMER, R. (1993). THE GENE *TINMAN* IS REQUIRED FOR SPECIFICATION OF THE HEART AND VISCERAL MUSCLES IN *DROSOPHILA*. *DEVELOPMENT* 118, 719–729
24. AZPIAZU, N., AND FRASCH, M. (1993). *TINMAN* AND *BAGPIPE*: TWO HOMEODOMAIN GENES THAT DETERMINE CELL FATES IN THE DORSAL MESODERM OF *DROSOPHILA*. *GENES DEV.* 7, 1325–1340
25. BODMER, R., AND FRASCH, M. (1999). GENETIC DETERMINATION OF *DROSOPHILA* HEART DEVELOPMENT. IN “HEART DEVELOPMENT” (R. P. HARVEY AND N. ROSENTHAL, Eds.), pp. 65–90. ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO.
26. TAO E, SCHULZ RA. HEART DEVELOPMENT IN *DROSOPHILA*. *SEMIN CELL DEV BIOL.* 2007 FEB;18(1):3-15. EPUB 2006 DEC 5.
27. SANTINI MP, FORTE E, HARVEY RP, KOVACIC JC. DEVELOPMENTAL ORIGIN AND LINEAGE PLASTICITY OF ENDOGENOUS CARDIAC STEM CELLS. *DEVELOPMENT.* 2016 APR 15;143(8):1242-58.
28. BODMER R, GOLDEN K, LOCKWOOD WB, OCORR KA, PARK M, SU M-T, VENKATESH TV (1997). HEART DEVELOPMENT IN *DROSOPHILA*. IN WASSARMAN P (ED): “ADVANCES IN DEVELOPMENTAL BIOLOGY, VOL. 5.” GREENWICH CT: JAI PRESS, PP 201:236
29. LYONS I, PARSONS LM, HARTLEY L, LI R, ANDREWS JE, ROBB L, HARVEY RP (1995). MYOGENIC AND MORFOGENIC DEFECTS IN THE HEART TUBES OF MURINE EMBRYOS LACKING THE HOMEODOMAIN HEN *NKX2-5*. *GENES DEV* 9:1654-1666
30. PARK, M., YAICH, L. E., AND BODMER, R. (1998). MESODERMAL CELL FATE DECISIONS IN *DROSOPHILA* ARE UNDER THE CONTROL OF THE LINEAGE GENES *NUMB*, *NOTCH*, AND *SANPODO*. *MECH. DEV.* 75, 117–126
31. N.J. CURTIS, J.M. RINGO AND H.B. DOWSE. MORPHOLOGY OF THE PUPAL HEART, ADULT HEART, AND ASSOCIATED TISSUES IN THE FRUIT FLY, *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *J. MORPHOL.* 240:225–235, 1999.
32. DULCIS D, LEVINE RB. GLUTAMATERGIC INNERVATIONS OF THE HEART INITIATES RETROGRADE CONTRACTIONS IN ADULT *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *J NEUROSCI* 2005; 25(2):271–80.
33. WASSERTHAL LT. *DROSOPHILA* FLIES COMBINE PERIODIC HEARTBEAT REVERSAL WITH A CIRCULATION IN THE ANTERIOR BODY MEDIATED BY A NEWLY DISCOVERED ANTERIOR PAIR OF OSTIAL VALVES AND ‘VENOUS’ CHANNELS. *J EXP BIOL* 2007; 210(Pt 21):3707-19.
34. DULCIS D, LEVINE RB. INNERVATION OF THE HEART OF THE ADULT FRUIT FLY, *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *J COMP NEUROL.* 2003; 465(4):560-78.
35. LAPLANTE M, SABATINI DM. mTOR SIGNALING IN GROWTH CONTROL AND DISEASE. *CELL.* 2012 APR 13;149(2):274-93. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
36. MA XM, BLENIS J. MOLECULAR MECHANISMS OF mTOR-MEDIATED TRANSLATIONAL CONTROL. *NAT REV MOL CELL BIOL.* 2009 MAY;10(5):307-18.
37. JACINTO E, FACCHINETTI V, LIU D, SOTO N, WEI S, JUNG SY, HUANG Q, QIN J, SU B. *SIN1/MIP1* MAINTAINS RICTOR-mTOR COMPLEX INTEGRITY AND REGULATES AKT PHOSPHORYLATION AND SUBSTRATE SPECIFICITY. *CELL.* 2006 OCT 6;127(1):125-37. EPUB 2006 SEP 7.
