

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO BOWDITCH EN EL MODELO DE ESTUDIO  
DROSOPHILA MELANOGASTER**

Trabajo Final de Grado

del alumno



**Licenciatura en Genética**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino,.....

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO BOWDITCH EN EL MODELO DE ESTUDIO  
DROSOPHILA MELANOGASTER**

Trabajo Final de Grado

del alumno

**MARÍA VICTORIA REGGE**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Co-Director**

(Nombre y Apellido)  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

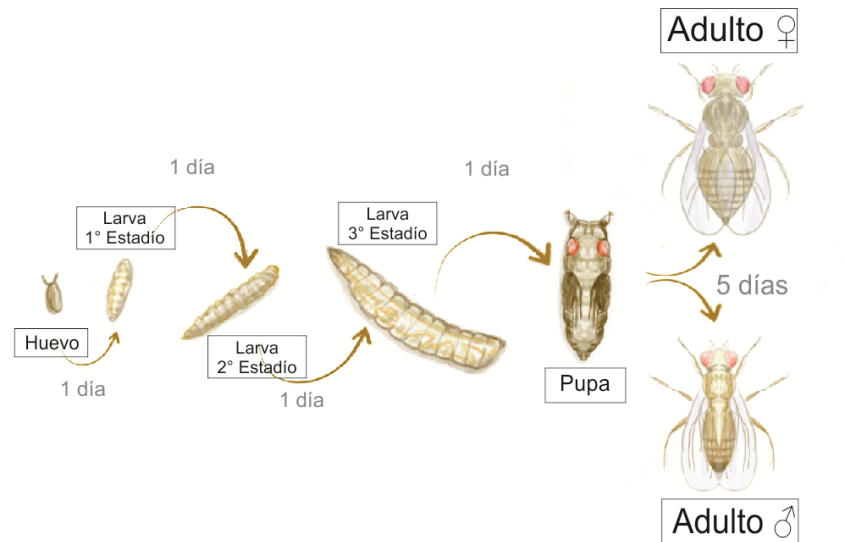
Pergamino,.....

## INTRODUCCIÓN

### ***Sobre la vida de Drosophila melanogaster: características generales***

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo, perteneciente al orden Díptera y a la familia *Drosophilidae*. De hábitat cosmopolita, consume alimentos con alto contenido de ácido acético, como frutas en descomposición. En ciclo de vida corto se suceden las cuatro fases características de los insectos con metamorfosis completa: huevo, larva, pupa e imago o adulto (Figura 1). La duración del ciclo varía 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. 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 estadíos. 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 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.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. El huevo fecundado tarda 24 horas en desarrollarse y convertirse en larva de primer estadio. Pasado el segundo y tercer estadio larval, luego de cuatro o cinco días se forma la pupa. Concluida la metamorfosis en esta etapa, el imago emerge cuatro a cinco días después.

### ***Drosophila melanogaster* como organismo modelo**

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un modelo animal que ha sido utilizado en la investigación biomédica por más de un siglo desde que fue adoptada como objeto de estudio por Thomas Morgan en el año 1910 permitiéndole sentar las bases de la herencia genética, la herencia ligada al sexo, epistasis, herencia de alelos múltiples y la construcción de los primeros mapas genéticos (Pierce, 2004). Desde ese momento y hasta la actualidad *Drosophila melanogaster* se ha seguido utilizado para estudiar una amplia gama de fenómenos biomédicos.

Su utilización supone ventajas con respecto a los modelos de animales vertebrados:

-Son muy fáciles de mantener en condiciones de laboratorio.

-Su ciclo de vida es corto (el adulto vive aproximadamente entre 70 y 80 días).

-Se obtiene una nueva generación cada 10 días cuando son criadas a 25 °C.

En cuanto a su utilización como modelo en enfermedades de base genética también presenta ventajas específicas:

-Producen gran cantidad de embriones que se desarrollan de forma externa, los que pueden ser fácilmente modificados genéticamente, obteniéndose transgénicos para el estudio de diversas enfermedades humanas.

-El genoma de *Drosophila melanogaster* se ha secuenciado en su totalidad (Adams y col, 2000) y se encuentra disponible en la base de datos flybase.

-Las comparaciones de similitud de secuencia entre el genoma de *Drosophila melanogaster* y el genoma humano han revelado que aproximadamente el 75 % los genes humanos tienen una contrapartida identificable en el genoma de la mosca de la fruta, lo que afianza su legitimidad como organismo modelo para la investigación biomédica (Reiter y col, 2001).

### ***Drosophila melanogaster* en el estudio de enfermedades cardíacas**

Las enfermedades cardiovasculares humanas se han estudiado clásicamente en vertebrados y más específicamente en modelos de mamíferos (ratones, ratas, ovejas, perros, gatos y cerdos), aunque a partir del nuevo milenio las similitudes tanto a nivel genético como fisiológico entre el corazón humano y el de *Drosophila melanogaster* impulsaron su uso como un interesante modelo alternativo para el estudio de enfermedades cardíacas por varios grupos de investigación, incluido el grupo en el cual se desarrolló el presente trabajo.

Muchos de los genes implicados en la diferenciación del corazón de la mosca de la fruta, tienen su ortólogo asociado al desarrollo del corazón de vertebrados (Piazza y Wessells 2011). Moscas que portan deleciones de esos genes presentan desórdenes del desarrollo cardíaco. (Garg, 2006, Bryantsev y Cripps, 2009)

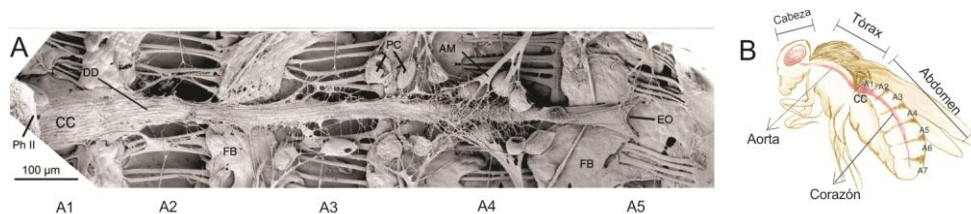
Por otro lado, este modelo es útil para evaluar cambios en la función cardíaca a largo plazo, dado el corto ciclo de vida del organismo. Así se ha podido caracterizar el impacto a nivel cardíaco de diferentes dietas, mutaciones genéticas, entrenamiento físico, efectos del envejecimiento y el impacto en la función cardíaca de distintos compuestos como la cafeína, los cannabinoides y el tabaco. (Piazza y col, 2009, Hill-Burns y col, 2013, Piper y col, 2014, Santalla y col, 2014, Santalla 2016)

### **El corazón de *Drosophila melanogaster***

El sistema cardiovascular en el adulto está constituido de un tubo lineal único formado por la unión de dos filas de cardiomiocitos que delimitan un lumen central por el que fluye la hemolinfa. El tubo se extiende desde el segmento torácico T1 al segmento abdominal A7 y se divide en 2 regiones a lo largo del eje anterior-posterior, las cuales presentan morfología y función específica: la aorta anterior y el corazón propiamente dicho (Medioni y col, 2009). Esta última parte está dividida en cuatro cámaras cardíacas y contiene válvulas laterales por donde entra la hemolinfa que drena desde el cuerpo. En la cámara cónica (la cual se encuentra en el primer segmento abdominal) y en la última cámara están los centros marcapaso, zonas donde se origina la contracción (Figura 2). (Rizki, 1978, Curtis y col, 1999).

El ciclo cardíaco de *Drosophila* consta de dos fases: una consiste en latidos anterógrados y la otra está compuesta por latidos retrógrados. Durante los latidos retrógrados, la cámara del corazón funciona como una bomba de succión, facilitando el ingreso de la hemolinfa a la primera cámara (cámara cónica) exclusivamente a través del primer par de válvulas. Durante los latidos anterógrados, el corazón funciona como una bomba de presión. La cámara anterior recibe hemolinfa a través de todas las válvulas restantes que se abren y permiten el ingreso de hemolinfa para ser enviada hacia la aorta anterior (Wasserthal, 2007).

El tejido contráctil del corazón está compuesto por una capa de cardiomiocitos en los cuales es posible mediante microscopía electrónica detectar sarcómeros. Estos poseen bandas I, bandas A y discos Z discontinuos. En *Drosophila melanogaster* a diferencia de los sarcómeros de vertebrados y de algunos invertebrados no se observan bandas M (Curtis y col, 1999).



**Figura 2.** A: Vista ventral del corazón de *Drosophila melanogaster*. FB (fat body): cuerpo graso. PC (pericardial cells): células pericárdicas. CC (conical chamber): cámara cónica. DD (dorsal diaphragm): diafragma dorsal. AM (alary muscles): músculos alares. A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: Segmentos abdominales. B: Diagrama de la anatomía de la mosca y la posición relativa del corazón. Microfotografía tomada de (Wasserthal, 2007).

### Mecanismos subcelulares de la contractibilidad cardíaca

La contracción cardíaca está determinada por la concentración de calcio intracelular ( $Ca^{2+}_i$ ) en los miocitos. Cuando este ión se encuentra libre en el citoplasma, es capaz de unirse a la proteína troponina, lo que permite que la miosina se una a la actina y se acorten los miofilamentos durante la sístole.

Los mecanismos que regulan la concentración de  $Ca^{2+}_i$  ( $[Ca^{2+}_i]$ ) determinan los ciclos de contracción y relajación y la fuerza de la contracción. El acoplamiento excito contráctil reúne una serie de eventos que tienen como consecuencia la modulación de la  $[Ca^{2+}_i]$  y se inician con la despolarización de la membrana por la entrada de sodio ( $Na^+$ ) a través de los canales rápidos de  $Na^+$ . Esto permite que se abran los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (canales de  $Ca^{2+}$  tipo L). Al aumentar la  $[Ca^{2+}_i]$  se abren receptores de rianodina ( $R_{YR_2}$ ), canales iónicos ubicados en la membrana del retículo sarcoplasmático (RS, reservorio de  $Ca^{2+}_i$ )

que inducen la salida de más  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol, desencadenando la contracción. La relajación del músculo cardíaco se produce cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólica disminuye, principalmente gracias a la acción de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP (SERCA2a) del RS, que permite la recaptura de este ión hacia su interior. El exceso de  $\text{Ca}^{2+}_i$  es eliminado por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  del sarcolema (NCX). (Ross, 2010). En condiciones fisiológicas la  $[\text{Ca}^{2+}_i]$  aumenta de 0.1 a 1  $\mu\text{M}$  y luego disminuye. A esta variación se la llama *transitorio* de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las moléculas y sus acciones se encuentran resumidas en la Figura 3.

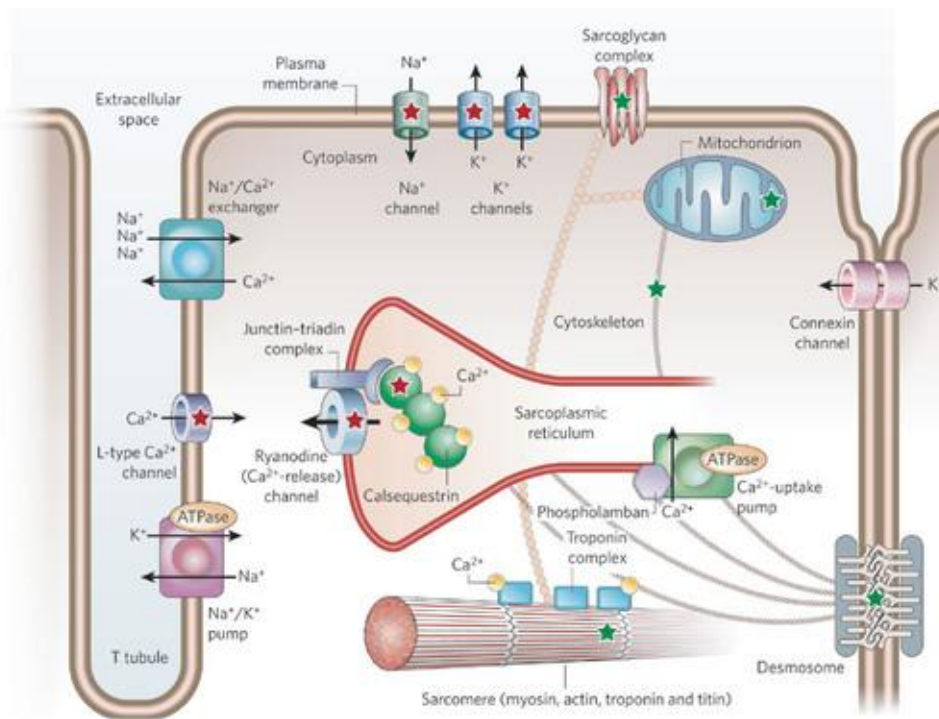


Figura 3. Esquema del AEC en mamífero. Canales y bombas están mencionadas en el texto que describe dicho mecanismo. Tomado de: (Knollmann y Roden, 2008).

### Regulación de la contractilidad: el efecto Bowditch

Existen hasta el momento tres mecanismos descritos que regulan la fuerza con la que el corazón bombea sangre hacia el resto del cuerpo (De la Serna, 2010):



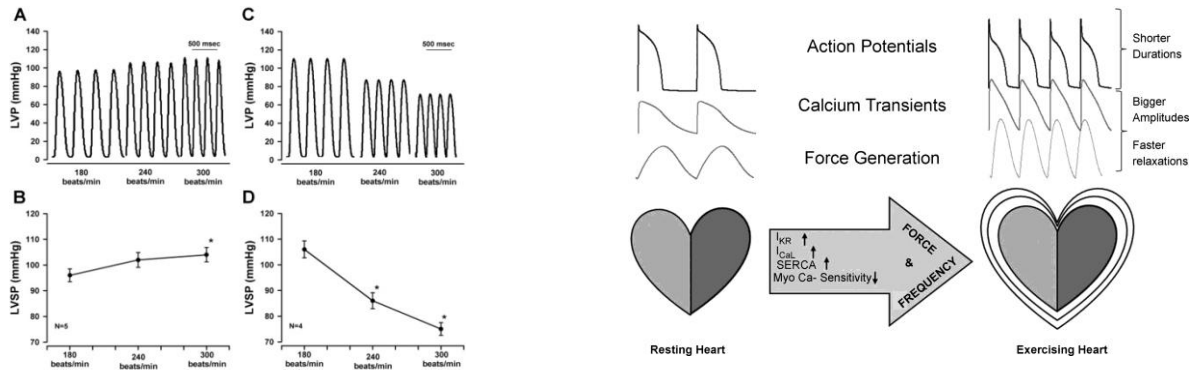
- 1) El descripto mediante la ley de Frank- Starling, la cual se refiere a la capacidad del corazón de adaptarse a volúmenes crecientes de flujo sanguíneo. La ley establece que la fuerza de contracción aumentará a medida que el corazón se llene con mayor volumen de sangre debido al estiramiento de los cardiomiocitos.
- 2) El efecto Bowditch o fenómeno de la escalera, que establece la relación entre la frecuencia cardíaca (FC) y la fuerza contráctil. Un aumento de la frecuencia cardíaca incrementa progresivamente la fuerza de la contracción, mientras que su disminución produce el efecto inverso.
- 3) Las propiedades intrínsecas del músculo cardíaco, que responden a las influencias neurohumorales y a los cambios de concentración de iones.

