

# *Drosophila melanogaster*, un modelo animal emergente en el estudio de enfermedades cardíacas humanas

## *Drosophila melanogaster*, an Emerging Animal Model for the Study of Human Cardiac Diseases

MANUELA SANTALLA<sup>1,2</sup>, ENRIQUE L. PORTIANSKY<sup>3</sup>, PAOLA V. FERRERO<sup>1,2</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** La necesidad de trabajar con modelos de organismos en la investigación sobre salud ha revelado las utilidades de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* considerando sus ventajas para realizar genética clásica y modernas técnicas de edición del genoma. Muchos genes humanos son homólogos a los genes de la mosca. Hemos desarrollado por primera vez en el país una línea de investigación cardiovascular para estudiar la genética del envejecimiento, las adicciones y sustancias de consumo crónico en el humano como la cafeína.

**Objetivo:** Aportar evidencia experimental que valida el modelo de *Drosophila melanogaster* para el estudio de miocardiopatías humanas en relación con la acción farmacológica de la cafeína sobre el corazón.

**Material y métodos:** Se analizaron la función cardíaca y el efecto de la cafeína en preparados semiintactos de *Drosophila melanogaster*. Se registró la frecuencia cardíaca y se analizó el transitorio de calcio intracelular en moscas adultas de 3, 7 y 40 días mediante un reportero codificado genéticamente. Corazones de moscas adultas se disecaron para mostrar la organización estructural de las miofibrillas y proteínas específicas como la SERCA.

**Resultados:** La cafeína y el envejecimiento afectan la frecuencia de contracción y el manejo de calcio intracelular en el corazón adulto de *Drosophila melanogaster* en forma similar a lo que ocurre en mamíferos.

**Conclusión:** El estudio abre la posibilidad de usar este modelo de fácil y rápida reproducción en busca de genes que permitan conocer los mecanismos por los cuales el envejecimiento, la cafeína (u otros compuestos) y factores ambientales actúan sobre el corazón.

**Palabras clave:** *Drosophila melanogaster* - Transgénesis - Calcio - Cafeína

### ABSTRACT

**Background:** The need to work with model organisms in medical research has revealed the usefulness of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, considering its advantages to perform classic genetic studies and modern techniques of genome edition. Several human genes are similar to those of the fruit fly. We have developed for the first time in the country a cardiovascular line of research to study the genetics of aging, addictions and chronic consumption of substances in humans like caffeine.

**Objective:** The aim of this study was to provide experimental evidence that validates *Drosophila melanogaster* as a model to study human cardiomyopathies related to the pharmacological action of caffeine on the heart.

**Methods:** Cardiac function and the effect of caffeine were studied in semi-intact preparations of *Drosophila melanogaster*. Heart rate and the intracellular calcium transient were recorded and analyzed in 3, 7 and 40-day-old adult flies harboring one genetically encoded reporter system. Hearts of adult flies were dissected to show the myofibrillar structural organization and specific proteins such as SERCA.

**Results:** Aging and caffeine alter contraction rate and intracellular calcium handling in the adult heart of *Drosophila melanogaster* in a similar way as mammals

**Conclusion:** The study supports the use of this model of fast and easy reproductive cycle to identify the genes involved in the mechanisms through which aging, caffeine (and other substances) and environmental factors affect the heart.

**Key words:** *Drosophila melanogaster* - Transgenesis - Calcium - Caffeine

### Abreviaturas

<b>AEC</b>	Acoplamiento excitocontráctil	<b>RS</b>	Reticulo sarcoplasmático
<b>Ca<sup>2+</sup>i</b>	Calcio citosólico intracelular	<b>SERCA</b>	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase (bomba de Ca <sup>2+</sup> ATPasa)

REV ARGENT CARDIOL 2016;84:424-430. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v84.i5.8711>

VÉASE CONTENIDO RELACIONADO: Rev Argent Cardiol 2016;84:419-421. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v84.i5.9555>

Recibido: 18/05/2016 - Aceptado: 23/07/2016

**Dirección para separatas:** Paola Ferrero - Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP - Av. 60 y 120 - (1900) La Plata, Argentina. E mail: [paolaferrero@conicet.gov.ar](mailto:paolaferrero@conicet.gov.ar)

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA)

<sup>3</sup> Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

FINANCIAMIENTO: PIP 318-CONICET y PICT 214-2549 ANPCyT a Paola V. Ferrero.

## INTRODUCCIÓN

### **Drosophila melanogaster como modelo para el estudio de enfermedades humanas**

Los modelos animales para estudios de investigación básica en el área de salud han incluido tradicionalmente ratones, ratas, gatos, perros y mamíferos de mayor porte como ovejas, cerdos y primates. Algunos se han desestimado debido a aspectos éticos y legislaciones en torno al mantenimiento y uso de animales de laboratorio. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un organismo que se convirtió en ícono de estudios genéticos a través de los trabajos de Thomas Morgan, quien proveyó evidencias para la teoría cromosómica de la herencia, el ligamiento de genes y el entrecruzamiento cromosómico. (1)

*Drosophila melanogaster* es un insecto cosmopolita, con un ciclo de vida de alrededor de 10 días a 25 °C que incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. El promedio de supervivencia de una mosca adulta es de 70 días a 25 °C. Presenta ventajas sobre otros animales de laboratorio, como su corto ciclo de vida, la facilidad para criarla y manipularla en el laboratorio y el conocimiento de su genoma. Las técnicas de transgénesis han permitido el desarrollo de innumerables líneas con genes sobreexpresados, modificados, silenciados o anulados. La disponibilidad de moscas transgénicas en reservorios públicos de Austria, Japón y Estados Unidos permite que investigadores de todo el mundo puedan trabajar con estos organismos modificados genéticamente a un costo mucho menor que el de los ratones transgénicos.