38. SHATKIN AJ. CAPPING OF EUKARYOTIC MRNAs. *CELL.* 1976 DEC;9(4 PT 2):645-53.
39. CAPONIGRO G, PARKER R. MECHANISMS AND CONTROL OF mRNA TURNOVER IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *MICROBIOL REV.* 1996 MAR;60(1):233-49.
40. GINGRAS, AC, RAUGHT, B, SONENBERG, N. eIF4 INITIATION FACTORS: EFFECTORS OF mRNA RECRUITMENT TO RIBOSOMES AND REGULATORS OF TRANSLATION. *ANNU. REV. BIOCHEM.* 1999; 68, 913–963.
41. HERNÁNDEZ G, ALTMANN M, LASKO P. ORIGINS AND EVOLUTION OF THE MECHANISMS REGULATING TRANSLATION INITIATION IN EUKARYOTES. *TRENDS BIOCHEM SCI.* 2010 FEB;35(2):63-73.
42. RICHTER JD, SONENBERG N. REGULATION OF CAP-DEPENDENT TRANSLATION BY eIF4E INHIBITORY PROTEINS. *NATURE.* 2005 FEB 3;433(7025):477-80.
43. MARCOTRIGIANO, J, GINGRAS, AC, SONENBERG, N, BURLEY, SK. COCRYSTAL STRUCTURE OF THE MESSENGER RNA 50 CAP-BINDING PROTEIN (eIF4E) BOUND TO 7-METHYL-GDP. *CELL* 1997; 89, 951–961.
44. MATSUO, H, LI, H, MCGUIRE, AM, FLETCHER, CM, GINGRAS, AC, SONENBERG, N, WAGNER, G. STRUCTURE OF TRANSLATION FACTOR eIF4E BOUND TO m7GDP AND INTERACTION WITH 4E-BINDING PROTEIN. *NAT. STRUCT. BIO* 1997; 717–724.

45. TOMOO, K, SHEN, J, OKABE, K, NOZOE, Y, FUKUHARA, S, MORINO, S, ISHIDA T, TANIGUCHI T, HASEGAWA H, TERASHIMA A, SASAKI M, KATSUYA Y, KITAMURA K, MIYOSHI H, ISHIKAWA M, MIURA K. CRYSTAL STRUCTURES OF 7-METHYLGUANOSINE 50-TRIPHOSPHATE (m7GTP)- AND P1-7- METHYLGUANOSINE-P3-ADENOSINE-50, 50-TRIPHOSPHATE (m7Gpppa)-BOUND HUMAN FULLLENGTH EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E: BIOLOGICAL IMPORTANCE OF THE C-TERMINAL FLEXIBLE REGION. *BIOCHEM. J.* 2002; 362, 539–544.
46. JOSHI, B, CAMERON, A, JAGUS, R, CHARACTERIZATION OF MAMMALIAN EIF4E-FAMILY MEMBERS. *EUR. J. BIOCHEM.* 2004; 271, 2189–2203.
47. WASKIEWICZ AJ, FLYNN A, PROUD CG, COOPER JA. MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES ACTIVATE THE SERINE/THREONINE KINASES MNK1 AND MNK2. *EMBO J.* 1997; 16(8):1909-20.
48. HERNÁNDEZ G, ALTMANN M, SIERRA JM, URLAUB H, DIEZ DEL CORRAL R, SCHWARTZ P, RIVERA-POMAR R. FUNCTIONAL ANALYSIS OF SEVEN GENES ENCODING EIGHT TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E (EIF4E) ISOFORMS IN DROSOPHILA. *MECH DEV.* 2005; 122(4):529-43.
49. VASILESCU S, PTUSHKINA M, LINZ B, MÜLLER PP, MCCARTHY JE. MUTANTS OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR EIF-4E WITH ALTERED MRNA CAP BINDING SPECIFICITY REPROGRAM MRNA SELECTION BY RIBOSOMES IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *J BIOL CHEM.* 1996;271(12):7030- 7.
50. SCHEPER, GC, VAN KOLLENBURG, B, HU, J, LOU, Y, GOSS, DJ, PROUD, CG, PHOSPHORYLATION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E MARKEDLY REDUCES ITS AFFINITY FOR CAPPED MRNA. *J. BIOL. CHEM.* 2002; 277,3303–3309.