Los fenómenos de escalera positiva y de Frank-Starling constituyen los mecanismos principales por los cuales el corazón es capaz de suplir una mayor demanda corporal de sangre.

En este trabajo final de grado, nos enfocaremos en el efecto Bowditch o fenómeno de la escalera. Este aumento de la fuerza de contracción en respuesta a un aumento de la frecuencia de estimulación es una propiedad intrínseca del corazón, conservada en gran cantidad de mamíferos, incluyendo los seres humanos sanos. El mecanismo fue descripto por Henry Pickering Bowditch en 1871 y hoy se conoce como el fenómeno escalera positiva o *treppe* (Bowditch, 1871). Esta característica se encuentra ausente en pequeños roedores tales como ratas y ratones (Maier y *col*, 1997) y vertebrados no mamíferos como peces en los cuales la relación fuerza-frecuencia es negativa (Shiels y *col*, 2002) (Figura 4, izquierda).

El fenómeno de escalera positiva es especialmente importante en la respuesta al ejercicio: en sujetos normales se cree que un 40% del aumento del gasto cardíaco (volumen de sangre bombeada por el ventrículo en un minuto) depende de la relación entre la fuerza y la frecuencia cardíaca (Higginbotham y *col*, 1986) por lo que se puede considerar a este fenómeno como una reserva de volumen sistólico capaz de aumentar la circulación de sangre de manera independiente del

control neurohumoral (Ricci y *col*, 1979) (Figura 4, derecha). En personas con falla cardíaca esta relación entre frecuencia y fuerza es nula o inversa (denominándose escalera negativa) y el corazón es incapaz de solventar el requerimiento de sangre aún en ejercicios de baja exigencia (Feldman, 1988, Mulieri, Hasenfuss y *col*, 1992).



**Figura 4.** Izquierda: Relación entre frecuencia de latido y LVSP (left ventricular systolic pressure): Presión sistólica de ventrículo izquierdo. A y B: Relación positiva, correspondiente a escalera positiva. C y D: Escalera negativa. Extraído de (Marin y Franchini 2005). Derecha: Esquema de cambios en el potencial de acción y cambios moleculares en corazones en reposo y luego de ejercicio. Extraído de (Puglisi y *col*, 2013).

### Mecanismos subcelulares que intervienen en el efecto Bowditch

Diversos estudios demuestran que el aumento en la frecuencia cardíaca se relaciona con un aumento en el transitorio de  $Ca^{2+}$  debido principalmente a la actividad de las proteínas del RS que manejan este ión (Allen y Blinks, 1978, Kurihara y Allen 1982, Pieske y *col*, 1995, Vila Petroff y *col*, 2003).

Cuando la frecuencia de estimulación aumenta, el número de despolarizaciones por unidad de tiempo también aumenta. Esto lleva a una mayor entrada de  $Ca^{2+}$  a través canales de tipo L por unidad tiempo, aumentando a su vez la carga y descarga del RS (Wohlfart y Noble 1982).

En las especies con escalera positiva, la carga y descarga del RS se cree que es el mecanismo principal que explica este fenómeno. Las causas radicarían en cambios en la actividad de la SERCA, debido a su fosforilación o a la de su proteína reguladora fosfolamban, mediadas por las quinasa PKA y la quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina CaMKII (Palomeque y col, 2007). Sin embargo, también se observa escalera positiva aún en ausencia de RS funcional. Se ha postulado que CaMKII está implicada en mantener la respuesta al aumento de frecuencia uniéndose a los canales de calcio tipo L, aunque el mecanismo por el cual actúa no se encuentra totalmente dilucidado (Hudmon, 2002).

Por otro lado, el NCX opera haciendo que el  $\text{Na}^+$  entre en la célula y el  $\text{Ca}^{2+}$  salga de ella, jugando un papel central en el control de la relajación muscular. El intercambiador NCX puede contribuir al fenómeno de la escalera al ser incapaz de sacar completamente el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la célula luego de la contracción cuando dispone de tiempos más cortos durante la diástole a frecuencias más altas (Blaustein y Lederer, 1999, Pieske y col, 2002).

En las especies que muestran escalera negativa la amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}_i$  disminuye cuando la frecuencia de estimulación aumenta (Harwood y col, 2000), como ocurre en ratas y ratones en quienes el incremento de la fuerza de contracción ante el aumento de frecuencia es nulo. En estas especies el miocardio en situaciones fisiológicas normales presenta escalera negativa, a pesar de tener gran actividad de SERCA2a. La relación negativa observada podría resultar de un alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS, lo cual impediría aumentos posteriores en la carga de este reservorio en respuesta al aumento de la frecuencia de estimulación. Una característica común compartida por estos pequeños roedores es un contenido de  $\text{Na}^+_i$  relativamente alto, lo que podría limitar la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma por parte del NCX, lo que aumentaría la carga del RS, aún a bajas frecuencias. Un RS sobrecargado en conjunto con una corta duración del potencial de acción en los cardiomiocitos de estas especies, podrían favorecer la relación negativa por la reducción del tiempo disponible para que actúen los mecanismos de restitución (Palomeque y col, 2007).

## Importancia del efecto Bowditch en la falla cardiaca

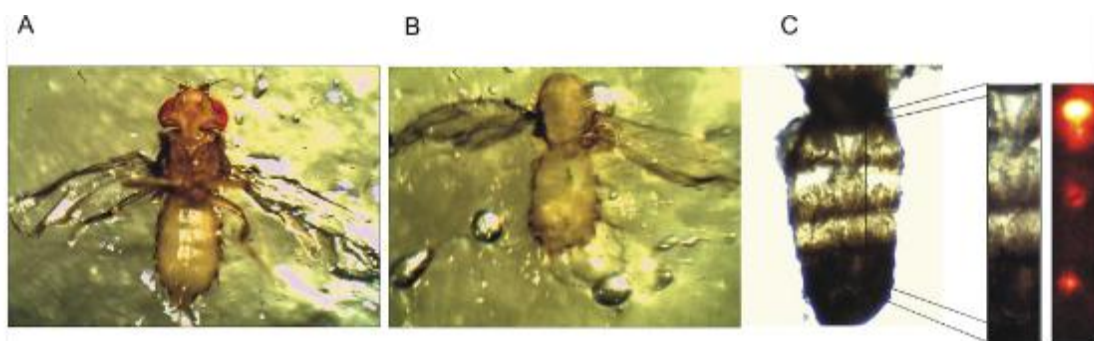
En la insuficiencia cardiaca se describe una escalera negativa asociada a los siguientes aspectos: existe una disminución de la expresión de SERCA2a y PLB; la actividad de NCX está aumentada y la fosforilación de PLB, disminuida (Palomeque y col, 2004). Al estudiar la contribución relativa de estos factores se ha determinado que en el corazón sano la actividad de SERCA2a aumenta con el aumento de frecuencia y la de NCX se mantiene constante pero durante la falla cardiaca la actividad de SERCA2a y del NCX son constantes a pesar de que aumente la frecuencia (Pieske y col, 1999, Maier y col, 2000). Un aumento en la frecuencia de estimulación también desencadena otros mecanismos, cualquiera de los cuales podría modular la contractilidad. El fenómeno de la escalera resulta de un delicado equilibrio entre ellos y la respuesta al cambio de frecuencia puede depender de pequeños cambios en cualquiera de estos factores, lo que explicaría la variabilidad de este fenómeno ya sea entre especies o entre estados sanos y enfermos. ***Determinar la existencia de este efecto en el modelo de Drosophila melanogaster podría ayudar a esclarecer los principios básicos y las interrelaciones de los componentes que operan en este fenómeno así como las bases genéticas no estudiadas. En este sentido se podrá estudiar en Drosophila melanogaster qué participación tiene la proteína SERCA en la respuesta cardíaca, considerando dos aspectos: por un lado que la mosca de la fruta no tiene la proteína reguladora fosfolamban y por otro lado, se han desarrollado mutantes específicos del gen que codifica para la SERCA, lo que permitirá extrapolar resultados aún no obtenidos en mamífero, al humano.***

## Cómo se estudia la función cardiaca en *Drosophila melanogaster*

El estudio de la función cardiaca en mamíferos se realiza mediante sistemas de detección de fuerza, presión o estiramiento de las fibras, en preparaciones

aisladas de miocitos, en músculos papilares o corazón entero (Valverde y col, 2005, Palomeque y col, 2007). La observación de cambios en el contenido de  $Ca^{2+}_i$  se realiza mediante indicadores fluorescentes como Fura-2. En *Drosophila melanogaster*, aprovechando su ventaja para generar organismos transgénicos, se pueden diseñar sistemas reporteros fluorescentes codificados genéticamente que permitan medir cambios en la actividad cardíaca y el  $Ca^{2+}_i$  en el corazón de la mosca. Esto sortea dificultades de los indicadores tradicionales como la permeabilidad y el fotoblanqueo del fluoróforo usado en preparaciones de mamífero y la posibilidad de seguir en el tiempo el comportamiento cardíaco en moscas enteras, sin métodos de medida invasivos.

Utilizando tales ventajas de la ingeniería genética, trabajos previos de este laboratorio han permitido estudiar variaciones del  $Ca^{2+}_i$  provocadas por el envejecimiento, en moscas que portan un sistema reportero codificado genéticamente capaz de censar aumentos del  $Ca^{2+}_i$  (Figura 5) (Lin y col, 2011, Santalla y col, 2014). Este sistema expresa de manera inducible la proteína GFP exclusivamente en corazón, bajo el control del driver TinC. La proteína tiene adosado a la región C terminal un dominio de unión a calmodulina. Al aumentar el  $Ca^{2+}_i$ , éste se une a calmodulina, el complejo  $Ca^{2+}_i$ -calmodulina cambia la conformación del fluoróforo y activa la emisión de fluorescencia, permitiendo identificar transitorios de  $Ca^{2+}_i$  (Figura 5).



**Figura 5.** A y B: Preparados semi intactos. C: Preparado semi intacto, foco sobre el corazón. Relación entre la ubicación de las cámaras cardíacas y la señal obtenida de ellas al ser estimuladas con una longitud de onda 488 nm. Se pueden visualizar desde arriba hacia abajo la cámara cónica, la segunda cámara y la tercera cámara. Tomado de Santalla, 2014.

Otro sistema reportero existente, tradicionalmente usado para estudiar anomalías del desarrollo del corazón de *Drosophila melanogaster*, fue utilizado por primera vez en este trabajo para analizar acortamiento del músculo cardíaco. Consiste en la proteína GFP expresada en corazón y en células pericárdicas bajo el control del driver que codifica para el factor de transcripción Hand, importante en la cardiogénesis de la mosca y del mamífero (Figuras 6 y 7) (Togel y col, 2013).

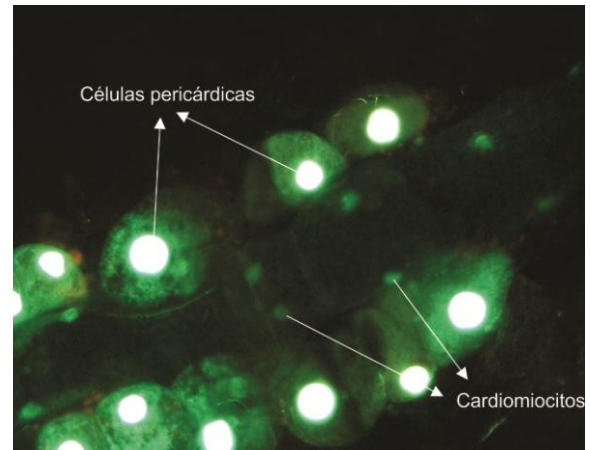
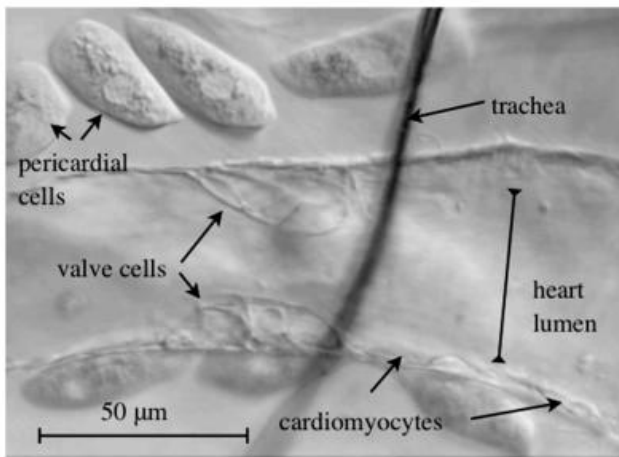


Figura 6. Imagen de microscopio de campo claro donde pueden observarse en detalle las estructuras componentes del corazón: Células pericárdicas que rodean al corazón formado por cardiomiocitos y válvulas. Tomado de (Rotstein y Paululat 2016).

Figura 7. Imagen de microscopía de fluorescencia. Moscas transgénicas Hand-GFP 2.2 donde pueden visualizarse Células pericárdicas y cardiomiocitos (resultados de nuestro propio laboratorio).

Ambos sistemas reporteros, proveen información útil y complementaria sobre la fisiopatología cardíaca de *Drosophila melanogaster* y particularmente en los estudios que abordaremos sobre el fenómeno de la escalera.

## HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis plantea que incrementos en la frecuencia de estimulación provocan cambios en la fuerza de contracción y el manejo del  $Ca^{2+}_i$  del corazón en *Drosophila melanogaster*. Estos podrían estar vinculados a la actividad diferencial de proteínas responsables del ciclado de este ión como la SERCA.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar la existencia de uno los fenómenos principales de la función cardíaca (fenómeno de escalera) en el modelo de estudio biomédico *Drosophila melanogaster*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Poner a punto las condiciones técnicas para el estudio de la respuesta fisiológica al aumento de la frecuencia de estimulación.
- 2) Caracterizar si *Drosophila melanogaster* presenta escalera positiva o negativa ante el aumento de la frecuencia.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Amplificación de stocks***

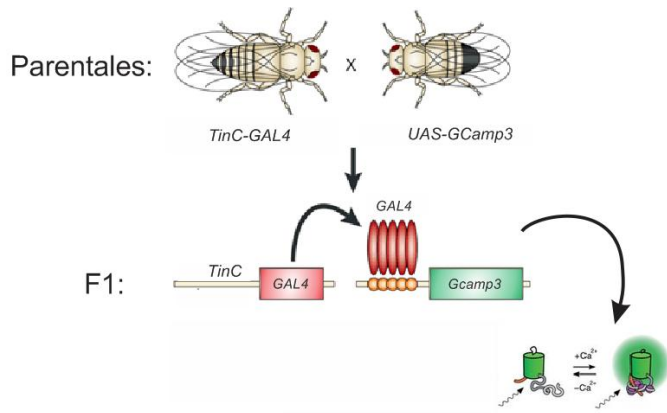
Los stocks de moscas se amplificaron y mantuvieron en viales a 28°C, llenados parcialmente con una mezcla de harina de maíz, glucosa, agar y levadura, suplementado con 10% de antimicótico para evitar su contaminación. (Anexo).

### ***Utilización de sistemas reporteros GCamP3 y hand-GFP***

El sistema reportero GCamP3 expresa una proteína fluorescente verde a continuación de una secuencia de 17 pares de bases llamada UAS (*upstream activator sequence*). Por otro lado, el factor de transcripción Gal4 se expresa bajo el control del promotor o driver específico de corazón TinC. Cuando Gal4 se sintetiza, se une a la secuencia UAS y promueve la transcripción de GFP. Esta proteína censa aumentos de  $Ca^{2+}_i$  (Figura 8).

