

ROL DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS StarD7 EN LA MORFOLOGÍA, DINÁMICA Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS DE**

MARÍA LAURA ROJAS

Director de Tesis: Dra. Susana Genti-Raimondi



Departamento de Bioquímica Clínica

CIBICI – CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, 2022

Comisión Asesora de Tesis

Dra. Graciela Borioli

Investigadora Independiente del CIQUIBIC-CONICET. Profesora Adjunta del Departamento de Química Biológica, Facultad de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Claudia Cristina Motrán

Investigadora Principal del CIBICI-CONICET. Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Teresa Scimonelli

Investigadora Independiente del IFEC-CONICET. Profesora Titular del Departamento de Farmacología, Facultad de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Comisión Evaluadora de Tesis

Dra. Graciela Borioli

Investigadora Independiente del CIQUIBIC-CONICET. Profesora Adjunta del Departamento de Química Biológica, Facultad de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Claudia Cristina Motrán

Investigadora Principal del CIBICI-CONICET. Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Teresa Scimonelli

Investigadora Independiente del IFEC-CONICET. Profesora Titular del Departamento de Farmacología, Facultad de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dra. Claudia Banchio

Investigadora Independiente del IBR-CONICET. Profesora en la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

ESTE TRABAJO DE TESIS FUE REALIZADO GRACIAS AL APOYO DE CONICET, FONCYT y

SECYT-UNC

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la contribución de todas aquellas personas que me guiaron y acompañaron durante este trayecto. En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta tesis, Dra. Susana Genti-Raimondi, por la confianza ofrecida desde que llegué a esta facultad y por darme la oportunidad de unirme a su grupo. También por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la constante dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo.

Agradezco a los miembros del laboratorio 119-120 y 116-117 por facilitar la tarea diaria compartiendo material para realizar los experimentos y por sus aportes brindados. A mis compañeros de laboratorio por todos los momentos compartidos durante las jornadas de trabajo, por las charlas y por su apoyo a lo largo de este trayecto, especialmente a Marian, Andre y Lu con por todos los momentos compartidos día a día en la mesada que hicieron de este doctorado una experiencia única.

El trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos conjuntos, en este sentido agradezco a la Dra. Graciela Panzetta y la Dra. Ana Racca por brindarme sus conocimientos y valiosas sugerencias en momentos de duda que permitieron orientar y mejorar esta tesis.

A la Dra. Luciana Reyna y a la Dra. Jéssica Flores por su ayuda y paciencia en mis primeros años en el laboratorio y por brindarme su tiempo para enseñarme nuevas metodologías.

A la Dra. Graciela Borioli, Dra. Cristina Motrán y Dra. Teresa Scimonelli, miembros de mi comisión asesora por sus aportes y esfuerzo puesto en mi tesis a lo largo de estos años, y a la Dra. Claudia Banchio, por su dedicación al corregir mi tesis como evaluadora externa.

A todas las personas del CIBICI que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Al Dr. Antonio Zorzano, del Instituto de Investigación Biomédica (IRB-Barcelona), quien me recibió cálidamente en su laboratorio para realizar una pasantía a partir de la cual surgieron muchos de los resultados de esta tesis. A su grupo de investigación por el apoyo brindado, especialmente al Dr. Juan Pablo Muñoz por su gentileza y predisposición para ayudarme a concretar mis objetivos experimentales y a la Dra. Alba Sabaté por su amabilidad y hospitalidad desde el inicio de mi estancia.

Este trabajo de investigación es también fruto del apoyo de personas que forman parte de mi vida, que me dieron la fuerza y energía para crecer en lo personal y profesional. Gracias a mis padres, hermanos y a mi familia por haberme brindado la oportunidad de estudiar con la tranquilidad de saber que contaba con su respaldo y por brindarme su apoyo siempre que lo he necesitado. Gracias a mis amigas de siempre y de la facultad, por sus palabras de aliento y su compañía en todo momento. Pero, sobre todo, gracias a mi compañero de vida Nacho, por su paciencia, comprensión, consejos y constante apoyo.

Índice

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	5
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
I. LAS MITOCONDRIAS.....	11
1. Estructura mitocondrial	11
2. Dinámica Mitocondrial.....	12
II. LOS LÍPIDOS MITOCONDRIALES	17
1. Funciones de los lípidos en las mitocondrias.....	17
2. Biosíntesis de los fosfolípidos mitocondriales	21
3. Distribución y transporte de los fosfolípidos mitocondriales	25
4. Importancia de los fosfolípidos en el metabolismo celular	28
III. LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS StarD7	30
1. Características estructurales y bioquímicas.....	31
2. Expresión y regulación de StarD7.....	33
3. Efecto de la deficiencia de StarD7 a nivel celular y molecular.....	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	38
RESULTADOS	39
SECCIÓN I.....	40
I. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE StarD7 EN LAS CÉLULAS HTR-8/SVNEO ALTERAN LA MORFOLOGÍA Y DINÁMICA MITOCONDRIAL	40
II. CONTRIBUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE StarD7 EN LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL.....	58
III. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE StarD7 EN OTROS PROCESOS CELULARES MEDIADOS POR LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL	64
SECCIÓN II.....	67
I. PARTICIPACIÓN DE StarD7 EN LA MORFOLOGÍA Y DINÁMICA MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS C2C12	67
II. PARTICIPACIÓN DE StarD7 EN LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL	74
III. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE StarD7 EN OTROS PROCESOS CELULARES MEDIADOS POR LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL	79