51. GROSS, JD, MOERKE, N., VON DER HAAR, T, LUGOVSKOY, AA, SACHS, AB, MCCARTHY, JEG, WAGNER, G. RIBOSOME LOADING ONTO THE MRNA CAP IS DRIVEN BY CONFORMATIONAL COUPLING BETWEEN EIF4G AND EIF4E. *CELL* 2003; 115, 739–750.
52. MCKENDRICK, L, MORLEY, SJ, PAIN, VM, JAGUS, R, JOSHI, B. PHOSPHORYLATION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E (EIF4E) AT SER209 IS NOT REQUIRED FOR PROTEIN SYNTHESIS IN VITRO AND IN VIVO. *EUR. J. BIOCHEM.* 2001; 268, 5375–5385.
53. SCHEPER, GC, VAN KOLLENBURG, B, HU, J, LOU, Y, GOSS, DJ, PROUD, CG, PHOSPHORYLATION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4E MARKEDLY REDUCES ITS AFFINITY FOR CAPPED MRNA. *J. BIOL. CHEM.* 2002; 277,3303–3309.
54. LACHANCE, PED, MIRON, M, RAUGHT, B, SONENBERG, N, LASKO, P. PHOSPHORYLATION OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E IS CRITICAL FOR GROWTH. *MOL. CELL. BIOL.* 2002; 22,1656–1663.
55. WANG X, FLYNN A, WASKIEWICZ AJ, WEBB BL, VRIES RG, BAINES IA, COOPER JA, PROUD CG. THE PHOSPHORYLATION OF EUKARYOTIC INITIATION FACTOR EIF4E IN RESPONSE TO PHORBOL ESTERS, CELL STRESSES, AND CYTOKINES IS MEDIATED BY DISTINCT MAP KINASE PATHWAYS. *J BIOL CHEM.* 1998; 273(16):9373-7
56. WASKIEWICZ AJ, JOHNSON JC, PENN B, MAHALINGAM M, KIMBALL SR, COOPER JA. PHOSPHORYLATION OF THE CAP-BINDING PROTEIN EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E BY PROTEIN KINASE MNK1 IN VIVO. *MOL CELL BIOL.* 1999; 19(3):1871-80.
57. FERRERO PV, LAYANA C, PAULUCCI E, GUTIÉRREZ P, HERNÁNDEZ G, RIVERA-POMAR RV. CAP BINDING-INDEPENDENT RECRUITMENT OF EIF4E TO CYTOPLASMIC FOCI. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA.* 2012; 1823(7):1217-24.
58. LAYANA C, FERRERO P, RIVERA-POMAR R. CYTOPLASMIC RIBONUCLEOPROTEIN FOCI IN EUKARYOTES: HOTSPOTS OF BIO (CHEMICAL) DIVERSITY. *COMP FUNCT GENOMICS.* 2012; 2012:504292.
59. HARRISON DE, STRONG R, SHARP ZD, NELSON JF, ASTLE CM, FLURKEY K, NADON NL, WILKINSON JE, FRENKEL K, CARTER CS, PAHOR M, JAVORS MA, FERNANDEZ E, MILLER RA. RAPAMYCIN FED LATE IN LIFE EXTENDS LIFESPAN IN GENETICALLY HETEROGENEOUS MICE.
60. MILLER RA, HARRISON DE, ASTLE CM, BAUR JA, BOYD AR, DE CABO R, FERNANDEZ E, FLURKEY K, JAVORS MA, NELSON JF, ORIHUELA CJ, PLETCHER S, SHARP ZD, SINCLAIR D, STARNES JW, WILKINSON JE, NADON NL, STRONG R. RAPAMYCIN, BUT NOT RESVERATROL OR SIMVASTATIN, EXTENDS LIFE SPAN OF GENETICALLY HETEROGENEOUS MICE. *J GERONTOL A BIOL SCI MED SCI.* 2011 FEB;66(2):191-201.
61. MILLER RA, HARRISON DE, ASTLE CM, FERNANDEZ E, FLURKEY K, HAN M, JAVORS MA, LI X, NADON NL, NELSON JF, PLETCHER S, SALMON AB, SHARP ZD, VAN ROEKEL S, WINKLEMAN L, STRONG R. RAPAMYCIN-

- MEDIATED LIFESPAN INCREASE IN MICE IS DOSE AND SEX DEPENDENT AND METABOLICALLY DISTINCT FROM DIETARY RESTRICTION. *AGING CELL*. 2014 JUN;13(3):468-77.