El genoma, el transcriptoma y el proteoma de *Drosophila melanogaster* en diferentes etapas de su ciclo de vida han sido estudiados y caracterizados. (2, 3) Dada la gran conservación de genes en relación con el mamífero, se convirtió en modelo para el estudio de enfermedades como diabetes, (4) cáncer, (5) Alzheimer, (6) Parkinson, (7) obesidad, (8) enfermedades cardiovasculares (9) y diferentes tipos de adicciones del humano en la mosca. (10)

### **La anatomía y fisiología cardíacas de Drosophila melanogaster**

El corazón de *Drosophila melanogaster* es un tubo que se extiende dorsalmente y en sentido longitudinal en la zona media entre el primer y el sexto segmento abdominal. Consta de cuatro cámaras cardíacas, dispuestas en serie. En la cámara cónica (primera cámara) y en la última cámara se encuentran los centros marcapaso. (11, 12) Las proteínas que intervienen en el acoplamiento excitocontráctil (AEC) cardíaco están codificadas por genes muy similares entre el humano y la mosca de la fruta. (13) El AEC es un proceso que induce un aumento del calcio citosólico intracelular ( $Ca^{2+}_i$ ) necesario para la contracción cardíaca. Luego, una parte de este  $Ca^{2+}_i$  se libera al exterior y otra parte se almacena en el retículo sarcoplasmático (RS) a través de la bomba de  $Ca^{2+}$  ATPasa (SERCA). Al aumento y

disminución del  $Ca^{2+}_i$  se le llama *transitorio* de  $Ca^{2+}$ . (14) Alteraciones del AEC en el mamífero pueden conducir, por ejemplo, a sobrecarga de  $Ca^{2+}_i$ . Este fenómeno es uno de los mayores contribuyentes de daño asociado a procesos de isquemia/reperfusión (15) y a la producción de arritmias. (16)

En la Argentina, nuestro grupo de investigación ha sido el primero en utilizar a *Drosophila melanogaster* para analizar los mecanismos moleculares y genéticos que regulan la función cardíaca del corazón de la mosca adulta. Trabajos de nuestro laboratorio han mostrado que el envejecimiento modifica el *transitorio* de  $Ca^{2+}$  en la mosca de manera análoga a lo que ocurre en el mamífero y particularmente en el humano. (17) Además, el laboratorio ha desarrollado un modelo de moscas adictas al tabaco con el fin de estudiar mecanismos genéticos responsables de la fisiopatología cardíaca producto del tabaquismo.

El objetivo de este trabajo es presentar resultados experimentales que demuestren que el corazón de *Drosophila melanogaster* reproduce resultados obtenidos en otras especies de uso más común en el laboratorio e incluso la humana. Esta demostración representa solo un ejemplo que permite validar el uso y la importancia de *Drosophila melanogaster* como modelo versátil de manipulación genética y edición del genoma, lo que en el futuro nos permitirá: 1) analizar el efecto de la desregulación de genes cardíacos y no cardíacos sobre la función del corazón, 2) aplicar estrategias farmacológicas como en el mamífero, para bloquear o exacerbar funciones de proteínas que manejan el  $Ca^{2+}_i$  en el tejido cardíaco y 3) estudiar los mecanismos moleculares y genéticos de los efectos dañinos de las adicciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Mantenimiento de stocks y cruza genéticas**

Los grupos 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.

Moscas salvajes de la línea Canton-S se cruzaron con una línea homocigota de moscas transgénicas que expresan un sistema reportero genéticamente modificado, llamado GCaMP3, capaz de sensar aumentos de  $Ca^{2+}_i$ . (13) Los descendientes (F1) portan una copia del sistema reportero, que codifica una proteína fluorescente verde, expresada únicamente en el corazón, ya que está dirigida por un promotor específico cardíaco.

### **Obtención del preparado semiintacto y análisis de la función cardíaca**

Los experimentos con corazones de adultos de 3, 7 y 40 días de edad se llevaron a cabo según lo descripto. (17) Las disecciones se realizaron en un microscopio estereoscópico Schonfeld Optik modelo XTD 217. Los individuos fueron brevemente anestesiados con dióxido de carbono ( $CO_2$ ), colocados en una caja de Petri y fijados por la región dorsal. El preparado se mantuvo sumergido en solución de hemolinfa artificial oxigenada compuesta por 108 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $CaCl_2$ , 8 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $NaH_2PO_4$ , 4 mM  $NaHCO_3$ , 10 mM sacarosa, 5 mM trehalosa, 5 mM HEPES (pH 7,4). Se eliminaron la cabeza, el tórax y los órganos abdominales. El

corazón quedó expuesto, adherido a la pared dorsal mediante músculos alares.