El conocimiento de este sistema, modificado a partir del que funciona naturalmente en levaduras, ha sido una herramienta útil para construir moscas transgénicas de cualquier tipo que expresen Gal4 en un tejido o momento del ciclo

de vida, determinados (Duffy, 2002). La figura 8 resume cómo funciona el sistema reportero en nuestras condiciones.



**Figura 8.** Cruzas y F1 con expresión del reportero GCaMP3, bajo el sistema de expresión UAS-GAL4. Tomado y modificado de (Muqit y Feany 2002).

Por otro lado la segunda línea utilizada expresa GFP de manera constitutiva en cardiomiocitos y células pericárdicas. Este gen reportero se encuentra bajo la influencia del promotor de Hand, un factor de transcripción específico de células cardíacas y pericárdicas.

### **Cruzamientos Genéticos**

Se realizaron cruzamientos entre individuos que expresan ambos sistemas reporteros. La descendencia heterocigota, expresa el sensor de  $Ca^{2+}$  al tiempo que se puede observar señal fluorescente del otro sistema GFP presente en células pericárdicas y cardíacas para evaluar movimiento. También se procedió a cruzar individuos GCaMP3 con una línea que portaba un gen que codificaba para un ARN de interferencia contra la proteína SERCA. La tabla de cruzas se exhibe en el anexo.

### **Obtención del preparado semi-intacto**

Para realizar los estudios funcionales, los experimentos con corazones de adultos se llevaron a cabo según lo descrito (Vogler y Ocorr 2009). Las disecciones se realizaron en un microscopio estereoscópico Schonfeld Optik modelo XTD 217. Se tomaron individuos de 7 días de la línea GCaMP3 y Hand-GFP los cuales fueron brevemente anestesiados con dióxido de carbono ( $CO_2$ ),



colocados en una caja de Petri de 60 mm que contenía una capa de vaselina y fijados por la región dorsal. Mediante un corte se eliminó la cabeza y la región ventral del tórax con el objeto de quitar la influencia neuronal en la actividad cardíaca. Se abrió la zona ventral media del abdomen y se retiraron los órganos internos como el intestino y órganos genitales. Se retiró el cuerpo graso mediante un pincel liner y el corazón quedó expuesto adherido a la pared dorsal. El preparado se mantuvo sumergido en solución de hemolinfa artificial oxigenada (HL3) (Anexo). Los detalles del procedimiento se resumen en la figura 9. Los preparados se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss 410 y un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E200 para medir los cambios en la fluorescencia emitida por ambas proteínas fluorescentes verdes (longitud de onda de excitación: 488 nanómetros, longitud de onda de emisión: 505-530 nanómetros). Alternativamente los corazones fueron observados en un equipo Ion Optix setup (Milton, MA) utilizando luz transmitida.



**Figura 9.** Obtención del preparado semi intacto. A: la mosca se ubica sobre el dorso, adherida al fondo de la placa de Petri por medio de vaselina. Se encuentra siempre sumergida en hemolinfa y se realiza un corte que separa el abdomen de la cabeza y el tórax. B: Se retiran los órganos abdominales con pinzas. C: se retira el cuerpo graso con pincel liner. D: preparado semi intacto con el corazón expuesto en la zona media, adherido a la parte dorsal de la cutícula.

### ***Evaluación de la función cardíaca***

La función cardíaca en el preparado semi intacto fue inferida de diferentes maneras conforme al sistema reportero expresado por la mosca evaluada.

1) En el caso de las moscas con expresión de GCaMP3 los cambios en la intensidad de fluorescencia fueron registrados en un punto particular del preparado, preferentemente ubicado en la cámara cónica, aunque de no ser posible debido a la falta de fluorescencia en dicho lugar se registró en la tercera

cámara. Se obtuvo una imagen donde se observan estos cambios de fluorescencia en función del tiempo.

2) Las moscas que expresan GFP bajo el promotor de Hand, fueron utilizadas para medir acortamiento cardíaco. Se localizó mediante microscopia confocal con un objetivo 100X una célula pericárdica o un cardiomiocito y se siguió su movimiento a lo largo de una línea perpendicular al mismo. Así, la ubicación sobre esta línea durante la diástole o su alejamiento de ella durante la sístole, nos permitió evaluar acortamiento. Alternativamente se registró el movimiento del corazón entero utilizando un microscopio de fluorescencia mediante un objetivo 20X (Nikon Eclipse e200) que presenta una cámara CCD acoplada para filmar videos en tiempo real.

Para los individuos de la F1 que portan ambos sistema reporteros, se adquirieron registros de ambas formas de manera consecutiva.

3) La tercera manera en la cual fue evaluada la función cardíaca se basó en la utilización del microscopio Ion Optix (Milton, MA). En este caso se empleó directamente luz transmitida y grabó la función cardíaca mediante el programa ION Wizard, que colecta la imagen en vivo desde la cámara y sigue el movimiento de partículas con contraste, al tiempo que cuantifica de manera simultánea este desplazamiento a través del tiempo. Esta técnica es independiente del sistema reportero expresado en la mosca.

La figura 10 muestra los equipos utilizados para la obtención del preparado semi intacto y el registro de la actividad cardíaca.

**Figura 10. A: Microscopio estereoscópico**



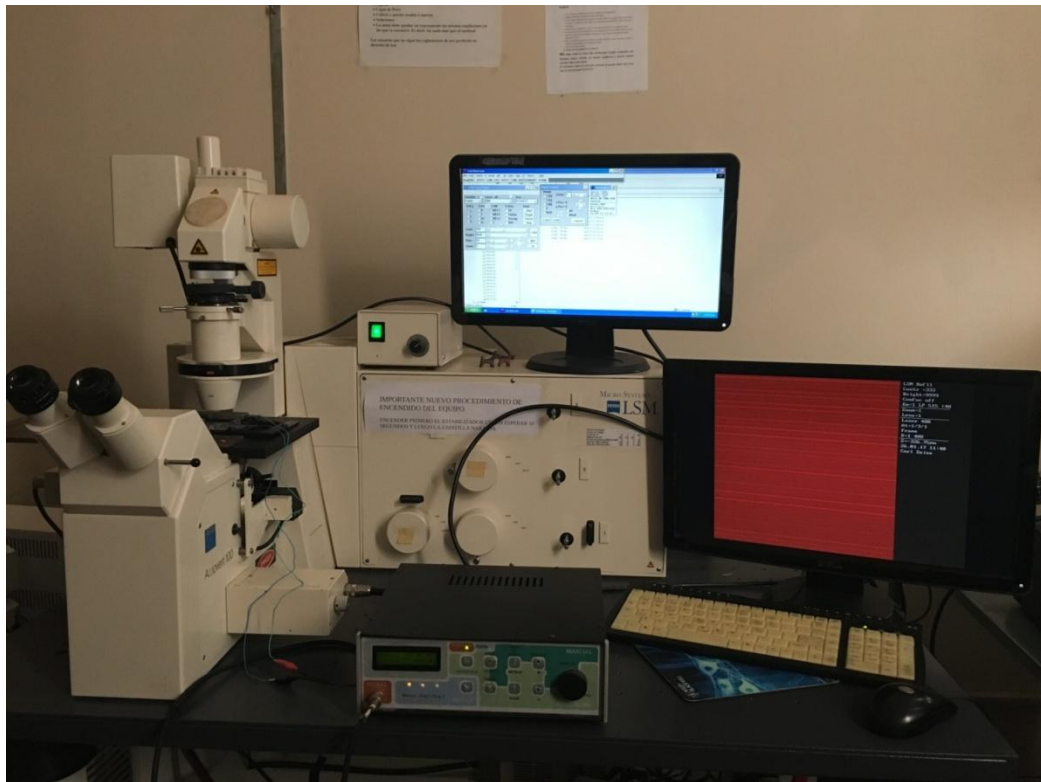
Equipo utilizado para disecciones

**B: Ion-Optix**



Equipo empleado en el registro de acortamiento mediante luz transmitida

**C: Microscopio confocal Carl Zeiss LSM 410**



Equipo utilizado para registrar la actividad cardíaca mediante señal fluorescente

### **Protocolo de estimulación**

El preparado semi intacto sumergido en hemolinfa artificial fue estimulado eléctricamente utilizando un aparato conductor conectado a un electro estimulador. Se ensayaron dos tipos de estímulo variando el voltaje y la duración del pulso de corriente, para hallar la mejor condición a la que las moscas respondieran al aumento de frecuencia. Así, se emplearon 26 V; 16 ms y 35V; 5 ms. La frecuencia de estimulación fue determinada según la frecuencia cardíaca basal del preparado. Para estandarizar las estimulaciones se separaron a los preparados en 3 rangos teniendo esa frecuencia basal (ver rangos, tablas en el anexo) Se realizaron 3 estimulaciones eléctricas aumentando la frecuencia de estimulación a razón de 1.5 Hz por etapa. Antes de la adquisición de la imagen se dejó un periodo de adaptación a la nueva frecuencia de 5 segundos. El estímulo se mantuvo el tiempo que tarda en registrarse la respuesta: 4 minutos, (Aproximadamente 1 minuto por frecuencia) para las moscas GCaMP3 y 2 minutos, (20 segundos aproximadamente por cada estímulo) para las moscas Hand-GFP. Se ensayaron dos tipos de estimulación en escalera, el primero dejando tiempos de descanso de 1 minuto entre estímulo y estímulo y el segundo sin tiempo de descanso entre estímulos. La figura 11 muestra gráficamente los protocolos de estimulación.

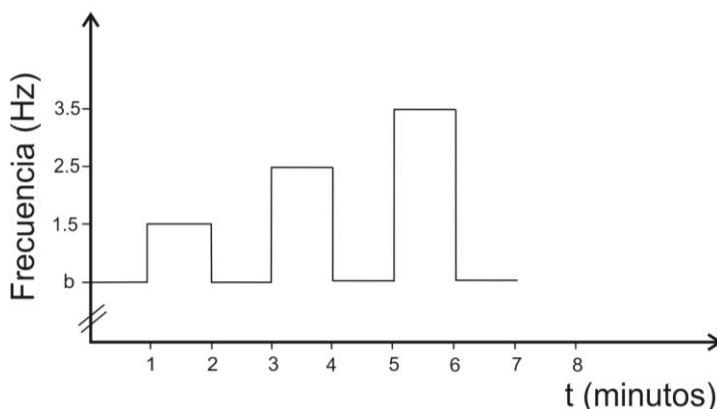
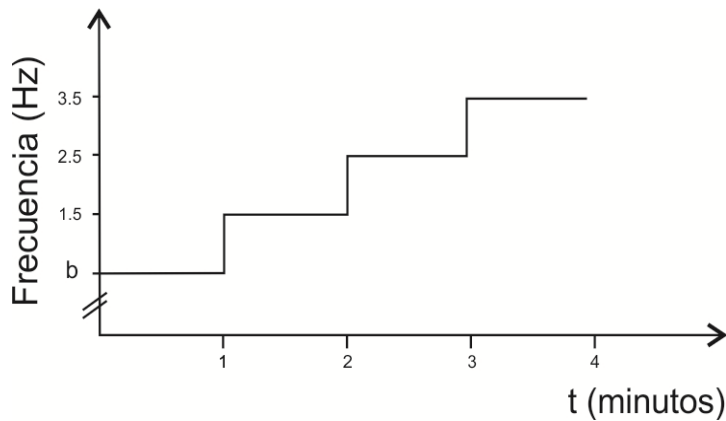
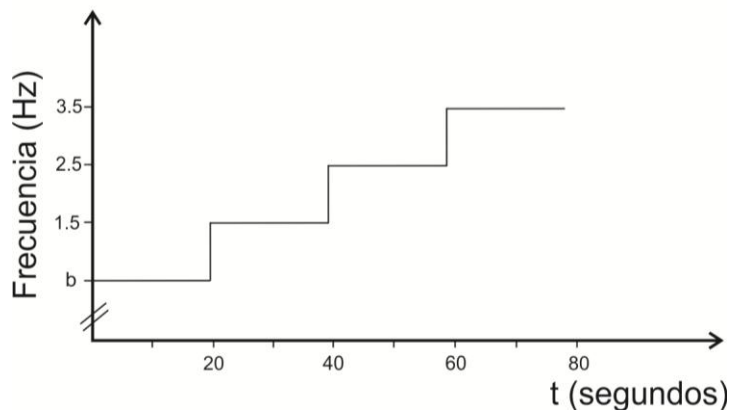


Figura 11  
 A: Protocolo de estimulación ensayado en moscas GCaMP3 con periodos de descanso entre cada aumento de frecuencia.



B: Protocolo de estimulación ensayado en moscas GCaMP3 sin períodos de descanso entre cada aumento de frecuencia.



C: Protocolo de estimulación ensayado en moscas Hand-GFP sin períodos de descanso entre cada aumento de frecuencia.

### **Generación y adaptación de software para el análisis de datos.**

Se desarrolló una aplicación mediante el uso de lenguaje Phyton adaptado para generar una imagen que reproduce el movimiento de las células pericárdicas o miocitos cardíacos, traducido a una sucesión de puntos de posición definida en un plano XY para reconstruir picos sobre los cuales medir los parámetros fisiológicos indicados a continuación.

### **Parámetros funcionales medidos**

- números de transitorios en un registro: (representativos de la frecuencia cardíaca), expresados en latidos/minuto.
- amplitud de los transitorios: (expresado en Unidades arbitrarias de fluorescencia según la fórmula  $(F-F_0)/F_0$  siendo F la fluorescencia máxima del transitorio y  $F_0$  la fluorescencia mínima)

- tiempo al pico (TTP): tiempo desde el inicio del transitorio hasta el punto de máxima fluorescencia (ms).
- $t_{1/2}$ : tiempo desde el máximo de fluorescencia hasta la mitad de la relajación (ms).
- $+dF/dt$  y  $-dF/dt$ : máximas velocidades de aumento y de reducción de fluorescencia

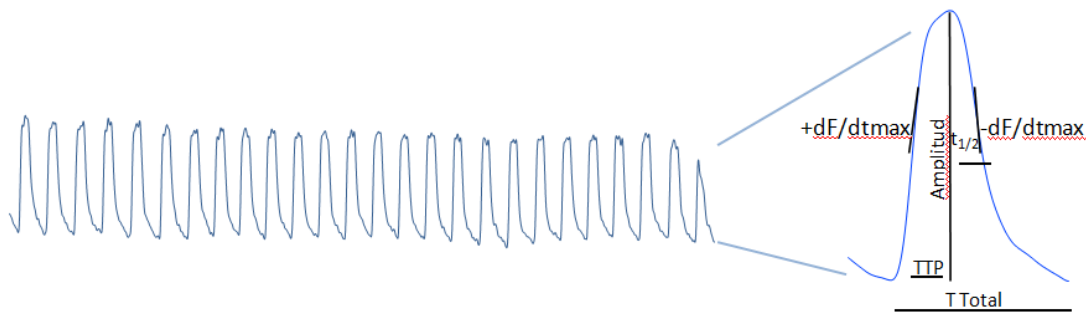


Figura 12. Se muestra un registro típico de transitorios de  $Ca^{2+}$ . Se observa la ampliación de un transitorio y los parámetros medidos.