62. BJEDOV I, TOIVONEN JM, KERR F, SLACK C, JACOBSON J, FOLEY A, PARTRIDGE L. MECHANISMS OF LIFE SPAN EXTENSION BY RAPAMYCIN IN THE FRUIT FLY *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *CELL METAB*. 2010 JAN;11(1):35-46.
 63. PARTRIDGE L, ALIC N, BJEDOV I, PIPER MD. AGEING IN *DROSOPHILA*: THE ROLE OF THE INSULIN/IGF AND TOR SIGNALLING NETWORK. *EXP GERONTOL*. 2011 MAY;46(5):376-81.
 64. P. KAPAHI, B.M. ZID, T. HARPER, D. KOSLOVER, V. SAPIN, S. BENZER. REGULATION OF LIFESPAN IN *DROSOPHILA* BY MODULATION OF GENES IN THE TOR SIGNALING PATHWAY. *CURR. BIOL.*, 14 (2004), PP. 885–890
 65. PATEL NV, GORDON MN, CONNOR KE, GOOD RA, ENGELMAN RW, MASON J, MORGAN DG, MORGAN TE, FINCH CE. CALORIC RESTRICTION ATTENUATES ABETA-DEPOSITION IN ALZHEIMER TRANSGENIC MODELS. *NEUROBIOL AGING*. 2005 JUL;26(7):995-1000.
 66. QIN W, CHACHICH M, LANE M, ROTH G, BRYANT M, DE CABO R, OTTINGER MA, MATTISON J, INGRAM D, GANDY S, PASINETTI GM. CALORIE RESTRICTION ATTENUATES ALZHEIMER'S DISEASE TYPE BRAIN AMYLOIDOSIS IN SQUIRREL MONKEYS (*SAIMIRI SCIUREUS*). *J ALZHEIMERS DIS*. 2006 DEC;10(4):417-22.
 67. LANE MA, INGRAM DK, ROTH GS. CALORIE RESTRICTION IN NONHUMAN PRIMATES: EFFECTS ON DIABETES AND CARDIOVASCULAR DISEASE RISK. *TOXICOL Sci*. 1999 DEC;52(2 SUPPL):41-8.
 68. FABIATO A, FABIATO F. USE OF CHLOROTETRACYCLINE FLUORESCENCE TO DEMONSTRATE Ca^{2+} -INDUCED RELEASE OF Ca^{2+} FROM THE SARCOPLASMIC RETICULUM OF SKINNED CARDIAC CELLS. *NATURE*. 1979 SEP 13;281(5727):146-8.
 69. LENZI F, CANIGGIA A. NATURE OF MYOCARDIAL CONTRACTION AND OF ACTION POTENTIALS; IMPORTANCE OF THE CATIONIC GRADIENT. *ACTA MED SCAND*. 1953;146(4):300-12.
 70. EBASHI S, EBASHI F, KODAMA A. TROPONIN AS THE Ca^{++} -RECEPTIVE PROTEIN IN THE CONTRACTILE SYSTEM. *J BIOCHEM*. 1967 JUL;62(1):137-8.
 71. REDDY YS, HONIG CR. Ca^{2+} -BINDING AND Ca^{2+} -SENSITIZING FUNCTIONS OF CARDIAC NATIVE TROPOMYOSIN, TROPONIN, AND TROPOMYOSIN. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA*. 1972 SEP 20;275(3):453-63.
 72. BERS DM. CARDIAC EXCITATION-CONTRACTION COUPLING. *NATURE*. 2002; 415:198–205.
 73. HEIJMAN J, VOIGT N, WEHRENS XH, DOBREV D. CALCIUM DYSREGULATION IN ATRIAL FIBRILLATION: THE ROLE OF CAMKII. *FRONT PHARMACOL*. 2014; 5:30.
 74. REDDY YS, HONIG CR. Ca^{2+} -BINDING AND Ca^{2+} -SENSITIZING FUNCTIONS OF CARDIAC NATIVE TROPOMYOSIN, TROPONIN, AND TROPOMYOSIN. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA*. 1972 SEP 20;275(3):453-63.
 75. BERS, DM. EXCITATION-CONTRACTION COUPLING AND CARDIAC CONTRACTILE FORCE. BOSTON: KLUWER ACADEMIC PUBLISHER; 2001
 76. SHAN J, KUSHNIR A, BETZENHAUSER MJ, REIKEN S, LI J, LEHNART SE, LINDEGGER N, MONGILLO M, MOHLER PJ, MARKS AR. PHOSPHORYLATION OF THE RYANODINE RECEPTOR MEDIATES THE CARDIAC FIGHT OR FLIGHT RESPONSE IN MICE. *J CLIN INVEST*. 2010;120:4388–4398.