Se registró la señal fluorescente de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en la cámara cónica, utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss 410. Se midió la amplitud de los transitorios, expresada en unidades arbitrarias según la fórmula  $(F-F_0)/F_0$ , siendo F la fluorescencia máxima del transitorio y  $F_0$  la fluorescencia mínima, la frecuencia cardíaca, expresada en latidos por minuto (lpm) y la constante de relajación ( $\tau$ ), expresada en segundos. Se calculó el índice de arritmias como el cociente entre la desviación estándar y el promedio del período cardíaco, siendo este último el intervalo entre los picos máximos de dos transitorios consecutivos.

Durante el tiempo de adquisición de la señal fluorescente en el microscopio confocal se aplicó una dosis de cafeína de 10 mM, equivalente a 2 mg/ml (concentración final) a los 20 segundos de iniciado el registro. El preparado permaneció incubado durante 40 segundos hasta finalizar la adquisición de cada imagen. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa LabChart (AD Instruments, CO, USA).

### Inmunohistoquímica

Se obtuvieron preparados semiintactos de moscas adultas. Progresivamente se reemplazó la hemolinfa por solución tamponada relajante (10 mM de EGTA en hemolinfa) para detener los corazones. (18) Estos fueron fijados con PFA 4% durante 15 minutos. Se lavaron tres veces con 3% de seroalbúmina bovina (SAB) disuelta en solución fosfato salina (PBS). Luego se permeabilizaron con tritón 0,5% en PBS durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente e incubaron con anticuerpo primario anti-SERCA 1:1000 (provisto por el Dr. Sanyal, USA). Luego de tres lavados, los corazones se incubaron con anticuerpo secundario *antimouse* acoplado a Cy2 (Abcam Inc). Se agregó Phalloidina 1:1000 (un intercalante de los polímeros de actina) acoplado a Alexa Fluo 594 (Life Tech.) durante 90 minutos y un intercalante del ADN, Nuclear Mask *stain*, durante 15 minutos, en oscuridad. Tras un nuevo ciclo de lavados se procedió al montaje para su posterior visualización en microscopio Confocal Olympus FV1000.

### Análisis estadístico

Las comparaciones entre moscas de 3, 7 y 40 días se realizaron mediante ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni. Las comparaciones entre la condición sin cafeína y con cafeína se realizaron con la prueba de Student considerando diferencias significativas según  $p \leq 0,05$ .

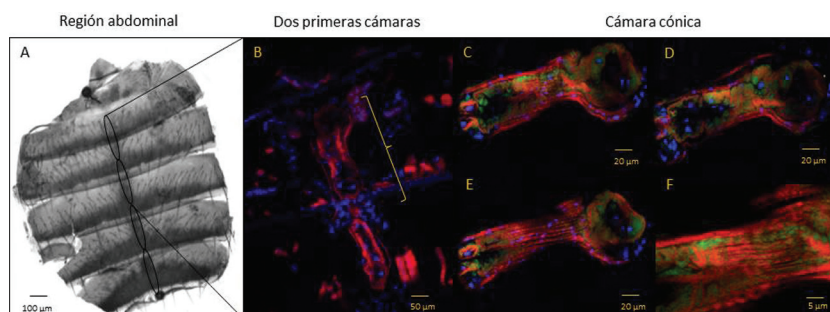
## RESULTADOS

### El músculo cardíaco de *Drosophila melanogaster* es semejante al tejido cardíaco del mamífero

En la Figura 1 se muestra la obtención del preparado semiintacto y las características del tejido cardíaco de la mosca adulta. Las estriaciones, propias del ordenamiento de las fibras contráctiles, son similares a lo observado en el músculo cardíaco del mamífero. Se pueden visualizar distintas cámaras conectadas por válvulas. Al costado del tubo cardíaco existen células pericárdicas y extensiones de los músculos alares que sostienen al corazón (no mostrados aquí). Se detecta la SERCA en la zona correspondiente a los discos intercalares del tejido adulto. Esta proteína es importante en los estudios funcionales, ya que es responsable del secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el RS.

### El envejecimiento afecta la función cardíaca y el transitorio de $\text{Ca}^{2+}$

En este trabajo se midió la frecuencia cardíaca espontánea y el manejo del  $\text{Ca}^{2+}_i$  en moscas adultas a diferentes edades. Los métodos utilizados son análogos a los empleados en modelos de mamíferos, pero en lugar de usar indicadores fluorescentes para medir  $\text{Ca}^{2+}_i$  se utilizó un sistema reportero genéticamente codificado. (13) En la Figura 2 A se muestran registros típicos del transitorio