### Ensayos bioquímicos

La eficiencia de la interferencia de SERCA en el tejido cardíaco se evaluó por medio de Western Blot usando un anticuerpo anti-SERCA provisto por el laboratorio del Dr. Sanyal, USA. Los geles de separación y apilamiento se diseñaron de acuerdo a lo descrito (Laemmli 1970) (Anexo). Muestras de ovarios, corazones y cabezas fueron colocadas y disgregadas en buffer de homogenización y sembradas junto con buffer de siembra SDS 1x (Anexo). Se utilizó un marcador de peso molecular dual-color (Biorad. Inc). Las muestras se sometieron a campo eléctrico en buffer de corrida (Anexo). Una vez finalizada la corrida, se llevó a cabo la transferencia a membrana de PVDF durante 60 minutos en buffer de transferencia (Anexo). Luego de la electroforesis, el bloqueo de la membrana se realizó con 5% leche en TBS Tween 0,1% (TBS-T) durante 60 minutos, transcurridos los cuales se efectuó la incubación con anticuerpo primario

anti-SERCA 1:2500 durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 12 minutos con TBS-T para eliminar los restos de anticuerpo primario, y se procedió a la incubación con anticuerpo secundario contra conejo acoplado a peroxidasa, durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación. Luego de la incubación con anticuerpo secundario se repitió el procedimiento de lavado y se reveló la membrana mediante reacción quimioluminiscente con un reactivo comercial (GE, Inc) en un equipo Quemidoc acoplado a una computadora con un software para la detección (QuantityOne).

### ***Protocolo de tinción***

Las mutantes Hand-GFP fueron una adquisición reciente del laboratorio, disponiéndose de 3 líneas de este tipo, producto de diferentes eventos de transgénesis. Para la elección de aquella que aportara una mejor señal fluorescente se realizó una caracterización del preparado semi intacto utilizando un protocolo de tinción con phalloidina 1:100 (life technologies) que permite detectar filamentos de actina y nuclear mask (life technologies) que permite visualizar núcleos celulares 1:2000, junto a la expresión del sistema reportero GFP. El protocolo fue modificado para evitar la pérdida de la proteína GFP codificada por el transgen. El mismo se encuentra detallado en el anexo. Los preparados fueron visualizados en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse e200.

### ***Aislamiento de cardiomiocitos***

A modo exploratorio, se procedió al aislamiento de cardiomiocitos a partir del ajuste de un método estandarizado para mamífero (Vila Petroff y col, 2003). El objeto del ensayo fue poder medir señal fluorescente de acortamiento en miocitos aislados de la línea Hand-GFP para independizarnos de la influencia del marcapaso cardíaco en la respuesta a la frecuencia de estimulación. El detalle del aislamiento se muestra en el anexo.

## **RESULTADOS**

### ***Caracterización inmunohistoquímica de proteínas estructurales y funcionales cardíacas de *Drosophila melanogaster****

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de adquirir experiencia en los procedimientos de inmunohistoquímica y western blot y del manejo de equipos de microscopía de alta calidad. La ultraestructura cardíaca del corazón de *Drosophila melanogaster* es conocida. En la siguiente figura se muestra la organización fibrilar longitudinal que rodea a la cámara cónica – la primera cámara cardíaca y se pueden apreciar los filamentos de actina teñidos con falloidina y las estriaciones típicas del músculo cardíaco. En azul se observan los núcleos de las células que forman el corazón y las del entorno. En verde, se reconoce la proteína GFP presente en miocitos y células pericárdicas, expresadas bajo el promotor Hand, propio de tejido mesodérmico cardíaco y pericárdico (Figura 13A).

A continuación, se observa la proteína SERCA, esencial en el manejo del  $Ca^{2+}_i$  mediante la técnica de western blot en moscas silvestres y en aquellas que expresan un ARN de interferencia contra la proteína (Figura 13B). Si bien intentamos cuantificar su expresión en ambos casos, no obtuvimos señal detectable mediante dos anticuerpos utilizados para reconocer otras proteínas como eIF4E y actina. Por esta razón, si bien en la calle correspondiente a la muestra proveniente de moscas con la SERCA reducida, no es posible validar el resultado en términos numéricos. No obstante, esto ha permitido poner a punto aspectos específicos de la técnica de western blot adaptada a muestras con muy poca cantidad de células y por lo tanto, de proteínas totales.



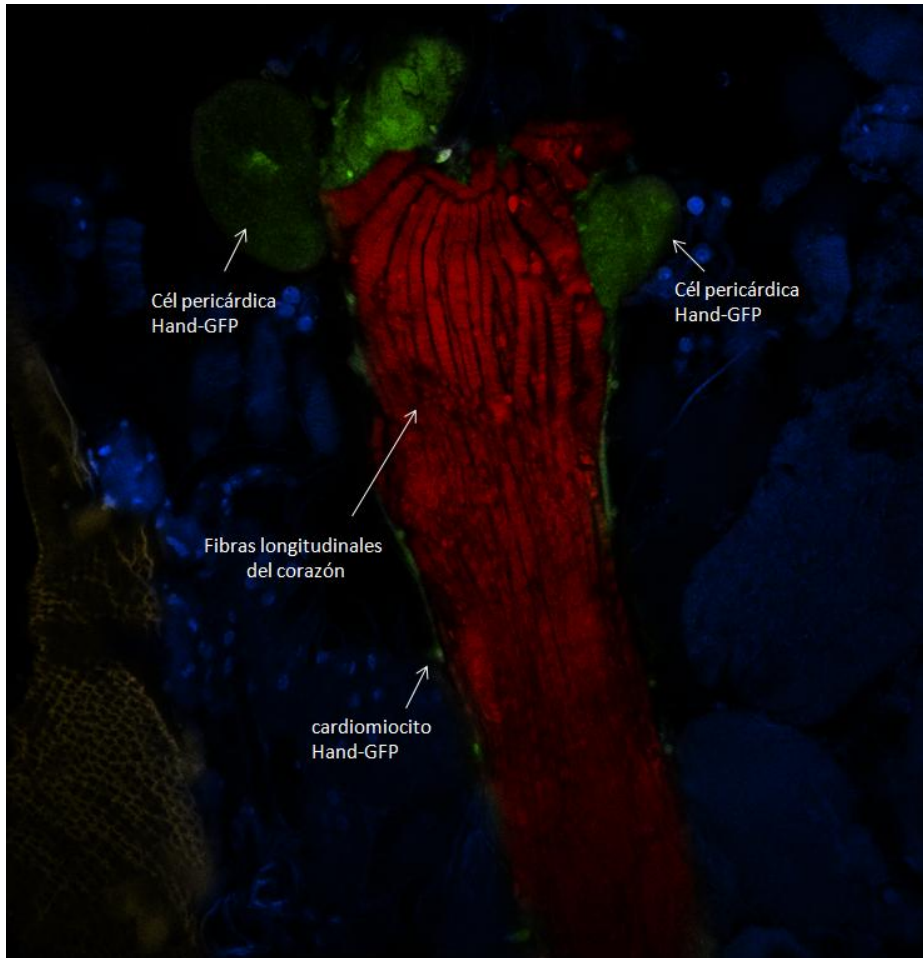
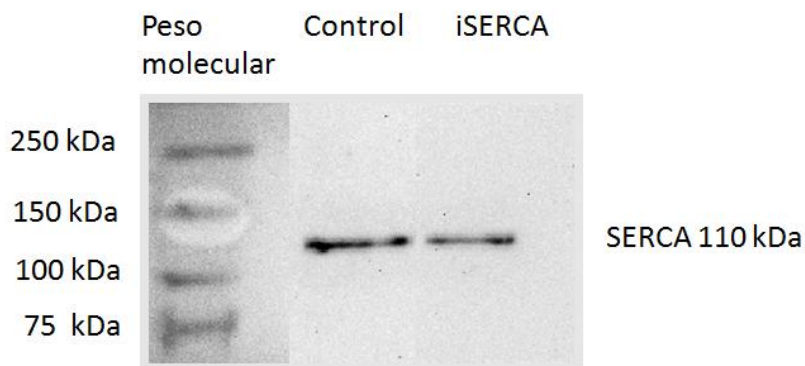


Figura 13. A: Imagen de la cámara cónica en donde se observan las fibras estriadas longitudinales en rojo, los miocitos y células pericárdicas en verde y los núcleos del resto del tejido circundante en azul.



B: Inmunoblot que muestra la banda correspondiente a la proteína SERCA en una mosca control y en una que presenta niveles reducidos de expresión mediante un ARNi

## **Determinación del protocolo de marcapaseo**

### **Elección de un aparato de estimulación**

Para lograr determinar el cambio de amplitud en respuesta al cambio de frecuencia de estimulación en un preparado semi intacto fue necesario encontrar una manera de estimular o marcapasear el preparado y que el mismo responda apropiadamente a la frecuencia administrada.

Se emplearon distintos instrumentos para administrar el pulso eléctrico al preparado hasta hallar un protocolo adecuado.

1) El primer método empleado consistió en el uso de un micromanipulador construido con impresora 3D (Figura 14 A). Para determinar su efectividad se hicieron registros en vivo de moscas salvajes de la línea Canton S (Cs) con luz transmitida en microscopio Ion optix. El micromanipulador portaba un capilar lleno de hemolinfa, dentro del cual se colocó el cable que lleva el impulso eléctrico hacia el preparado y paralelo al capilar se ubicó un segundo cable neutro para cerrar el circuito, quedando definida un área de estimulación eléctrica de aproximadamente unos 3 mm. Los beneficios potenciales de este tipo de estimulación es lograr un área de estimulación concentrada sobre el centro marcapaso natural de la mosca presente en la cámara cónica. La concentración del estímulo en esta zona podría impedir el funcionamiento normal del marcapasos endógeno y ser reemplazado por el estímulo exógeno. Otra ventaja sería estimular por contacto el corazón, con una mayor seguridad de que la mosca responda al estímulo. Además, al ser en un área tan pequeña dónde se establece el campo eléctrico y al tener poca superficie de material metálico conductor, las fuentes de estrés del marcapaseo eléctrico que son la ionización de la hemolinfa y el aumento de la temperatura por el paso de los electrones se verían reducidas (Knisley y col, 1999, Merrill y col, 2005, Chen y col, 2007, Zhu y col, 2016). A pesar de estos beneficios, la implementación del marcapaseo por micromanipulador no llevó a los resultados esperados, ya que el corazón es muy sensible a las tensiones mecánicas (Zhu y col, 2016). La colocación del capilar

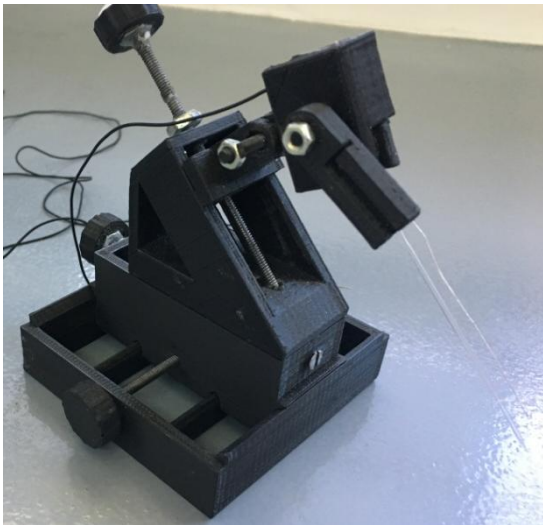
sobre la cámara cónica implicó la generación de tensiones en la cutícula ubicada por debajo del corazón. Como resultado de esta falta de sensibilidad del dispositivo para generar movimientos en el orden de los nanómetros, las tensiones provocadas dispararon el ritmo cardiaco muy por encima de la frecuencia de estimulación administrada, haciendo que luego de un tiempo de estimulación el corazón entrara en insuficiencia cardíaca.

2) A partir de esto se cambió la estrategia y basándonos en experiencias previas de marpaseo de mosca entera (Ocorr y col, 2014) se hicieron adaptaciones para estimular el preparado semi intacto. Se realizó una estimulación usando un portaobjetos recubierto de dos franjas de papel aluminio, dejando un pequeño espacio libre donde ubicar el preparado (Figura 14B). Para que el mismo quedara sumergido en hemolinfa se realizó una contención con plastilina. Se estimularon moscas Cs de edad variable. Los electrodos se conectaron a cada una de las bandas de aluminio, por lo que el preparado no fue sometido a tensiones mecánicas. De esta manera se pudo observar que el corazón seguía la frecuencia de estimulación, al menos por cortos períodos de tiempo. Sin embargo, este dispositivo también posee limitaciones, las cuales evitaron que fuera usado para estimulaciones largas como las requeridas en el ensayo de escalera. Por un lado el aluminio desprende contaminantes que pueden interferir con la función cardíaca normal y por otro lado al estar el preparado sumergido en una cantidad muy pequeña de hemolinfa la ionización y el aumento de temperatura en la zona son más marcadas, aumentando el estrés por estimulación. De manera alternativa, se reemplazó el aluminio por alfileres conductores, pero su incompleta fijación al portaobjetos dañaba el preparado, además de no ser eficientes conductores de la corriente eléctrica (Figura 14C).

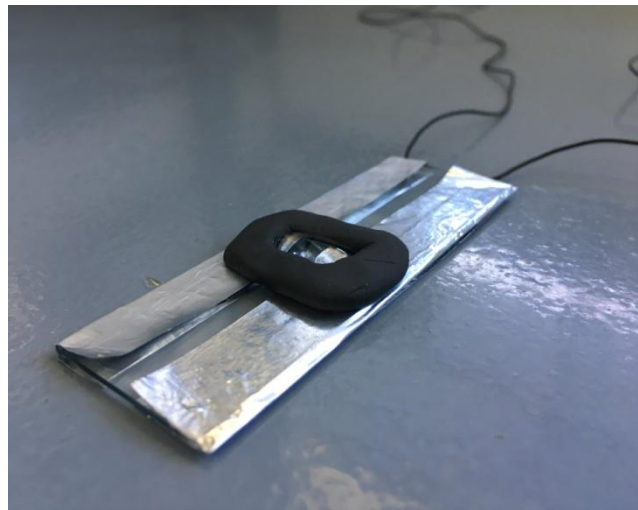
3) Por último introdujimos modificaciones para superar las limitaciones del dispositivo manteniendo la estimulación por campo y evitando estas condiciones de estrés. En base a las cámaras de estimulación usadas para estudiar cardiomiocitos de ratas y ratones se diseñó una cámara de paredes de acrílico y capaz de contener hasta 1 ml de hemolinfa. Su piso está formado por un

ubreobjetos que permite la visualización del preparado aún en grandes aumentos como 100x. El material conductor consiste en dos cables de platino ubicados en paralelo, entre los cuales se ubica el preparado a estimular. Al poner a prueba este dispositivo se observó una mejor respuesta del corazón estimulado, siguiendo mejor cada frecuencia y soportando por más tiempo períodos de estimulación más extensos (Figura 14 D).