 77. HEIJMAN J, GHEZELBASH S, WEHRENS XH, DOBREV D. SERINE/THREONINE PHOSPHATASES IN ATRIAL FIBRILLATION. *J MOL CELL CARDIOL*. 2017;103:110–120.
 78. CHIANG DY, LEBESGUE N, BEAVERS DL, ALSINA KM, DAMEN JM, VOIGT N, DOBREV D, WEHRENS XH, SCHOLTEN A. ALTERATIONS IN THE INTERACTOME OF SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE TYPE-1 IN ATRIAL FIBRILLATION PATIENTS. *J AM COLL CARDIOL*. 2015; 65:163–173
 79. QUICK AP, WANG Q, PHILIPPEN LE, BARRETO-TORRES G, CHIANG DY, BEAVERS D, WANG G, KHALID M, REYNOLDS JO, CAMPBELL HM, SHOWELL J, MCCAULEY MD, SCHOLTEN A, WEHRENS XH. SPEG (STRIATED MUSCLE PREFERENTIALLY EXPRESSED PROTEIN KINASE) IS ESSENTIAL FOR CARDIAC FUNCTION BY REGULATING JUNCTIONAL MEMBRANE COMPLEX ACTIVITY. *CIRC RES*. 2017; 120:110–119.
 80. SHAW RM, COLECRAFT HM. L-TYPE CALCIUM CHANNEL TARGETING AND LOCAL SIGNALLING IN CARDIAC MYOCYTES. *CARDIOVASC RES*. 2013; 98:177–186.

81. GUSTAVSSON M, VERARDI R, MULLEN DG, MOTE KR, TRAASETH NJ, GOPINATH T, VEGLIA, G. ALLOSTERIC REGULATION OF SERCA BY PHOSPHORYLATION-MEDIATED CONFORMATIONAL SHIFT OF PHOSPHOLAMBAN. *PROC NATL ACAD SCI USA*. 2013; 110:17338–17343.
82. KRANIAS, EG, HAJJAR, RJ. MODULATION OF CARDIAC CONTRACTILITY BY THE PHOSPHOLAMBAN/SERCA2A REGULATOME. *CIRC RES*. 2012; 110:1646–1660
83. CAMMARATO A, AHRENS CH, ALAYARI NN, QELI E, RUCKER J, REEDY MC, ZMASEK CM, GUCEK M, COLE RN, VAN EYK JE, BODMER R, O'ROURKE B, BERNSTEIN SI, FOSTER DB. A MIGHTY SMALL HEART: THE CARDIAC PROTEOME OF ADULT DROSOPHILA MELANOGASTER. *PLoS ONE* 2011; 6(4) e18497.
84. MAGNY EG, PUEYO JI, PEARL FM, CESPEDES MA, NIVEN JE, BISHOP SA, COUSO JP. CONSERVED REGULATION OF CARDIAC CALCIUM UPTAKE BY PEPTIDES ENCODED IN SMALL OPEN READING FRAMES. *SCIENCE*. 2013 SEP 6;341(6150):1116-20.
85. CINGOLANI HE-HOUSSAY AB. *FISIOLOGÍA HUMANA*. ED EL ATENEO, BUENOS AIRES. 7MA EDICIÓN. 2000, 260-264.
86. WEISS JN, GARFINKEL A, KARAGUEUZIAN HS, NGUYEN TP, OLCESE R, CHEN PS, QU Z. PERSPECTIVE: A DYNAMICS-BASED CLASSIFICATION OF VENTRICULAR ARRHYTHMIAS. *J MOL CELL CARDIOL*. 2015; 82:136–152.
87. NATTEL S, DOBREV D. ELECTROPHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF PAROXYSMAL ATRIAL FIBRILLATION. *NAT REV CARDIOL*. 2016; 13:575–590.
88. ANDERSON ME. MULTIPLE DOWNSTREAM PROARRHYTHMIC TARGETS FOR CALMODULIN KINASE II: MOVING BEYOND AN ION CHANNEL-CENTRIC FOCUS. *CARDIOVASC RES*. 2007; 73(4):657-66.
89. CARMELIET E. CARDIAC IONIC CURRENTS AND ACUTE ISCHEMIA: FROM CHANNELS TO ARRHYTHMIAS. *PHYSIOL REV*. 1999; 79(3):917-1017.