**Fig. 1.** El tejido cardíaco del corazón de la mosca tiene un patrón miofibrilar semejante al del mamífero y proteínas que manejan  $\text{Ca}^{2+}$ , conservadas. **A.** Se observa con luz transmitida la región abdominal de *Drosophila melanogaster* obtenida con un aumento 10x y la imagen del corazón resaltada en el centro del abdomen en la región media dorsal. **B.** Imagen fluorescente de la cámara cónica y la segunda cámara que muestra la organización fibrilar en rojo y los núcleos celulares en azul. **C-E.** Corte óptico de la primera cámara en tres profundidades diferentes que muestra la disposición de las fibras. **F.** Amplificación de **C-E** en la región basal de la cámara cónica, para observar la proteína SERCA, en color verde, ubicada en zonas intercalares entre las miofibrillas. Véase imagen color en la web.

de  $\text{Ca}^{2+}$  correspondientes a individuos de 3, 7 y 40 días de edad. Se observó una reducción de la frecuencia cardíaca y prolongación de la relajación (medida por la constante tau) durante el envejecimiento. En la Figura 2 B se grafican los promedios de los datos.

### La cafeína modifica la dinámica del $\text{Ca}^{2+}$ en *Drosophila melanogaster*

Aplicamos un pulso de cafeína en el preparado semiintacto de corazón de mosca adulta con el objetivo de obtener una estimación del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, reproduciendo la técnica que se utiliza clásicamente en mamíferos. Además, aquí presentamos resultados que describen el comportamiento del músculo cardíaco ante la incubación sostenida con cafeína, algo que en el mamífero no se ha estudiado profundamente.

En la Figura 3 A se muestra un registro típico de una mosca adulta de 3 días. Se observan los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , el pulso de cafeína y los transitorios siguientes en presencia de esta sustancia. La administración sostenida de cafeína en moscas adultas durante 40 segundos incrementó el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en todas las edades analizadas (Figura 3 B). La relajación del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , medida por la constante tau, se prolongó en presencia de cafeína; esto es menos evidente en edades avanzadas debido a que el envejecimiento prolonga el tiempo de relajación en moscas adultas de mayor edad (Figura 3 C).

### La cafeína reduce la frecuencia cardíaca en *Drosophila melanogaster*

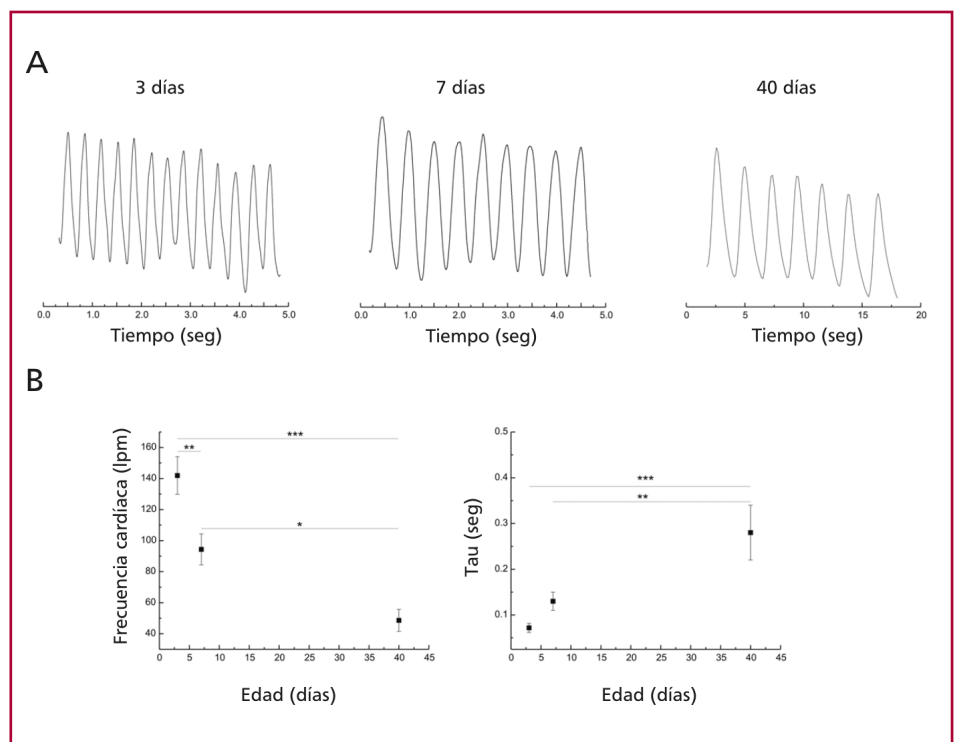
En nuestro modelo, la dosis de 2 mg/ml de cafeína produjo una reducción de la frecuencia cardíaca en

todas las edades estudiadas (Figura 4 A). Por otro lado, medimos la variabilidad de la frecuencia cardíaca, llamada índice de arritmias, entendida como la desviación estándar de los períodos cardíacos respecto de su valor promedio. La cafeína incrementó el índice de arritmias solo en moscas adultas de 3 días de edad, en tanto que no indujo variabilidad de la frecuencia a edades más avanzadas (Figura 4 B). También se contaron las asistolias, es decir, períodos en los que se registró ausencia de latido. El porcentaje de moscas jóvenes de 3 y 7 días que presentaron eventos de asistolias en presencia de cafeína fue menor en relación con edades avanzadas (Figura 4 C). Esto indica que la edad tiene influencia sobre el efecto de la cafeína en la regulación de la frecuencia cardíaca.