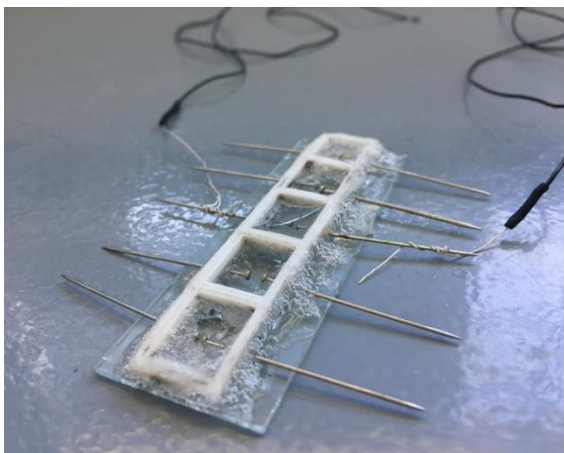
**Figura 14. A: Micromanipulador**



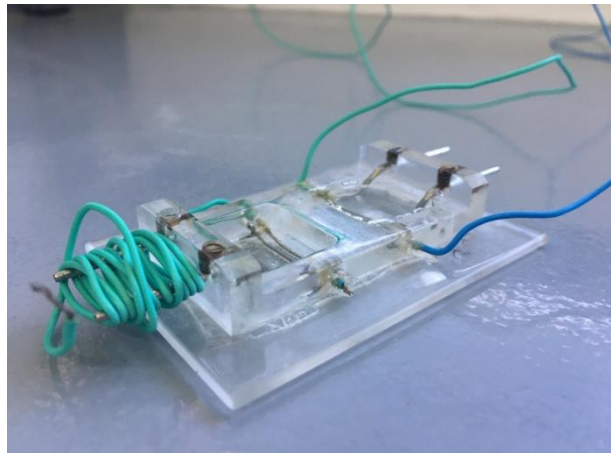
**B: Dispositivo con aluminio**



**C: Alfileres conductores**



**D: Cámara con electrodos de platino**



### **Determinación del método de adquisición**

Con el propósito de poder medir y cuantificar la respuesta al estímulo se pusieron a prueba diferentes métodos de obtención de la imagen en tres equipos diferentes.

<b>Equipo</b>	<b>Línea de mosca analizada</b>	<b>Parámetro a medir</b>
Microscopio Ion Optix con luz transmitida	Todas las líneas	Acortamiento
Ventajas	Todas las moscas pueden ser analizadas, independencia del gen reportero. El equipo presenta software de análisis diseñado exclusivamente para interpretar los registros.	
Desventajas	Dependencia de la luz transmitida. En preparados con mucho cuerpo graso no removido o en presencia de burbujas debido a la estimulación eléctrica, se distorsiona la adquisición del registro. Datos no comparables si se mueve el punto de referencia dónde se está registrando.	

<b>Equipo</b>	<b>Línea de mosca analizada</b>	<b>Parámetro a medir</b>
Microscopio Nikon Eclipse E200 Fluorescencia	Línea Hand-GFP	Acortamiento
Ventajas	Al trabajar en fluorescencia la interferencia de otros tejidos y las burbujas del preparado no interfieren. Se puede detectar la trayectoria	

	de una célula de manera consistente a lo largo de toda la estimulación.
Desventajas	La cámara integrada solo capta 15 cuadros por segundo, haciendo que falte información para lograr registros que capturen toda la dinámica del acortamiento.

Equipo	Línea de mosca analizada	Parámetro a medir
Microscopio Confocal LSM 4100 Analizado con line-scan	Hand-GFP	Acortamiento
Ventajas	Las burbujas y la interferencia del cuerpo graso no afectan la adquisición del parámetro a medir. Además la velocidad de escaneo del láser aumenta hasta 32 veces la cantidad de información posicional de la célula fluorescente.	
Desventajas	No se disponía de software para analizar el acortamiento. Para lograr registros medibles se debe trabajar con un aumento de 100x. La vaselina sobre la cual se fija la mosca así como la naturaleza tridimensional del corazón interfieren con la visualización del movimiento lateral de la célula fluorescente en un mismo plano. Esto requiere mucho cuidado para disponer el preparado de manera que la señal se registre permanentemente en el mismo plano.	

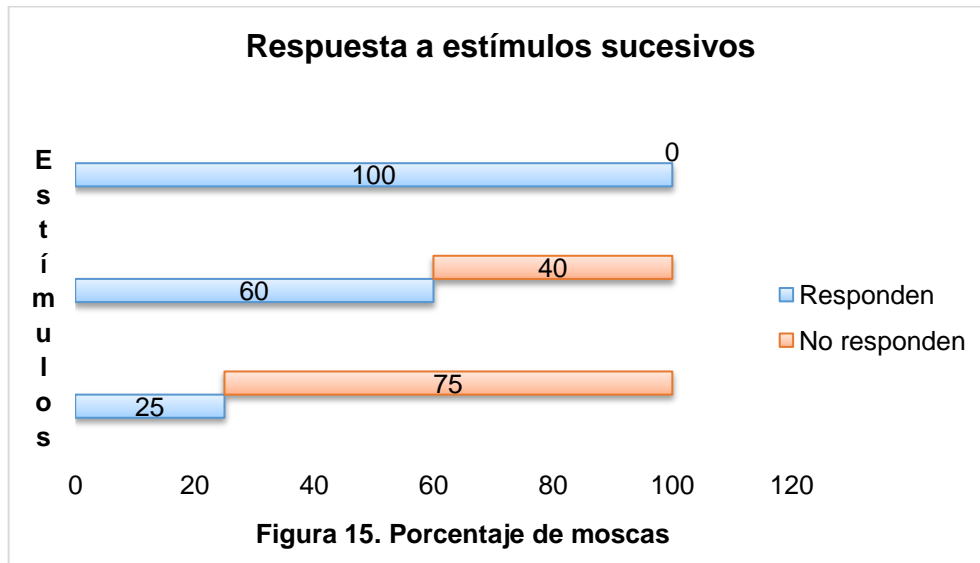
Equipo	Línea de mosca analizada	Parámetro a medir
Microscopio Confocal LSM 4100	GCaMP3	Transitorio de Ca <sup>2+</sup>

Analizado con spot			
Ventajas	Se obtiene mayor información al analizarse a través del reportero los cambios de $Ca^{2+}_i$ . Es el método tradicional de obtención de registros por parte del grupo de investigación. Los métodos de obtención y de análisis de imágenes se encuentran previamente establecidos y puestos a punto.		
Desventajas	El reportero recombina fácilmente y luego de varias amplificaciones se encuentra intacto sólo en el 20% de las moscas, por lo que el número de individuos requerido para lograr registros es mucho mayor que en otros casos.		

### ***Respuesta cardíaca a la estimulación en escalera***

La estimulación eléctrica en moscas, se ha usado sólo como método para generar estrés cardíaco y estudiar la respuesta del miocardio a estas condiciones (Piazza y col, 2009) por lo que el primer desafío con el cual nos enfrentamos fue limitar el estrés causado en el preparado semi intacto. Un factor esencial que nos permite lograr una estimulación sin que la mosca genere insuficiencia cardíaca es el pH de la hemolinfa artificial. En cada experimento, el ajuste del pH de la hemolinfa artificial a valores entre 7.2 y 7.4 fue crucial en la resistencia del corazón a los cambios de frecuencia.

La figura 15 muestra el porcentaje de moscas que responden a la aplicación de estímulos sucesivos hasta producirse insuficiencia cardíaca. Se observa que todas responden al primer estímulo, un 60% de los organismos responden al segundo y un 25% del número inicial responden al tercer estímulo. El resto desarrolla insuficiencia durante el marcapaseo.



### ***Porción del registro cuantificable***

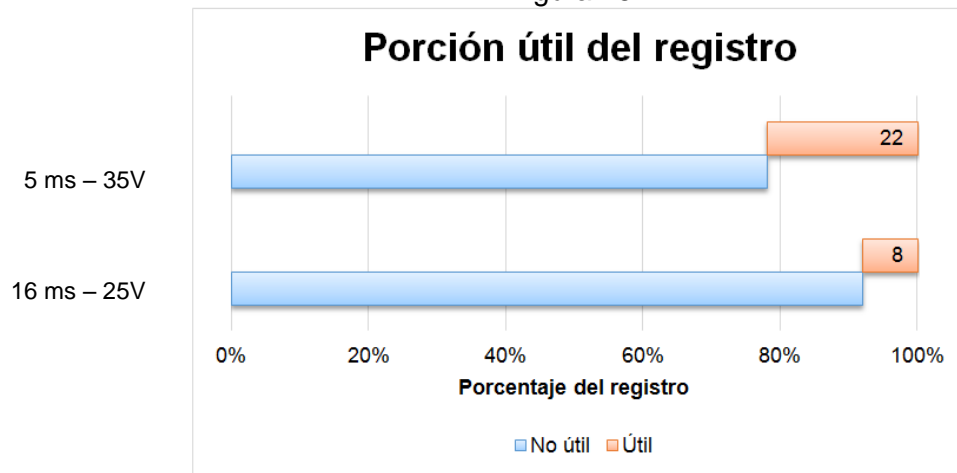
Para el análisis de los registros se tomaron en cuenta criterios establecidos previamente (Alex y col, 2015). Se midió la separación entre los máximos de los transitorios de  $Ca^{2+}$  o de acortamiento y se tomaron en cuenta los que seguían el estímulo al menos 3 veces sucesivas con un margen de error de  $\pm 0.1$  Hz. Para las mediciones se tuvieron en cuenta como mínimo 6 picos con dichas características. La figura 16 muestra la porción de registro útil según condiciones experimentales, establecidas de manera empírica mediante el seguimiento en vivo de la respuesta de la mosca como se muestra en el video adjunto.

Una de las causas por las cuales las moscas no sigan permanentemente la frecuencia de estimulación durante su registro podría ser la acción del marcapaso endógeno. La mosca presenta dos marcapasos endógenos: uno en la cámara cónica y otro en la cuarta cámara. Al presente existe un protocolo para anularlos, mediante su iluminación con una longitud de onda entre 420 y 440 nm. Sin embargo, este abordaje se realiza con la intención de matar al organismo (Rosales-Vega y col, datos no publicados). En aquellas situaciones en donde observamos que el marcapaso endógeno fue anulado, las moscas tampoco respondían a las frecuencias de estimulación eléctrica provistas por el



marcapaseo. Por lo tanto, la frecuencia dependía siempre del basal y se definía en diferentes rangos por encima del mismo tal como se muestran en las tablas presentadas en el anexo. Ante esta condición, es posible que el marcapaseo endógeno sea un factor que limite la extensión del registro sobre la cual se pueda analizar la función cardíaca en el rango de frecuencia administrado.

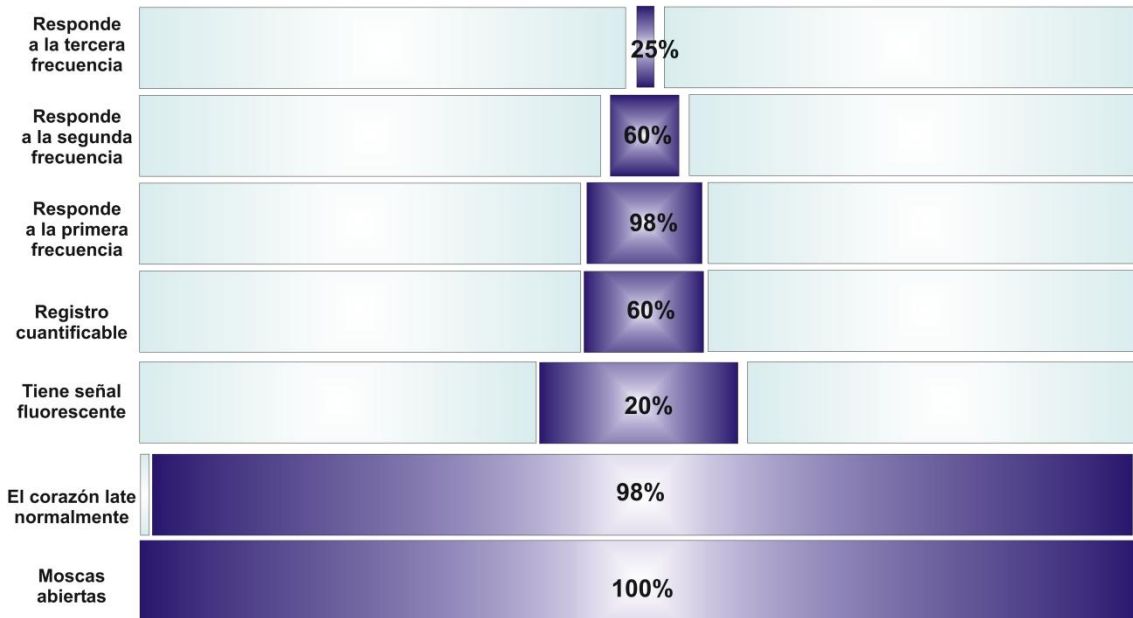
Figura 16.



### ***Eficiencia de los métodos utilizados***

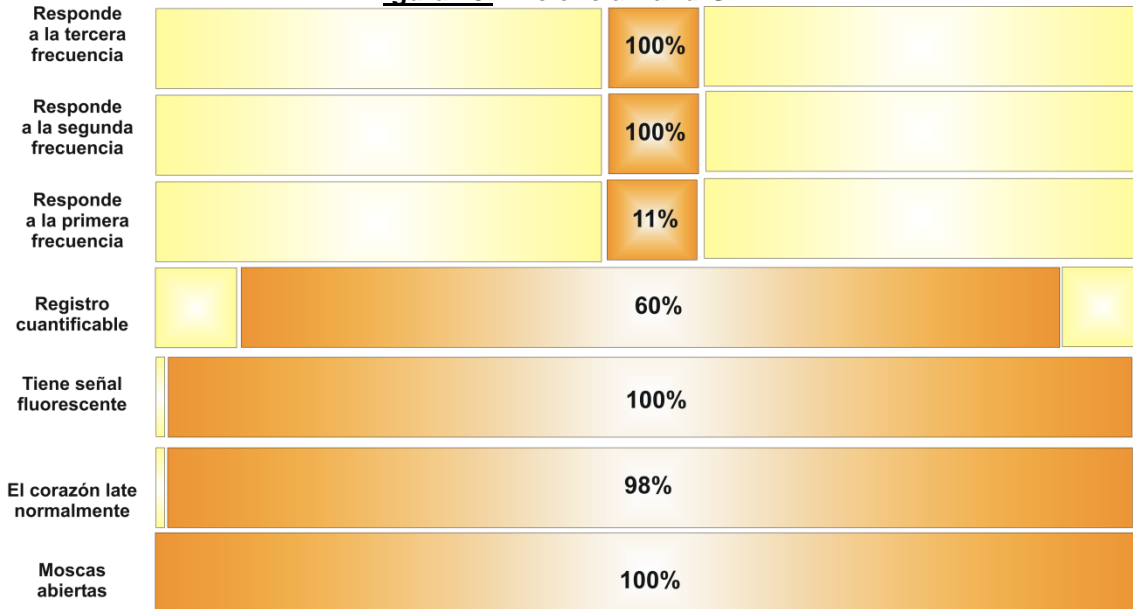
Los ensayos realizados en la línea de moscas *GCaMP3* arrojaron los siguientes resultados respecto de la eficiencia de la metodología y la posibilidad de obtener los datos necesarios para evaluar el efecto de la escalera. Esta línea permite cuantificar los cambios en la  $[Ca^{2+}]$  citosólica que subyace a la contractilidad cardíaca.

**Figura 17. Eficiencia GCaMP3**



Los mismos experimentos llevados a cabo en la línea *Hand-GFP* mostraron ciertas ventajas y desventajas respecto de los ensayos realizados en moscas de la línea GCaMP3. Esta línea permite medir acortamiento, por lo tanto no da cuenta del  $Ca^{2+}_i$  que precede a la contracción directamente, sino de la respuesta de los miofilamentos.