90. BERS DM. ALTERED CARDIAC MYOCYTE CA REGULATION IN HEART FAILURE. *PHYSIOLOGY (BETHESDA)*. 2006; 21:380-7.
91. LANDSTROM AP, DOBREV D, WEHRENS XHT. CALCIUM SIGNALING AND CARDIAC ARRHYTHMIAS. *CIRC RES*. 2017 JUN 9;120(12):1969-1993.
92. PRIORI SG, NAPOLITANO C, TISO N, MEMMI M, VIGNATI G, BLOISE R, SORRENTINO V, DANIELI GA. MUTATIONS IN THE CARDIAC RYANODINE RECEPTOR GENE (hRyR2) UNDERLIE CATECHOLAMINERGIC POLYMORPHIC VENTRICULAR TACHYCARDIA. *CIRCULATION*. 2001; 103:196–200.
93. LAITINEN PJ, BROWN KM, PIIPPO K, SWAN H, DEVANEY JM, BRAHMBHATT B, DONARUM EA, MARINO M, TISO N, VIITASALO M, TOIVONEN L, STEPHAN DA, KONTULA K. MUTATIONS OF THE CARDIAC RYANODINE RECEPTOR (RYR2) GENE IN FAMILIAL POLYMORPHIC VENTRICULAR TACHYCARDIA. *CIRCULATION*. 2001; 103:485–490.
94. FISH M, SHABOODIEN G, KRAUS S, SLIWA K, SEIDMAN CE, BURKE MA, CROTTI L, SCHWARTZ PJ, MAYOSI BM. MUTATION ANALYSIS OF THE PHOSPHOLAMBAN GENE IN 315 SOUTH AFRICANS WITH DILATED, HYPERTROPHIC, PERIPARTUM AND ARRHYTHMOGENIC RIGHT VENTRICULAR CARDIOMYOPATHIES. *SCI REP*. 2016; 6:22235.
95. ZHU ZI, CLANCY CE. L-TYPE CA²⁺ CHANNEL MUTATIONS AND T-WAVE ALTERNANS: A MODEL STUDY. *AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL*. 2007;293:H3480– H3489.
96. SIMON SEDEJ AND BURKERT PIESKE. MECHANISMS OF CA²⁺—TRIGGERED ARRHYTHMIAS. "TACHYCARDIA", BOOK EDITED BY TAKUMI YAMADA, ISBN 978-953-51-0413-1, PUBLISHED: MARCH 30, 2012 UNDER CC BY 3.0 LICENSE. CHAPTER 8 p169-184.
97. DOWSE H, RINGO J, POWER J, JOHNSON E, KINNEY K, WHITE L. A CONGENITAL HEART DEFECT IN DROSOPHILA CAUSED BY AN ACTION-POTENTIAL MUTATION. *J NEUROGENET*. 1995 DEC;10(3):153-68.
98. JOHNSON E, RINGO J, BRAY N, DOWSE H. GENETIC AND PHARMACOLOGICAL IDENTIFICATION OF ION CHANNELS CENTRAL TO THE DROSOPHILA CARDIAC PACEMAKER. *J NEUROGENET*. 1998 JAN;12(1):1-24.
99. PATERNOSTRO G, VIGNOLA C, BARTSCH DU, OMENS JH, MCCULLOCH AD, REED JC. AGE-ASSOCIATED CARDIAC DYSFUNCTION IN DROSOPHILA MELANOGASTER. *CIRC RES*. 2001 MAY 25;88(10):1053-8.

100. TAGHLI-LAMALLEM O, AKASAKA T, HOGG G, NUDEL U, YAFFE D, CHAMBERLAIN JS, OCORR K, BODMER R. DYSTROPHIN DEFICIENCY IN DROSOPHILA REDUCES LIFESPAN AND CAUSES A DILATED CARDIOMYOPATHY PHENOTYPE. *AGING CELL*. 2008 MAR;7(2):237-49.
101. CAMMARATO A, DAMBACHER CM, KNOWLES AF, KRONERT WA, BODMER R, OCORR K, BERNSTEIN SI. MYOSIN TRANSDUCER MUTATIONS DIFFERENTIALLY AFFECT MOTOR FUNCTION, MYOFIBRIL STRUCTURE, AND THE PERFORMANCE OF SKELETAL AND CARDIAC MUSCLES. *MOL BIOL CELL*. 2008 FEB;19(2):553-62.