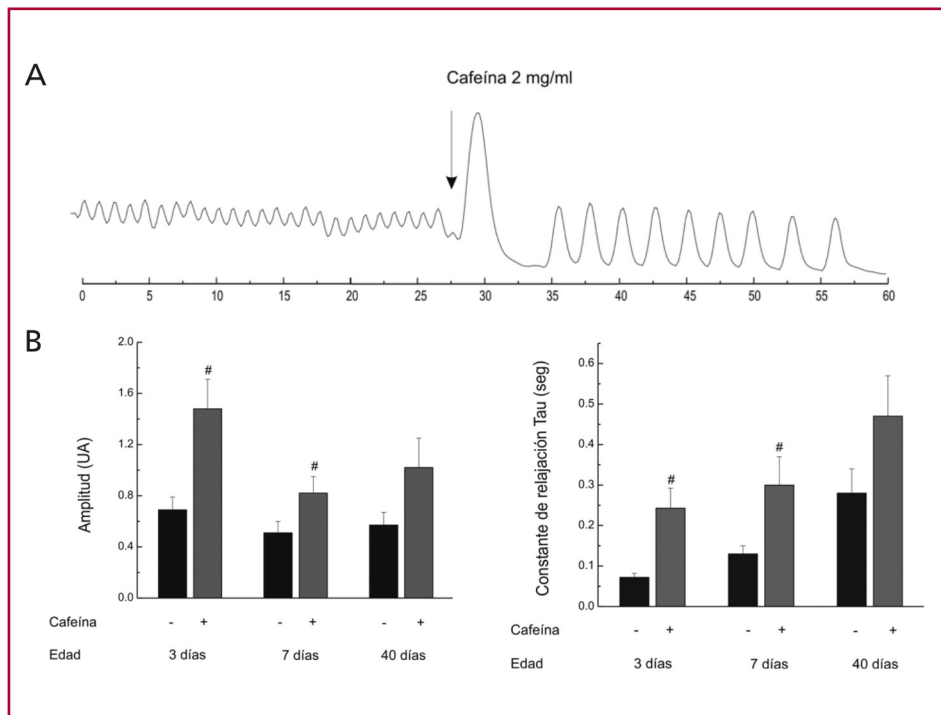
### DISCUSIÓN

El desarrollo de una investigación integral mediante estudios moleculares, genéticos y fisiológicos en organismos modelo, con el fin de entender condiciones fisiopatológicas del humano, es requisito para cualquier abordaje clínico posterior. *Drosophila melanogaster* ofrece claras ventajas sobre cualquier otro modelo animal en términos de manejo de laboratorio y generación de organismos transgénicos. Aun considerando la distancia evolutiva con el humano, el estudio de genes conservados permite entender las bases genéticas de las lesiones cardíacas del hombre, mediante estrategias experimentales que en el mamífero son muy difíciles de realizar con éxito. La independencia del sistema circulatorio de la mosca respecto de su sistema respiratorio es beneficiosa para estudiar genes vinculados

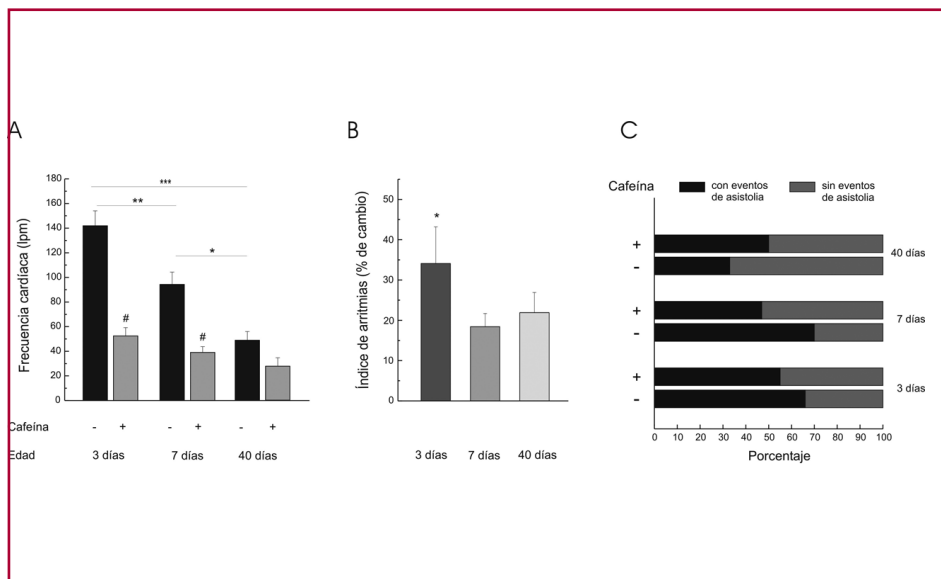
**Fig. 2.** El envejecimiento reduce la frecuencia cardíaca y prolonga el tiempo de relajación en *Drosophila melanogaster*. **A.** Se observan registros típicos de frecuencia cardíaca espontánea en moscas de 3, 7 y 40 días de edad. La frecuencia cardíaca es más elevada en moscas de 3 y 7 días que en moscas de 40 días. La escala de tiempo para representar los transitorios en moscas de 40 días es mayor debido a la significativa reducción del número de latidos. Se observa prolongación de la relajación (medida por la constante tau) con la edad. **B.** Promedios de los datos para ambos parámetros en cada una de las edades estudiadas. Para la frecuencia cardíaca: 3 días vs. 7 días \*\*  $p < 0,01$ ; 3 días vs. 40 días \*\*\*  $p < 0,001$ ; 7 días vs. 40 días \*  $p < 0,05$ . Para la constante de relajación tau: 3 días vs. 40 días \*\*\*  $p < 0,001$ ; 7 días vs. 40 días \*\*  $p < 0,01$ .