**Figura 18. Eficiencia Hand-GFP**



A modo exploratorio se realizaron cruzamientos entre moscas Hand-GFP y GCaMP3 para que la descendencia porte ambos sistemas reporteros. Los primeros ensayos nos permiten concluir que es posible utilizar ambos sistemas para obtener información.

***Drosophila melanogaster presenta escalera negativa ante el aumento de frecuencia de estimulación***

Una vez encontrado el protocolo adecuado, se usó el mismo para determinar el efecto de la escalera en la mosca: sabiendo que este efecto relaciona la frecuencia de estimulación con la amplitud del transitorio de calcio se usaron las moscas GCaMP3 para evaluar el ciclado de calcio cuando el preparado fue sometido a diferentes frecuencias de estimulación creciente. Al evaluar el ajuste lineal de la amplitud en función de la frecuencia de estimulación se pudo determinar que dicha relación es negativa. A medida que aumenta la frecuencia de estimulación el  $Ca^{2+}$  citosólico liberado en cada sístole disminuye, comportamiento que indica que el modelo tiene escalera negativa. Tal como lo muestra la figura 19, la disminución de la amplitud a las diferentes frecuencias es significativa.

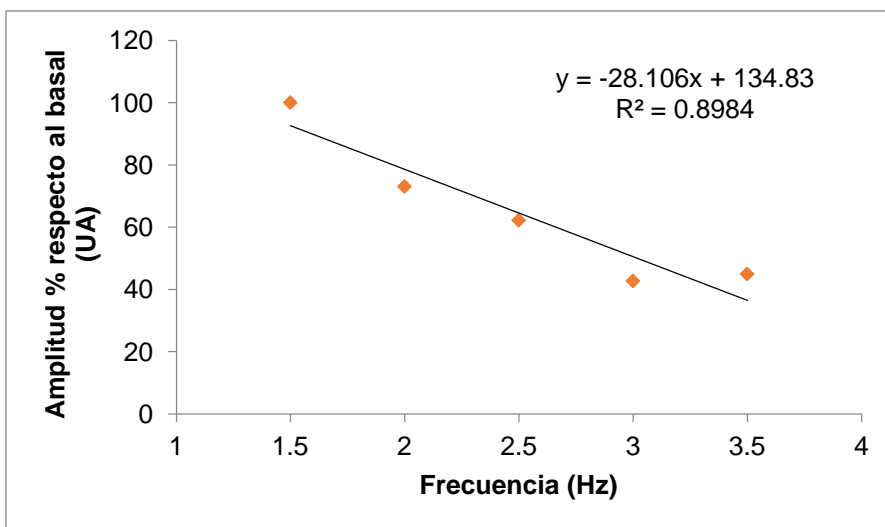
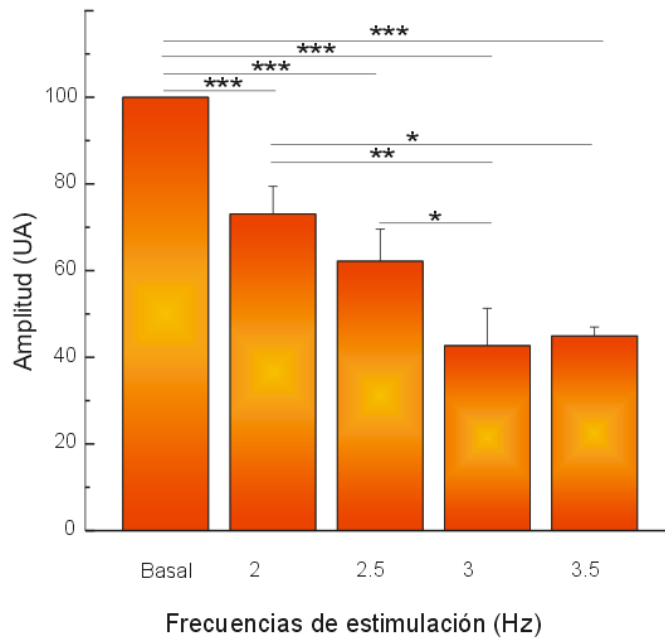


Figura 19. A: Correlación entre aumento de la frecuencia de estimulación y amplitud expresada en porcentaje respecto del valor basal registrado a frecuencia espontánea.



B: Valores promedio de amplitud comparados a las distintas frecuencias de estimulación respecto administradas.

Frecuencias: B vs 2 y B vs 2.5: \*\*p<0.01, B vs 3 y B vs 3.5: \*\*\*p<0.001, 2 vs 2.5 NS, p>0.05 2 vs 3: \*\* p<0.01 2 vs 3.5\* p<0.05 2.5 vs 3: \* p<0.05 2.5 vs 3.5 NS p>0.05

**El tiempo total del transitorio de  $Ca^{2+}$  se acorta ante el aumento de la frecuencia de estimulación**

A continuación, se analizó la cinética del transitorio de  $Ca^{2+}$ . El aumento de la frecuencia de estimulación disminuyó la duración del transitorio de  $Ca^{2+}$  de manera estadísticamente significativa. Esto se acompañó de una tendencia a la reducción tanto del tiempo de desarrollo de la contracción (tiempo al pico), como del tiempo de relajación ( $t_{1/2}$ ). De manera similar, se observa un incremento de las máximas velocidades de aumento y reducción de la fluorescencia (+dF/dt max y -dF/dt min) (Figura 20).

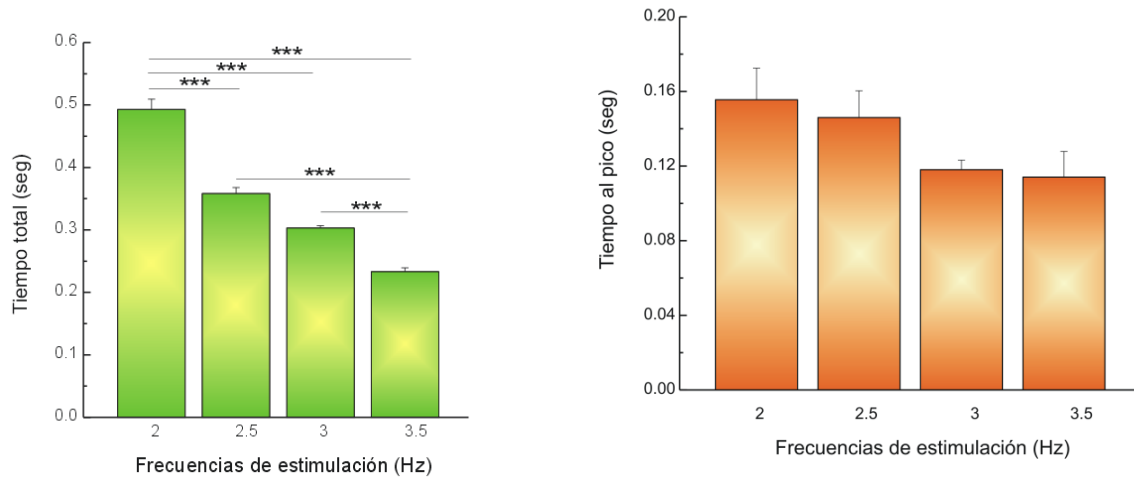
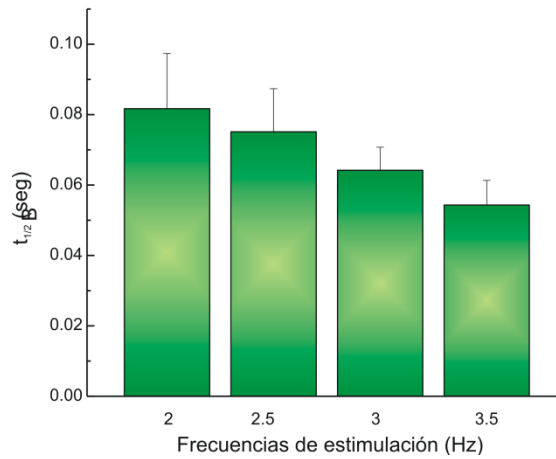


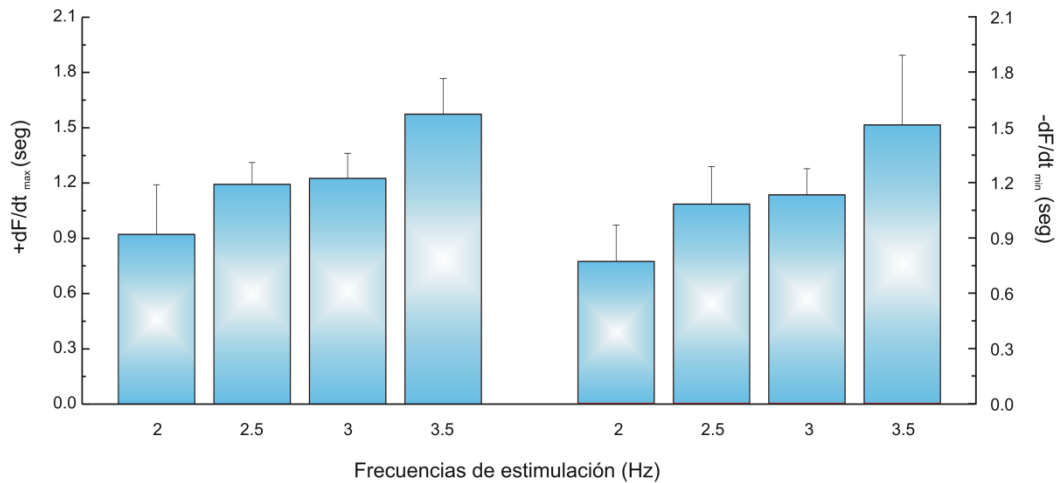
Figura 20. Arriba a la izquierda: resultados promedio que muestran la reducción del tiempo total de duración del transitorio de Ca<sup>2+</sup>. \*\*\*p<0.01

Arriba a la derecha se observa un leve acortamiento del tiempo al pico.

Al centro, se muestra el efecto relajante del aumento de frecuencia ya que el t<sub>1/2</sub> tiende a reducirse.



Abajo se observa un incremento progresivo de la velocidad de desarrollo de contracción y relajación (izquierda y derecha, respectivamente).



Otra manera de evaluar la función cardíaca es mediante el análisis del desplazamiento de los cardiomiocitos que forman la pared del corazón y la reducción del lumen cardíaco durante la sístole. Esto es una estimación del acortamiento de las células durante la contracción. Una primera aproximación consistió en adquirir registros del movimiento lateral de células cardíacas o pericárdicas identificando bordes del corazón de manera similar a la forma en que se identifican los bordes en cardiomiocitos de mamífero aislados, usando luz transmitida y un software capaz de seguir y cuantificar en vivo el movimiento de una región particular del preparado a través del tiempo. Este abordaje a pesar de su conveniencia debido a la facilidad de la toma del registro no produjo mediciones consistentes a través del cambio de frecuencias, ya que para detectar el movimiento, el software conectado a la cámara debe reconocer regiones con alto contraste y dichas regiones no quedan claramente definidas debido a la naturaleza del preparado de moca. Además pueden variar o perderse con el tiempo haciendo que el registro varíe de manera artificial. Otro problema que presenta esta manera de medir frecuencias en la generación de burbujas que se produce en la hemolinfa al estimular eléctricamente, dichas burbujas muchas veces obstruyen la región donde se está evaluando el movimiento. Por estas razones se descartó el uso de luz transmitida para medir el movimiento de las paredes del corazón.

Para solucionar este problema se utilizó una línea de moscas transgénicas recientemente llegadas al laboratorio, que expresan GFP de manera constitutiva en células del pericardio y en cardiomiocitos. Al utilizar fluorescencia se evitan interferencias producidas por restos de otros tejidos y generación de burbujas que entorpecen la medición del movimiento de las paredes del corazón.

En primera instancia se caracterizaron tres líneas independientes que expresan GFP. Dichas líneas provienen de eventos diferentes de transgénesis. Para elegir una de las tres líneas se caracterizó la ultraestructura del preparado semi intacto el microscopio de fluorescencia. Para ello se puso a punto un protocolo de tinción con faloidina y nuclear mask. Se pudo determinar que todas

las líneas expresaban GFP en células del pericardio, pero sólo una de las líneas (2.2) expresaba de manera más fuerte GFP en cardiomiocitos (Figura 21). En experimentos posteriores solamente se usó línea Hand-GFP 2.2.



Figura 21. Líneas mutantes con expresión de Hand-GFP.

Para observar el movimiento de las paredes del corazón fue preciso determinar una manera de seguir el movimiento de las células marcadas con el reportero. Uno de los abordajes ensayados consistió en utilizar un microscopio de fluorescencia con cámara CCD incorporada. Los registros fueron realizados a través de videos en los cuales se seguía el movimiento de las células a través del tiempo. Este método cuenta con la ventaja de ser rápido y directo ya que los cambios en el comportamiento celular pueden visualizarse al mismo tiempo que están ocurriendo. Además se puede seguir de manera consistente siempre la misma célula que expresa el reportero, lográndose registros más confiables. La desventaja principal de la utilización de este método es la máxima cantidad de cuadros por segundo que puede detectar la cámara. Al detectar un número muy bajo de cuadros por segundos, la información posicional de las células ofrecida por la cámara, no fue suficiente para trazar la dinámica del movimiento con una gran cantidad de puntos que permitan las mediciones de los parámetros típicos.

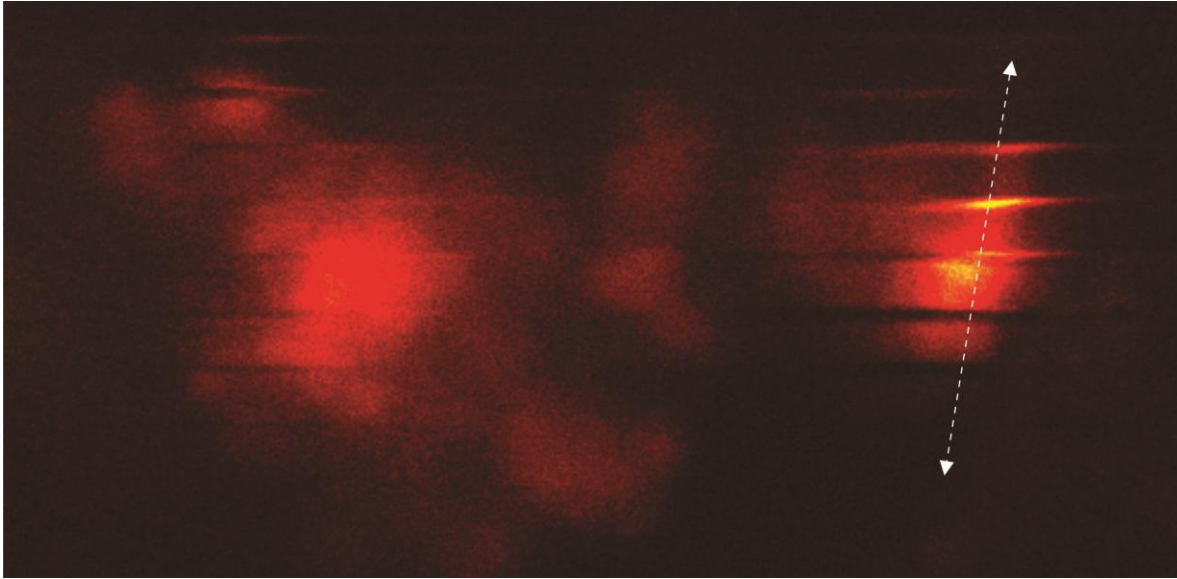


Figura 22. Determinación del recorrido de la célula pericárdica y establecimiento de la línea de trayectoria. Microscopio confocal, 100x, escaneo de 8 segundos.