102. OCORR K, REEVES NL, WESSELLS RJ, FINK M, CHEN HS, AKASAKA T, YASUDA S, METZGER JM, GILES W, POSAKONY JW, BODMER R. KCNQ POTASSIUM CHANNEL MUTATIONS CAUSE CARDIAC ARRHYTHMIAS IN DROSOPHILA THAT MIMIC THE EFFECTS OF AGING. *PROC NATL ACAD SCI U S A*. 2007 MAR 6;104(10):3943-8.
103. AKASAKA T, KLINEDINST S, OCORR K, BUSTAMANTE EL, KIM SK, BODMER R. THE ATP-SENSITIVE POTASSIUM (KATP) CHANNEL-ENCODED dSUR GENE IS REQUIRED FOR DROSOPHILA HEART FUNCTION AND IS REGULATED BY TINMAN. *PROC NATL ACAD SCI U S A*. 2006 AUG 8;103(32):11999-2004.
104. YU L, LEE T, LIN N, WOLF MJ. AFFECTING RHOMBOID-3 FUNCTION CAUSES A DILATED HEART IN ADULT DROSOPHILA. *PLOS GENET*. 2010 MAY 27;6(5):e1000969.
105. NEELY GG, KUBA K, CAMMARATO A, ISOBE K, AMANN S, ZHANG L, MURATA M, ELMÉN L, GUPTA V, ARORA S, SARANGI R, DAN D, FUJISAWA S, USAMI T, XIA CP, KEENE AC, ALAYARI NN, YAMAKAWA H, ELLING U, BERGER C, NOVATCHKOVA M, KOGLGRUBER R, FUKUDA K, NISHINA H, ISOBE M, POSPISILIK JA, IMAI Y, PFEUFER A, HICKS AA, PRAMSTALLER PP, SUBRAMANIAM S, KIMURA A, OCORR K, BODMER R, PENNINGER JM. A GLOBAL IN VIVO DROSOPHILA RNAI SCREEN IDENTIFIES NOT3 AS A CONSERVED REGULATOR OF HEART FUNCTION. *CELL*. 2010 APR 2;141(1):142-53.
106. WESSELLS RJ, FITZGERALD E, CYPSEY JR, TATAR M, BODMER R. INSULIN REGULATION OF HEART FUNCTION IN AGING FRUIT FLIES. *NAT GENET*. 2004 DEC;36(12):1275-81.
107. PIAZZA N, HAYES M, MARTIN I, DUTTARROY A, GROTEWIEL M, WESSELLS R. MULTIPLE MEASURES OF FUNCTIONALITY EXHIBIT PROGRESSIVE DECLINE IN A PARALLEL, STOCHASTIC FASHION IN DROSOPHILA SOD2 NULL MUTANTS. *BIOGERONTOLOGY*. 2009 OCT;10(5):637-48.
108. KLASSEN MP, PETERS CJ, ZHOU S, WILLIAMS HH, JAN LY, JAN YN. AGE-DEPENDENT DIASTOLIC HEART FAILURE IN AN IN VIVO DROSOPHILA MODEL. *ELIFE*. 2017 MAR 22;6. pii: e20851.
109. LUONG N, DAVIES CR, WESSELLS RJ, GRAHAM SM, KING MT, VEECH R, BODMER R, OLDHAM SM. ACTIVATED FOXO-MEDIATED INSULIN RESISTANCE IS BLOCKED BY REDUCTION OF TOR ACTIVITY. *CELL METAB*. 2006 AUG;4(2):133-42.
110. WESSELLS R, FITZGERALD E, PIAZZA N, OCORR K, MORLEY S, DAVIES C, LIM HY, ELMÉN L, HAYES M, OLDHAM S, BODMER R. d4EBP ACTS DOWNSTREAM OF BOTH dTOR AND dFOXO TO MODULATE CARDIAC FUNCTIONAL AGING IN DROSOPHILA. *AGING CELL*. 2009 SEP;8(5):542-52.
111. LIN N, BADLE N, YU L, ABRAHAM D, CHENG H, BURSAC N Y COL. A METHOD TO MEASURE MYOCARDIAL CALCIUM HANDLING IN ADULT DROSOPHILA. *CIRC RES* 2011; 108(11):1306-15.
112. FIELDS S, SONG O. A NOVEL GENETIC SYSTEM TO DETECT PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS. *NATURE*. 1989 JUL 20;340(6230):245-6.