**Fig. 3.** La cafeína incrementa la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  y prolonga el tiempo de relajación. **A.** Registro que muestra la sucesión de latidos espontáneos. El agregado de 2 mg/ml de cafeína incrementa la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$ . La incubación sostenida con la sustancia modifica la frecuencia cardíaca y la relajación. **B.** Datos promedio en donde se observa que la incubación de corazones de moscas adultas de 3 y 7 días con 2 mg/ml de cafeína (10 mM) incrementó significativamente la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  y este efecto fue menor en moscas de 40 días; #  $p < 0,05$  para moscas de 3 y 7 días sin cafeína y con cafeína. Los efectos de la cafeína sobre la constante de relajación mostraron un aumento del tau a todas las edades, con diferencias significativas a los 3 y 7 días de edad.



**Fig. 4.** La cafeína reduce la frecuencia cardíaca e incrementa el índice de arritmias. **A.** La cafeína redujo la frecuencia cardíaca espontánea de corazones de moscas adultas a todas las edades estudiadas con diferencias significativas a 3 y 7 días; #  $p < 0,05$ . **B.** En presencia de cafeína, la variabilidad de la frecuencia, expresada como índice de arritmias, se incrementó significativamente a los 3 días de edad; \*  $p < 0,05$ . **C.** El porcentaje de moscas que mostraron algún evento de asistolia (ausencia de latido) se redujo en presencia de cafeína, excepto a edades avanzadas (40 días), en donde un porcentaje mayor de moscas mostraron uno o más eventos de asistolia.

a la organogénesis cardíaca y a las vías de señalización propias de este sistema, sin comprometer la vida del individuo. (11)

Trabajos previos de otros grupos de investigación en *Drosophila melanogaster* han revelado su ultraestructura cardíaca en larvas y adultos. Este músculo consiste en una capa de cardiomiocitos que contienen proteínas estructurales como sarcoglicanos, distrofinas, miosinas y troponinas. (18-20) Aquí mostramos detalles histológicos del corazón adulto de *Drosophila melanogaster* con particular énfasis en la SERCA, una proteína conservada que se había observado en

larvas, (21) esencial para el manejo del  $Ca^{2+}_i$  en el AEC. Además, en este trabajo demostramos que el corazón de *Drosophila melanogaster* recapitula la dinámica del  $Ca^{2+}_i$  observada en mamíferos frente a situaciones experimentales variadas, lo que valida el uso del modelo para futuras investigaciones en las que se podrán estudiar, mediante la genómica, la transcriptómica y la proteómica, las variaciones de genes y productos génicos frente a diferentes noxas.

En el humano, el envejecimiento transcurre con alteraciones de la función cardíaca como insuficiencia, arritmias e hipertrofia, entre otras. (22) Es un proceso

programado genéticamente y afectado por el ambiente. Los genes de la mosca involucrados en la senescencia cardíaca son homólogos a los del humano. (23, 24) Entre los mecanismos subcelulares responsables del daño de la función cardíaca se destacan el deterioro del manejo del  $Ca^{2+}$ , la prolongación de la relajación y la generación de arritmias. (25, 26) Estos efectos se han reproducido en *Drosophila melanogaster* (17) y se han señalado algunas características genéticas de la respuesta al envejecimiento, que en la mosca también transcurre con un porcentaje mayor de fibrilación y arritmias. (27, 28)

Por otro lado, la cafeína es una sustancia cuyo impacto en el corazón se ha estudiado en el mamífero, dada su importancia como sustancia de consumo masivo en la población humana. La ingesta de cafeína a una concentración de 100 mg (una taza de café) en el humano permite alcanzar una concentración de 0,5 a 3  $\mu\text{g/ml}$  en sangre sin movilización de  $Ca^{2+}$  desde los reservorios intracelulares cardíacos. (29)

La acción de la cafeína sobre la frecuencia cardíaca depende de la dosis utilizada en modelos animales y en estudios sobre el consumo de café en pacientes. (30) Ensayos en agudo realizados en embriones murinos muestran que la cafeína en concentraciones bajas (0,04 mg/ml, alrededor de 200  $\mu\text{M}$ ) induce el aumento de la frecuencia cardíaca, mientras que dosis mayores la reducen. (31) En este trabajo, la dosis de 2 mg/ml correspondiente a 10 mM redujo la frecuencia cardíaca en concordancia con ensayos realizados en otros modelos experimentales con dosis elevadas. (32, 33)

Por otro lado, se describió que la cafeína induce arritmogénesis. (30) En este trabajo observamos que la cafeína induce una mayor variabilidad de la frecuencia, pero reduce los eventos de asistolia, ya que una proporción menor de moscas manifiestan alguna asistolia en presencia de cafeína.