Debido a esta limitación se desarrolló una manera de seguir el movimiento de una única célula que expresa el reportero GFP utilizando escaneo láser. Para esto se utilizó el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 410. Dicho microscopio cuenta con un modo de escaneo láser sobre una línea definida por el usuario. La línea fue seteada sobre la trayectoria que describe una célula pericárdica o un cardiomiocito al contraerse (Figura 22). De esta manera la cantidad de información recolectada del movimiento aumenta hasta 32 veces con respecto al método anterior. Finalmente se obtiene de este registro la información posicional a través del tiempo de una célula particular (Figura 23). El desafío en este caso estuvo en desarrollar un método que permita transformar esta imagen en un gráfico cuantificable, por lo que se desarrolló un software específico para convertir el tipo de imagen obtenida en coordenadas numéricas.



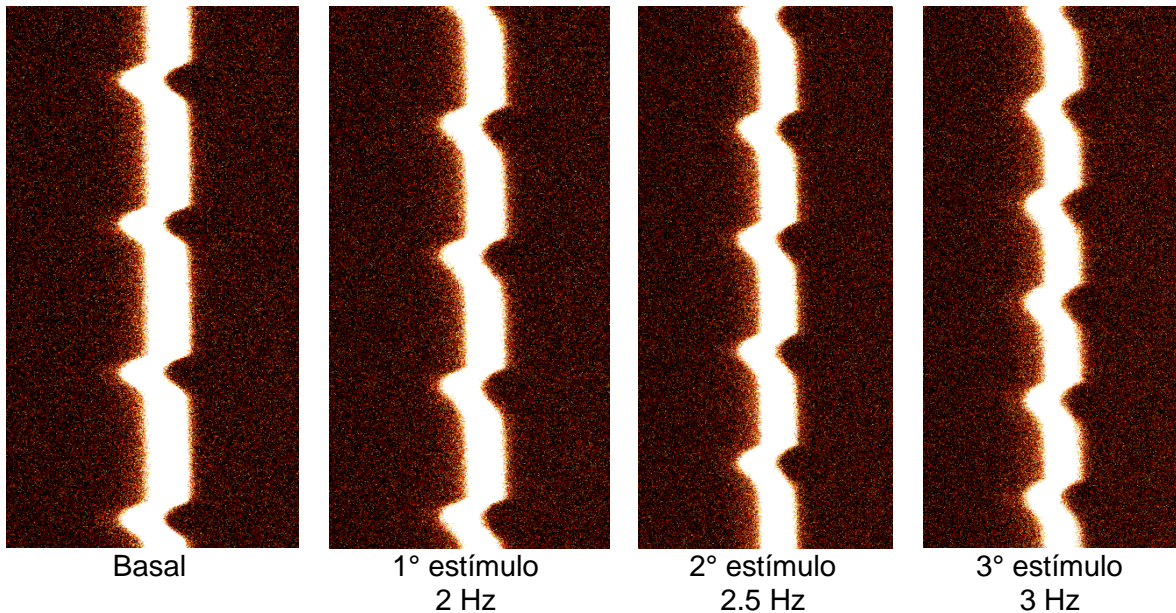


Figura 23. Registro típico obtenido analizando la trayectoria de una célula marcada con GFP a frecuencias crecientes.

Los datos procesados pudieron ser analizados de manera similar a los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al observar cómo varía el movimiento de las paredes del corazón cuando se lo estimula eléctricamente a diferentes frecuencias se pudo identificar un comportamiento concordante con lo registrado previamente en el ciclado de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como era de esperarse en un organismo que presenta escalera negativa, a mayor frecuencia cardíaca las paredes del corazón recorren una trayectoria cada vez menor. Así, esta otra cepa de moscas permite analizar la función mecánica del miocardio mientras que la línea GCaMP3 permite analizar cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$ .

### ***Aislamiento de cardiomiocitos***

Luego de aplicar el protocolo adaptado a partir del que se utiliza en mamífero, se obtuvieron células pericárdicas y cardiomiocitos fluorescentes verdes que pudieron ser individualizados en el cultivo (Figura 24). Esto deja abierta la posibilidad de perfeccionar la técnica para realizar estudios funcionales en un futuro, en donde se pueda medir acortamiento tal como ocurre en células aisladas

de tejido cardíaco en otros organismos.

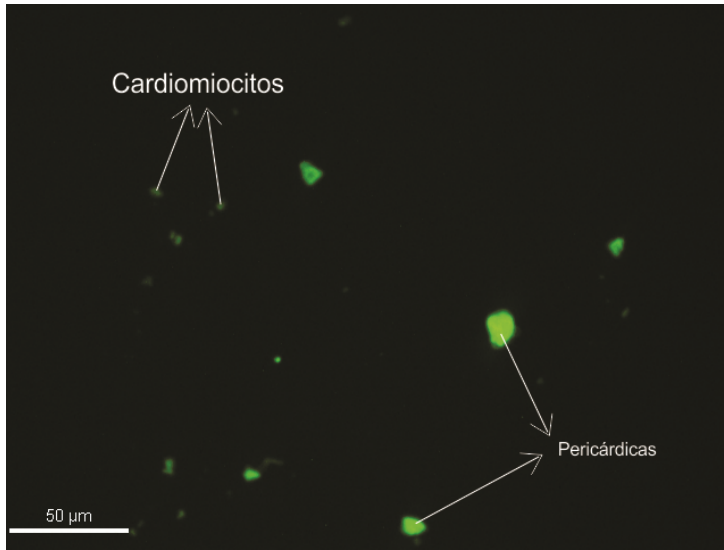


Figura 24. Cardiomiocitos y células pericárdicas aisladas, microscopio de fluorescencia 10x.

## DISCUSIÓN

En este trabajo nos centramos en caracterizar el efecto de la escalera en *Drosophila melanogaster* dada su importancia como modelo para el estudio de enfermedades cardíacas humanas. Nuestro equipo de trabajo, a partir del conocimiento de la fisiología cardíaca del mamífero y de técnicas genéticas ampliamente utilizadas en la mosca de la fruta, se enfoca en conocer fenómenos de su fisiología aún no estudiados y desarrollar metodologías innovadoras. Se buscan respuestas en los genes a fenómenos fisiológicos varios y como *Drosophila melanogaster* presenta el 75% de sus genes conservados con los mamíferos superiores, los resultados son factibles de ser extrapolados al humano.

Este trabajo final de grado constituye un aporte nuevo a un aspecto que ha sido estudiado en el hombre desde el punto de vista fisiopatológico, pero no genético. Por lo tanto nos enfocamos en conocer este aspecto en la mosca de la fruta para ahondar en las bases genéticas de un fenómeno fisiológico común entre la mosca y el humano, que es la respuesta al aumento de la frecuencia cardíaca.

El efecto Bowditch o fenómeno de la escalera, estudiado en otros organismos modelo, es variable según la especie y la condición de sano o enfermo, siendo positiva o negativa. Aquí identificamos por primera vez la respuesta al aumento de frecuencia en la mosca de la fruta y hallamos un método experimental adecuado para estudiarla.

Tradicionalmente estos ensayos son llevados a cabo en modelos de mamíferos, donde existen técnicas desarrolladas como la estimulación eléctrica de corazón entero y la estimulación de cardiomiocitos aislados (Vila Petroff y col, 2003, Valverde y col, 2005). En *Drosophila* existen trabajos pioneros en donde se ha estimulado eléctricamente el corazón de la mosca entera (Vogler y Ocorr 2009, Ocorr y col, 2014) pero como una estrategia para evaluar la respuesta de *Drosophila* al estrés, en diferentes situaciones experimentales (Piazza y col, 2009, Vogler y Ocorr, 2009). Los protocolos de estimulación existentes se basan en conducir electricidad de alto voltaje a través del cuerpo de la mosca durante períodos cortos de tiempo separados por momentos de descanso (Ocorr y col, 2014) . Recientemente se ha desarrollado un nuevo método para estimular el corazón a frecuencias determinadas basado en optogenética. Dichos protocolos se fundamentan en la incidencia de luz de una determinada longitud de onda, sobre un canal sensible a la misma (canal de rodopsina). Este, al recibir un estímulo lumínico en la longitud adecuada genera la despolarización de la membrana del corazón y su posterior contracción. Este nuevo método cuenta con la ventaja de reducir el estrés al estímulo, problema principal que existe al utilizar el marcapaseo como método para estudios de funcionalidad cardíaca y no de inducción de estrés (Jenkins y col, 2010, Inagakiy col, 2014, Alex y col, 2015, Riemensperger y col, 2016, Zhu y col, 2016) .

En el presente trabajo, se desarrollaron diferentes métodos de estimulación eléctrica con el menor impacto posible como agente causante de estrés. En esto fue esencial llevar a cabo los experimentos en un pH neutro para completar la secuencia de estimulación, en concordancia con estudios previos (Zhu y col, 2016). Para reducir el estrés mecánico, se probaron varias condiciones y la más

adecuada fue una cámara de estimulación semejante a la usada con cardiomiocitos aislados de mamífero. Otra variable ajustada fue la forma en que se administró el estímulo eléctrico. En un primer momento se administraba en tiempos de un minuto con un minuto de descanso entre diferentes frecuencias, de la misma manera que se realiza la estimulación eléctrica en mosca entera (Vogler y Ocorr 2009). Luego se ensayó un segundo modo de administración del impulso, basado en trabajos que describen el efecto de la escalera en otros modelos estudio y la estimulación eléctrica se hizo de manera continua sin descansos intermedios (Valverde y col 2005). Por último para ajustar el protocolo se probaron dos combinaciones de voltaje y amplitud del pulso, hasta lograr un ensayo de estimulación eléctrica viable y reproducible.

En cuanto a la medición de parámetros fisiológicos, este trabajo combina técnicas puestas a punto previamente y el diseño de nuevos métodos de obtención y análisis de imágenes para medir el fenómeno de acortamiento. Esto nos permitió grabar la función cardíaca *in vivo* y obtener registros de alta definición mediante microscopia confocal. La diferencia entre nuestros métodos de adquisición de la señal y los ya establecidos mediante el uso de tomografía de coherencia óptica, es que en nuestro caso medimos cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  mientras que en los otros se mide actividad mecánica sin uso de sistemas reporteros fluorescentes. Esto último, también nos ha permitido registrar la actividad mecánica con el equipamiento disponible.

Hemos explorado la eficiencia de varios métodos de marcapaseo, de las líneas transgénicas elegidas y de diferentes software para el análisis de datos. Así, hemos combinado el uso de técnicas y equipos existentes y hemos desarrollado nuevas técnicas, elementos y software para obtener nuestros resultados. Este ha sido un aporte muy significativo para el tema de estudio y el resto de las líneas de investigación del grupo.

En cuanto a las líneas transgénicas utilizadas, en las moscas GCaMP3 la mayor pérdida de individuos se produce por la falta de señal detectable, posiblemente debido a la recombinación del gen reportero. En el caso de las

moscas Hand- GFP este problema se ve mitigado ya que la mayoría expresa el gen reportero de manera adecuada para obtener una buena señal fluorescente ya que el transgén es más estable. En este caso, el principal desafío fue lograr un buen foco sobre una célula marcada fluorescente, ya que se trabaja con aumento de 100x y un preparado relativamente opaco inmovilizado en una capa de vaselina.

La segunda cuestión a tener en cuenta al evaluar la eficiencia de los métodos desarrollados fue la porción de registro útil, entendida como aquella en donde la mosca sigue claramente la frecuencia de estimulación eléctrica aplicada. La presencia de los dos marcapasos endógenos funcionales podría influir en el hecho de que la mosca no responda a todas las frecuencias asignadas. Debido a que no fue posible anular el marcapaso por los métodos descriptos, se intentó realizar un aislamiento de miocitos para analizarlos individualmente utilizando métodos estandarizados en mamíferos (Vila Petroff *y col*, 2003, Valverde *y col*, 2005). Se obtuvieron cardiomiocitos aislados aunque su disponibilidad para estudios funcionales requerirá una exhaustiva puesta a punto en el futuro.

La porción de registro útil ha sido muy diferente entre las moscas GCamP3 y Hand-GFP. En el primer caso la estimulación duró un minuto por cada frecuencia. Durante tres estímulos, se observó que a medida que pasaba el tiempo un porcentaje mayor de moscas desarrollaban insuficiencia cardíaca. Mientras que en el caso del registro de acortamiento utilizando el reportero Hand-GFP, se observó una fuerte división entre moscas que no seguían ninguna de las frecuencias de estimulación y moscas que seguían durante todo el tiempo de estimulación todas las frecuencias impartidas, sin generar insuficiencia. Creemos que esta diferencia del comportamiento se fundamenta en los tiempos de estimulación a los que están sometidos los preparados en uno y otro caso. Mientras que registros más largos aumentan la posibilidad de que la mosca siga la frecuencia en alguno de sus tramos, los registros más cortos disminuyen el efecto estresante del estímulo, observándose una menor incidencia de insuficiencia cardíaca.

## **Perspectivas**

Sobre las bases moleculares del efecto de la escalera, queda pendiente repetir estos estudios en moscas mutantes en proteínas que manejan  $\text{Ca}^{2+}$  como la SERCA. El laboratorio cuenta con mutantes y moscas que expresan un ARN de interferencia contra esta proteína. De manera preliminar en este trabajo, se caracterizó la disminución de SERCA en corazones de moscas que expresan un ARNi contra dicha proteína mediante western blot. Quedan pendientes estudios funcionales de transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o acortamiento ante aumentos de la frecuencia de estimulación, para saber si esta proteína está implicada en las causas por las cuales se observa en la mosca una escalera negativa y un efecto relajante.

Cómo perspectiva futura se está trabajando con colaboradores de la universidad Osnabrück para desarrollar una mosca doble mutante que exprese los dos sistemas reporteros (GCaMp3 y Hand-GFP) y que permita la medición de ambos parámetros - $\text{Ca}^{2+}$  y acortamiento- en un mismo individuo.

También esperamos poder ahondar en los mecanismos moleculares que determinan el fenómeno ya que aún no se encuentran totalmente dilucidados en ningún modelo animal. Para esto se trabajará en primera instancia con mutantes de SERCA, que expresan deficiencia y ganancia de función en dicha proteína.

## **Conclusión**

Se pudo determinar que el modelo de estudio *Drosophila melanogaster* presenta escalera negativa ya que la amplitud del transitorio desciende conforme aumenta la frecuencia de estimulación. Se puede observar una tendencia a la reducción del tiempo de relajación así como un incremento de las máximas velocidades de desarrollo de contracción y relajación ante el aumento de la frecuencia de estimulación.

## Bibliografía

Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. R. Nelson, G. L. Gabor, J. F. Abril, A. Agbayani, H. J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. H. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G. H. Karpen, Z. Ke, J. A. Kennison, K. A. Ketchum, B. E. Kimmel, C. D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S. M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D. M. Muzny, D. L. Nelson, D. R. Nelson, K. A. Nelson, K. Nixon, D. R. Nusskern, J. M. Pacleb, M. Palazzolo, G. S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Siden-Kiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A. C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A. H. Wang, X. Wang, Z. Y. Wang, D. A. Wassarman, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, WoodageT, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R. F. Yeh, J. S.

Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X. H. Zheng, F. N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H. O. Smith, R. A. Gibbs, E. W. Myers, G. M. Rubin and J. C. Venter (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287(5461): 2185-2195.

Alex, A., A. Li, R. E. Tanzi and C. Zhou (2015). "Optogenetic pacing in *Drosophila melanogaster*." *Sci Adv* 1(9): e1500639.

Allen, D. G. and J. R. Blinks (1978). "Calcium transients in aequorin-injected frog cardiac muscle." *Nature* 273(5663): 509-513.

Blaustein, M. P. and W. J. Lederer (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications." *Physiol Rev* 79(3): 763-854.

Bryantsev, A. L. and R. M. Cripps (2009). "Cardiac gene regulatory networks in *Drosophila*." *Biochim Biophys Acta* 1789(4): 343-353.

Curtis, N. J., J. M. Ringo and H. B. Dowse (1999). "Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*." *J Morphol* 240(3): 225-235.

Chen, M. H., T. W. Liu, L. Xie, F. Q. Song, T. He, Z. Y. Zeng and S. R. Mo (2007). "A simpler cardiac arrest model in rats." *Am J Emerg Med* 25(6): 623-630.

De la Serna, F. (2010). *Insuficiencia Cardíaca Crónica*, Editorial Federación Argentina de Cardiología.

Duffy, J. B. (2002). "GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife." *Genesis* 34(1-2): 1-15.



Feldman MD, G. J., Phillips P, Schoen F, Morgan JP (1988). "Reversal of the force–frequency relationship in working myocardium from patients with end-stage heart failure." *J Appl Cardiol* 3:273–83.

Garg, V. (2006). "Insights into the genetic basis of congenital heart disease." *Cell Mol Life Sci* 63(10): 1141-1148.

Harwood, C. L., F. C. Howarth, J. D. Altringham and E. White (2000). "Rate-dependent changes in cell shortening, intracellular Ca(2+) levels and membrane potential in single, isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ventricular myocytes." *J Exp Biol* 203(Pt 3): 493-504.

Higginbotham, M. B., K. G. Morris, R. S. Williams, P. A. McHale, R. E. Coleman and F. R. Cobb (1986). "Regulation of stroke volume during submaximal and maximal upright exercise in normal man." *Circ Res* 58(2): 281-291.

Hill-Burns, E. M., N. Singh, P. Ganguly, T. H. Hamza, J. Montimurro, D. M. Kay, D. Yearout, P. Sheehan, K. Frodey, J. A. McLearn, M. B. Feany, S. D. Hanes, W. J. Wolfgang, C. P. Zabetian, S. A. Factor and H. Payami (2013). "A genetic basis for the variable effect of smoking/nicotine on Parkinson's disease." *Pharmacogenomics J* 13(6): 530-537.

Hudmon A, P. G., Tsien RW, Schulman H. (2002). "Molecular mechanism and regulation of the interaction between calcium–calmodulin dependent protein kinase II and the L-type calcium channel." *Biophys J* 82:172a.

Inagaki, H. K., Y. Jung, E. D. Hoopfer, A. M. Wong, N. Mishra, J. Y. Lin, R. Y. Tsien and D. J. Anderson (2014). "Optogenetic control of *Drosophila* using a red-shifted channelrhodopsin reveals experience-dependent influences on courtship." *Nat Methods* 11(3): 325-332.

Jenkins, M. W., A. R. Duke, S. Gu, H. J. Chiel, H. Fujioka, M. Watanabe, E. D. Jansen and A. M. Rollins (2010). "Optical pacing of the embryonic heart." *Nat Photonics* 4: 623-626.

Knisley, S. B., N. Trayanova and F. Aguel (1999). "Roles of electric field and fiber structure in cardiac electric stimulation." *Biophys J* 77(3): 1404-1417.

Knollmann, B.C., and D.M. Roden. (2008). "A genetic framework for improving arrhythmia therapy". *Nature* 451:929-936.

Kurihara, S. and D. G. Allen (1982). "Intracellular Ca<sup>++</sup> transients and relaxation in mammalian cardiac muscle." *Jpn Circ J* 46(1): 39-43.

Lin, N., N. Badie, L. Yu, D. Abraham, H. Cheng, N. Bursac, H. A. Rockman and M. J. Wolf (2011). "A method to measure myocardial calcium handling in adult *Drosophila*." *Circ Res* 108(11): 1306-1315.

Maier, L. S., D. M. Bers and B. Pieske (2000). "Differences in Ca(2+)-handling and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-content in isolated rat and rabbit myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 32(12): 2249-2258.

Maier, L. S., B. Pieske and D. G. Allen (1997). "Influence of stimulation frequency on [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and contractile function in Langendorff-perfused rat heart." *Am J Physiol* 273(3 Pt 2): H1246-1254.

Marin, R. M. and K. G. Franchini (2005). "Reduced oxygen supply explains the negative force-frequency relation and the positive inotropic effect of adenosine in buffer-perfused hearts." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1): H131-136.

Medioni, C., S. Senatore, P. A. Salmand, N. Lalevee, L. Perrin and M. Semeriva (2009). "The fabulous destiny of the *Drosophila* heart." *Curr Opin Genet Dev* 19(5): 518-525.

Merrill, D. R., M. Bikson and J. G. Jefferys (2005). "Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols." *J Neurosci Methods* 141(2): 171-198.

Mulieri, L. A., G. Hasenfuss, B. Leavitt, P. D. Allen and N. R. Alpert (1992). "Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure." *Circulation* 85(5): 1743-1750.

Muqit, M. M. and M. B. Feany (2002). "Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach?" *Nat Rev Neurosci* 3(3): 237-243.

Ocorr, K., G. Vogler and R. Bodmer (2014). "Methods to assess *Drosophila* heart development, function and aging." *Methods* 68(1): 265-272.

Palomeque, J., M. V. Petroff, L. Sapia, O. A. Gende, C. Mundina-Weilenmann and A. Mattiazzi (2007). "Multiple alterations in Ca<sup>2+</sup> handling determine the negative staircase in a cellular heart failure model." *J Card Fail* 13(2): 143-154.

Palomeque, J., M. G. Vila Petroff and A. Mattiazzi (2004). "Pacing staircase phenomenon in the heart: from Bowditch to the XXI century." *Heart Lung Circ* 13(4): 410-420.

Piazza, N., B. Gosangi, S. Devilla, R. Arking and R. Wessells (2009). "Exercise-training in young *Drosophila melanogaster* reduces age-related decline in mobility and cardiac performance." *PLoS One* 4(6): e5886.

Piazza, N. and R. J. Wessells (2011). "*Drosophila* models of cardiac disease." Prog Mol Biol Transl Sci 100: 155-210.

Pierce, B. A. (2004). "Genetics: A Conceptual Approach " (2nd ed.).

Pieske, B., B. Kretschmann, M. Meyer, C. Holubarsch, J. Weirich, H. Posival, K. Minami, H. Just and G. Hasenfuss (1995). "Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy." Circulation 92(5): 1169-1178.

Pieske, B., L. S. Maier, D. M. Bers and G. Hasenfuss (1999). "Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium." Circ Res 85(1): 38-46.

Pieske, B., L. S. Maier, V. Piacentino, 3rd, J. Weisser, G. Hasenfuss and S. Houser (2002). "Rate dependence of [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and contractility in nonfailing and failing human myocardium." Circulation 106(4): 447-453.

Piper, M. D., E. Blanc, R. Leitao-Goncalves, M. Yang, X. He, N. J. Linford, M. P. Hoddinott, C. Hopfen, G. A. Soultoukis, C. Niemeyer, F. Kerr, S. D. Pletcher, C. Ribeiro and L. Partridge (2014). "A holidic medium for *Drosophila melanogaster*." Nat Methods 11(1): 100-105.

Puglisi, J. L., J. A. Negroni, Y. Chen-Izu and D. M. Bers (2013). "The force-frequency relationship: insights from mathematical modeling." Adv Physiol Educ 37(1): 28-34.

Reiter, L. T., L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov and E. Bier (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*." Genome Res 11(6): 1114-1125.

Ricci, D. R., A. E. Orlick, E. L. Alderman, N. B. Ingels, Jr., G. T. Daughters, 2nd, C. A. Kusnick, B. A. Reitz and E. B. Stinson (1979). "Role of tachycardia as an inotropic stimulus in man." *J Clin Invest* 63(4): 695-703.

Riemensperger, T., R. J. Kittel and A. Fiala (2016). "Optogenetics in *Drosophila* Neuroscience." *Methods Mol Biol* 1408: 167-175.

Rizki, R. M. (1978). "The circulatory system and associated cells and tissues." Ashburner M, Wright T, editors. *The genetics and biology of Drosophila*, vol 2b. London: Academic Press.: 397–452.

Ross M H, P. W. (2010). "Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular." 5° ed.

Rotstein, B. and A. Paululat (2016). "On the Morphology of the *Drosophila* Heart." *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 3(2): 15.

Santalla M, P. E., Ferrero PV (2016). "*Drosophila melanogaster*, un modelo animal emergente en el estudio de enfermedades cardíacas humanas." *Rev Argent Cardiol* 84:424-30.

Santalla, M., C. A. Valverde, E. Harnichar, E. Lacunza, J. Aguilar-Fuentes, A. Mattiazzi and P. Ferrero (2014). "Aging and CaMKII alter intracellular Ca<sup>2+</sup> transients and heart rhythm in *Drosophila melanogaster*." *PLoS One* 9(7): e101871.

Shiels, H. A., M. Vornanen and A. P. Farrell (2002). "The force-frequency relationship in fish hearts--a review." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132(4): 811-826.

Togel, M., H. Meyer, C. Lehmacher, J. J. Heinisch, G. Pass and A. Paululat (2013). "The bHLH transcription factor hand is required for proper wing heart formation in *Drosophila*." *Dev Biol* 381(2): 446-459.

Valverde, C. A., C. Mundina-Weilenmann, M. Said, P. Ferrero, L. Vittone, M. Salas, J. Palomeque, M. V. Petroff and A. Mattiazzi (2005). "Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation." *J Physiol* 562(Pt 3): 801-813.

Vila Petroff, M. G., J. Palomeque and A. R. Mattiazzi (2003). "Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium." *J Physiol* 550(Pt 3): 801-817.

Vogler, G. and K. Ocorr (2009). "Visualizing the beating heart in *Drosophila*." *J Vis Exp*(31).

Wasserthal, L. T. (2007). "*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* 210(Pt 21): 3707-3719.

Wohlfart, B. and M. I. Noble (1982). "The cardiac excitation-contraction cycle." *Pharmacol Ther* 16(1): 1-43.

Zhu, Y. C., H. Uradu, Z. R. Majeed and R. L. Cooper (2016). "Optogenetic stimulation of *Drosophila* heart rate at different temperatures and Ca<sup>2+</sup> concentrations." *Physiol Rep* 4(3).

**Anexo**

***Tabla de frecuencias, rangos y conversiones***

Voltaje	Ancho de pulso (ms)	Estímulos		Latidos por minuto	
		Hz	Milisegundos (ms)		
25 V	16 ms	0,5	2000	30	
35 V	5 ms	0,75	1333	45	
		1	1000	60	
		1,25	800	75	
		1,5	666	90	
		1,75	571	105	
		2	500	120	
		2,25	444	135	
		2,5	400	150	
		2,75	363	165	
		3	333	180	
		3,25	307	195	
		3,5	285	210	
		3,75	266	225	
		4	250	240	

***Medio de cultivo para Drosophila:***

- Agua 225 ml
- Glucosa 22 g
- Levadura 4,4 g
- Agar 2,65 g
- Harina de maíz 25 g
- Nipagin 10% w/v.

Llevar los 225 ml de agua destilada a hervor, agregar la glucosa, levadura, agar y harina de maíz consecutivamente. Espesar hasta la consistencia deseada. Una vez entibiada la mezcla agregar el antimicótico y colocar en los viales.

***Hemolinfa artificial:***

-108mM NaCl,

-5mM KCl

-2mM CaCl<sub>2</sub>

-8mM MgCl<sub>2</sub>,

-1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

- 4mM NaHCO<sub>3</sub>,

-10mM sacarosa,

-5mM trehalosa,

-5mM HEPES (pH 7,1).

***Gel separador Laemmli 10% acrilamida:***

-Acrilamida-bis (30: 0,8) 2 ml

-Tris-Hcl 1,5M pH=8,8 1,3 ml

-SDS 10% 50 µl

-APS 10% 50 µl

-Temed 5 µl

-Agua bidestilada 1,6 ml

***Gel de apilamiento Laemmli 4% acrilamida:***

-Acrilamida-bis (30: 0,8) 266,5 ml

-Tris-HCl 0,5M pH=6,8 500 µl

-SDS 10% 20 µl

-APS 10% 25 µl



-Temed 2,5  $\mu$ l

-Agua bidestilada 1,233 ml

***Buffer de corrida (1 litro):***

-Tris 3,03 g (25 mM, conc. Final)

-Glicina 14,4 g (192 mM, conc final)

-SDS 1g (0.1%)

Llevar a volumen final (1 litro) con agua bidestilada.

***Buffer de transferencia (1 litro):***

-Tris 3,0275 g (25 mM, conc. Final)

-Glicina 14,41 g (192 mM, conc final)

-Metanol 100 ml (10% vol final)

Llevar a volumen final (1 litro) con agua bidestilada.

***Protocolo de tinción (original)***

Se agregó 1ml por well de PFA 4% durante 15 minutos.

Se agregó 1ml por well de tritón 0.5 diluído en PBS. 5 minutos.

Se lavó 2 veces con PBS 1x. 5 minutos cada lavado.

Tinción con Phalloidina y nuclear mask 1:1000 (1ul de phalloidina en 1ml de nuclear mask). 45 minutos en oscuridad.

Se lavó 2 veces con PBS.

### **Protocolo modificado para Hand-GFP**

Los dos primeros lavados (PFA y Tritón) se redujeron a la mitad de tiempo para evitar la pérdida de la señal de GFP.

En el paso de tinción se agregó nuclear mask 10 minutos antes y luego se agregó la dilución de phalloidina (1:100), se dejó actuar en oscuridad por 45 minutos más.

Finalmente se hicieron 3 lavados de PBS para eliminar más el ruido de fondo.

### **Aislamiento de cardiomiocitos**

-50 mg de Albúmina

-20 mg de colagenasa

-1 mg de proteasa

-30 ml de solución HL3

### **Tabla de cruzamientos**

$$\text{♀ } \frac{\text{TinC} - \text{Gal4}}{\text{UAS} - \text{GCaMP3}} \times \text{♂ } \text{Cs}$$

$$\text{♀ } \frac{\text{TinC} - \text{Gal4}}{\text{UAS} - \text{GCaMP3}} \times \text{♂ } \text{Hand} - \text{GFP 2.2}$$

$$\text{♀ } \text{Hand} - \text{GFP 2.2} \times \text{♂ } \text{Cs}$$

$$\text{♀ } \frac{\text{TinC} - \text{Gal4}}{\text{UAS} - \text{GCaMP3}} \times \text{♂ } \text{iSERCA}$$