113. CHIEN CT, BARTEL PL, STERNGLANZ R, FIELDS S. THE TWO-HYBRID SYSTEM: A METHOD TO IDENTIFY AND CLONE GENES FOR PROTEINS THAT INTERACT WITH A PROTEIN OF INTEREST. *PROC NATL ACAD SCI U S A*. 1991 NOV 1;88(21):9578-82.
114. BRAVENÝ P. HEART, CALCIUM AND TIME. *EXP CLIN CARDIOL*. 2002 SPRING;7(1):3-6.
115. SANTALLA M, VALVERDE CA, HARNICHAR E, LACUNZA E, AGUILAR-FUENTES J, MATTIAZZI A, FERRERO P. AGING AND CAMKII ALTER INTRACELLULAR Ca²⁺ TRANSIENTS AND HEART RHYTHM IN DROSOPHILA MELANOGASTER. *PLOS ONE*. 2014 JUL 8;9(7):e101871
116. ADELA HERRAIZ-MARTÍNEZ, JESUS ÁLVAREZ-GARCÍA, ANNA LLACH, CRISTINA E. MOLINA, JACQUELINE FERNANDES, ANDREU FERRERO-GREGORI, CRISTINA RODRÍGUEZ, ALEXANDER VALLMITJANA, RAÚL BENÍTEZ, JOSEP M. PADRÓ, JOSÉ MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, JUAN CINCA, LEIF HOVE-MADSEN. AGEING IS

- ASSOCIATED WITH DETERIORATION OF CALCIUM HOMEOSTASIS IN ISOLATED HUMAN RIGHT ATRIAL MYOCYTES. *CARDIOVASC RES.* 2015 APR 1; 106(1): 76–86.
117. MARJA STEENMAN AND GILLES LANDE. CARDIAC AGING AND HEART DISEASE IN HUMANS. *BIOPHYS REV.* 2017 APR; 9(2): 131–137.
118. TETTWEILER G, MIRON M, JENKINS M, SONENBERG N, LASKO PF. STARVATION AND OXIDATIVE STRESS RESISTANCE IN *DROSOPHILA* ARE MEDIATED THROUGH THE EIF4E-BINDING PROTEIN, D4E-BP. *GENES DEV.* 2005 AUG 15;19(16):1840-3
119. WEBBER J, MACDONALD IA. THE CARDIOVASCULAR, METABOLIC AND HORMONAL CHANGES ACCOMPANYING ACUTE STARVATION IN MEN AND WOMEN. *BR J NUTR.* 1994 MAR;71(3):437-47.
120. CHRISTOPHER M. HARDY, RYAN T. BIRSE, MATTHEW J. WOLF, LIN YU, ROLF BODMER, ALLEN G. GIBBS. OBESITY-ASSOCIATED CARDIAC DYSFUNCTION IN STARVATION-SELECTED *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *AM J PHYSIOL REGUL INTEGR COMP PHYSIOL.* 2015 SEP 15; 309(6): R658–R667.
121. G. MAZZOCCHI, L. SOMMESE, J. PALOMEQUE, J. I. FELICE, M. N. DI CARLO, D. FAINSTEIN, P. GONZALEZ, P. CONTRERAS, D. SKAPURA, M. D. MCCAULEY, E. C. LASCANO, J. A. NEGRONI, E. G. KRANIAS, X. H. T. WEHRENS, C. A. VALVERDE, A. MATTIAZZI. PHOSPHOLAMBAN ABLATION RESCUES THE ENHANCED PROPENSITY TO ARRHYTHMIAS OF MICE WITH CAMKII-CONSTITUTIVE PHOSPHORYLATION OF RYR2 AT SITE S2814. *J PHYSIOL.* 2016 JUN 1; 594(11): 3005–3030. PUBLISHED ONLINE 2016 FEB 2. DOI: 10.1113/JP271622
122. GRECO HERNÁNDEZ, KATHLEEN M. GILLESPIE, TSVETAN R. BACHVAROFF, ROSEMARY JAGUS, CÁTIA IGREJA, DANIEL PETER, MANUEL BULFONI AND BERTRAND COSSON. CHAPTER 10. EVOLUTION OF EIF4E-INTERACTING PROTEINS. *EVOLUTION OF THE PROTEIN SYNTHESIS MACHINERY AND ITS REGULATION.* PP 207-234. SPRINGER, CHAM 2016
123. KRANIAS EG, HAJJAR RJ. MODULATION OF CARDIAC CONTRACTILITY BY THE PHOSPHOLAMBAN/SERCA2A REGULATOME. *CIRC RES.* 2012 JUN 8;110(12):1646-60.