A nivel subcelular, la aplicación de un pulso de cafeína en cardiomiocitos de mamífero permite obtener una estimación del contenido de  $Ca^{2+}$  del RS, ya que induce la apertura de los canales de rianodina del ( $RyR_2$ ) y bloquea la retoma de  $Ca^{2+}$  hacia este reservorio. (34) Esta técnica se ha reproducido en moscas, pero sin ser analizada en profundidad. (13) Datos aportados por el presente trabajo muestran que de manera consistente con estudios previos en mamíferos (35) la incubación de moscas adultas con cafeína prolongó el tiempo de relajación, probablemente debido a su efecto inhibitorio sobre el secuestro de  $Ca^{2+}$  hacia el RS mediada por la SERCA. Además, aumentó la amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$ . En el modelo de mamífero, la cafeína modifica la sensibilidad al  $Ca^{2+}$  citosólico y luminal del  $RyR_2$  del RS (36) y esto promueve la liberación de  $Ca^{2+}$  que dispara arritmias. En nuestro modelo no estudiamos sensibilidad al  $Ca^{2+}$  de los miofilamentos, pero observamos que la cafeína vacía los reservorios de  $Ca^{2+}$  por apertura de los canales de  $RyR$ , de modo similar a lo que ocurre en el mamífero. Existen líneas transgénicas –mutantes condicionales de la SERCA y del  $RyR$ , ambos genes conservados con los del humano– que se podrían

estudiar para caracterizar otros eventos subcelulares en presencia de cafeína.

En términos generales, la homología de determinados genes como los mencionados en este trabajo, las respuestas a estímulos farmacológicos y la manipulación genética en *Drosophila melanogaster* la jerarquiza como herramienta para el estudio de las bases epigenéticas de la fisiopatología cardíaca del hombre.

## CONCLUSIÓN

El estudio abre la posibilidad de usar este modelo de fácil y rápida reproducción en busca de genes que permitan conocer los mecanismos por los cuales el envejecimiento, la cafeína (u otros compuestos) y factores ambientales actúan sobre el corazón.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Alicia Mattiazzi por la revisión crítica del manuscrito.

## Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la web/ Material suplementario).

## BIBLIOGRAFÍA

- Morgan T. The Physical Basis of Heredity. Philadelphia, PA: JB Lippincott CO. 1919. The Journal of Philosophy, Psychology and Scientific Methods 1920;17:386-8.
- Zeitouni B, Sénatore S, Séverac D, Akinin C, Sémériva M, Perrin L. Signalling pathways involved in adult heart formation revealed by gene expression profiling in *Drosophila*. PLoS Genet 2007;3:1907-21. <http://doi.org/ft5bdb>
- Cammarato A, Ahrens CH, Alayari NN, Qeli E, Rucker J, Reedy MC, et al. A mighty small heart: the cardiac proteome of adult *Drosophila melanogaster*. PLoS One 2011;6:e18497. <http://doi.org/fcb8gf>
- Rulifson EJ, Kim SK, Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. Science 2002;296:1118-20. <http://doi.org/btf66f>
- Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. Nat Rev Genet 2005;6:9-23. <http://doi.org/cqhrhp>
- Fernandez-Funez P, de Mena L, Rincon-Limas DE. Modeling the complex pathology of Alzheimer's disease in *Drosophila*. Exp Neurol 2015;274:58-71. <http://doi.org/bqp3>
- Ambegaokar SS, Roy B, Jackson GR. Neurodegenerative models in *Drosophila*: polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Dis 2010;40:29-39. <http://doi.org/dq2977>
- Diop SB, Bodmer R. *Drosophila* as a model to study the genetic mechanisms of obesity-associated heart dysfunction. J Cell Mol Med 2012;16:966-71. <http://doi.org/bqp4>
- Wolf MJ, Amrein H, Izatt JA, Choma MA, Reedy MC, Rockman HA. *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:1394-9. <http://doi.org/dspd8t>
- McClung C, Hirsh J. Stereotypic behavioral responses to free-base cocaine and the development of behavioral sensitization in *Drosophila*. Curr Biol 1998;8:109-12. <http://doi.org/b8fz3g>
- Medioni C, Sénatore S, Salmand PA, Lalevée N, Perrin L, Sémériva M. The fabulous destiny of the *Drosophila* heart. Curr Opin Genet Dev 2009;19:518-25. <http://doi.org/dhwvmb>
- Dulcis D, Levine RB. Glutamatergic innervation of the heart

initiates retrograde contractions in adult *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 2005;25:271-80. <http://doi.org/fn4gbf>

13. Lin N, Badie N, Yu L, Abraham D, Cheng H, Bursac N, et al. A method to measure myocardial calcium handling in adult *Drosophila*. *Circ Res* 2011;108:1306-15. <http://doi.org/bspvzh>

14. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 2008;70:23-49. <http://doi.org/bm5fn8>

15. Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, Mazzocchi G, Escobar AL. Ca<sup>2+</sup> Sparks and Ca<sup>2+</sup> waves are the subcellular events underlying Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2015;79:69-78. <http://doi.org/bqp5>

16. Said M, Becerra R, Palomeque J, Rinaldi G, Kaetzel MA, Diaz-Sylvester PL, et al. Increased intracellular Ca<sup>2+</sup> and SR Ca<sup>2+</sup> load contribute to arrhythmias after acidosis in rat heart. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1669-83. <http://doi.org/b9w9s6>

17. Santalla M, Valverde CA, Harnichar E, Lacunza E, Aguilar-Fuentes J, Mattiazzi A, et al. Aging and CaMKII alter intracellular Ca<sup>2+</sup> transients and heart rhythm in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 2014;9:e101871. <http://doi.org/bqp6>

18. Alayari NN, Vogler G, Taghli-Lamalle O, Ocorr K, Bodmer R, Cammarato A. Fluorescent labeling of *Drosophila* heart structures. *J Vis Exp* 2009;(32). pii: 1423. <http://doi.org/cw22mt>

19. Curtis NJ, Ringo JM, Dowse HB. Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J Morphol* 1999;240:225-35. <http://doi.org/d98gtd>

20. Lehmacher C, Abeln B, Paululat A. The ultrastructure of *Drosophila* heart cells. *Arthropod Struct Dev* 2012;41:459-74. <http://doi.org/bqp7>

21. Sanyal S, Jennings T, Dowse H, Ramaswami M. Conditional mutations in SERCA, the Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J Comp Physiol B* 2006;176:253-63. <http://doi.org/cmfd28>

22. Nakou ES, Parthenakis FI, Kallergis EM, Marketou ME, Nakos KS, Vardas PE. Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *Int J Cardiol* 2016;209:167-75. <http://doi.org/bqp8>

23. Qian L, Bodmer R. Probing the polygenic basis of cardiomyopathies in *Drosophila*. *J Cell Mol Med* 2012;16:972-7. <http://doi.org/fz3vgs>

24. Piazza N, Wessells RJ. *Drosophila* models of cardiac disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011;100:155-210. <http://doi.org/cpgvqc>

25. Lou Q, Janardhan A, Efimov IR. Remodeling of calcium handling in human heart failure. *Adv Exp Med Biol* 2012;740:1145-74. <http://doi.org/bqp9>

26. Hatch F, Lancaster MK, Jones SA. Aging is a primary risk factor for cardiac arrhythmias: disruption of intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation as a key suspect. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011;9:1059-67. <http://doi.org/dv8d7r>

27. Paternostro G, Vignola C, Bartsch DU, Omens JH, McCulloch AD, Reed JC. Age-associated cardiac dysfunction in *Drosophila melanogaster*. *Circ Res* 2001;88:1053-8. <http://doi.org/fvq9bn>

28. Ocorr K, Perrin L, Lim HY, Qian L, Wu X, Bodmer R. Genetic control of heart function and aging in *Drosophila*. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:177-82. <http://doi.org/crm8g6>

29. Fredholm BB. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol* 1995;76:93-101. <http://doi.org/bcbpzc>

30. Pelchovitz DJ, Goldberger JJ. Caffeine and cardiac arrhythmias: a review of the evidence. *Am J Med* 2011;124:284-9. <http://doi.org/bg9zs7>

31. Buscariollo DL, Breuer GA, Wendler CC, Rivkees SA. Caffeine acts via A1 adenosine receptors to disrupt embryonic cardiac function. *PLoS One* 2011;6:e28296. <http://doi.org/cb2jhz>

32. Albert M. The effects of caffeine on the 4 day old chicken embryonic heart rate. *Journal of Chicken Embryology* 2006;27:1-11. <http://doi.org/cjcdqz>

33. Rana N, Moond M, Marthi A, Bapatla S, Sarvepalli T, Chatti T, et al. Caffeine-induced effects on heart rate in zebrafish embryos and possible mechanisms of action: an effective system for experiments in chemical biology. *Zebrafish* 2010;7:69-81. <http://doi.org/bzvfhw>

34. Gonano LA, Sepúlveda M, Rico Y, Kaetzel M, Valverde CA, Dedman J, et al. Calcium-calmodulin kinase II mediates digitalis-induced arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011;4:947-57. <http://doi.org/bzvfhw>

35. Blinks JR, Olson CB, Jewell BR, Bravený P. Influence of caffeine and other methylxanthines on mechanical properties of isolated mammalian heart muscle. Evidence for a dual mechanism of action. *Circ Res* 1972;30:367-92. <http://doi.org/bqqb>

36. Porta M, Zima AV, Nani A, Diaz-Sylvester PL, Copello JA, Ramos-Franco J, Blatter LA, Fill M. Single ryanodine receptor channel basis of caffeine's action on Ca<sup>2+</sup> sparks. *Biophys J* 2011;100:931-8. <http://doi.org/d8rdm2>

#### Material complementario

Puede encontrar el video "Características *Drosophila melanogaster* 2" en:

<https://youtu.be/lKkos7SLmgw>