DISCUSIÓN.....	83
SECCIÓN I.....	85
SECCIÓN II.....	89
CONCLUSIÓN.....	95
PERSPECTIVAS.....	98
ANEXO.....	100
MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	107
Construcción de plásmidos recombinantes.....	107
Preparación de bacterias competentes KCM.....	108
Transformación de bacterias competentes KCM.....	108
Purificación de plásmidos.....	109
Purificación de ARN total de células eucariotas en cultivo.....	109
Reacción de Transcriptasa Reversa.....	110
Semi-cuantificación del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	110
PCR en tiempo real (qPCR).....	110
MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	112
Cultivo de líneas celulares eucariotas.....	112
Preparación de líneas celulares estables mediante transducción lentiviral.....	113
Transfección transiente con plásmidos de expresión.....	115
Silenciamiento de StarD7.....	115
Análisis de la morfología mitocondrial.....	116
Análisis de la fusión mitocondrial.....	116
Determinación del potencial de membrana mitocondrial.....	117
Detección de las especies reactivas del oxígeno.....	118
Medición de la masa mitocondrial.....	119
Medición de la captación de glucosa.....	119
Cuantificación de producción de ATP.....	120
Medición de lípidos neutros.....	120
Medición de PC utilizando Bodipy-PC.....	121
Medición de la función glicolítica, OCR y del contenido de ATP mitocondrial/ glicolítico ..	123
Microscopía electrónica.....	125
Ensayo de reparación de la herida.....	125
MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS.....	126

Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido: <i>Western blot</i>	126
Inmunofluorescencia.....	127
Análisis de proliferación celular	128
ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	128
ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS	130
Tabla I. Secuencia y concentración de los cebadores empleados en los ensayos de qRT-PCR	130
Tabla II. Características generales de los anticuerpos primarios empleados en los ensayos de <i>Western blot</i> y detalles experimentales.....	130
Tabla III. Características generales de los anticuerpos secundarios empleados en los ensayos de <i>Western blot</i> y detalles experimentales.....	131
Tabla IV. Características generales de los anticuerpos empleados en los ensayos de inmunofluorescencia y detalles experimentales	131
Tabla V. Características generales de los plásmidos empleados	132
BIBLIOGRAFÍA.....	134

ABREVIATURAS

2DG: 2-Desoxi-D glucosa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

BrdU: Bromodeoxiuridina

BSA: Albúmina sérica bovina

CCCP: *carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*

CDP: Citidina difosfato

CK: Colina quinasa

CL: Cardiolipina

CPT: Colinafosfotransferasa

Ct: Control

CT: CTP fosfocolina citidiltransferasa

CTP: Citidina trifosfato

D7.I: StarD7.I

D7.II: StarD7.II

DAG: Diacilglicerol

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

Drp1: *Dynamin related protein 1*

ECAR: Acidificación extracelular del medio (*extracellular acidification rate*)

EIM: Espacio intermembrana

EK1/2: Etanolamina quinasa 1/2

EPT: CDP-etanolamina: 1,2 diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ET: CTP fosfoetanolamina citidiltransferasa

ETC: Cadena transportadora de electrones

GTP: Guanosín trifosfato

GTT1: Tumor trofoblástico gestacional 1 (*Gestational Trophoblastic Tumour 1*)

HBP: Vía biosintética de la hexosamina (*Hexosamine Biosynthetic Pathway*)

JC1: *Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide*

KDa: Kilo Dalton

KO: *Knockout*

LB: Luria Bertani

LDs: Gotas lipídicas (*Lipid droplets*)

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPCATs: LPC aciltransferasa

LTPs: Proteínas transportadoras de lípidos

LTR: Repetición terminal larga

MAMs: *Mitochondrial associated membranes*

MET: Microscopía electrónica de transmisión

MFC: *Mitochondrial Fragmentation Count*

MFN 1/2: Mitofusina 1/2

MICOS: *Mitochondrial contact site and cristae organizing system*

MME: Membrana mitocondrial externa

MMI: Membrana mitocondrial interna

NASH: Esteatohepatitis no alcohólica

OCR: Tasa de consumo de oxígeno

ON: Toda la noche

OPA1: Atrofia óptica tipo 1 (*Optic atrophy type 1*)

OXPPOS: Fosforilación oxidativa

PA: Ácido fosfatídico

PARL: Proteína símil-romboide asociada a presenilinas (*Presenilins-associated rhomboid-like protein*)

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Fosfatidiletanolamina

PEMT: PE metil transferasa

PFA: Paraformaldehído

PG: Fosfatidilglicerol

PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α*

PGP: Fosfatidilglicerolfosfato

PI: Fosfatidilinositol

PLINs: Perilipinas

PS: Fosfatidilserina

PSD: PS decarboxilasa

PSS1/2: PS sintasa-1/2

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RE: Retículo endoplásmico

SFB: suero fetal bovino

shC: shRNA inespecífico (shRNA Scrambled)

shD7: shRNA específico para StarD7

shRNA: ARN de horquilla corta (*Small hairpin RNA*)

siC: siRNA inespecífico (*siRNA Scrambled*)

siD7: siRNA dirigido contra la secuencia del ARN mensajero de StarD7

siRNA: ARN pequeño de interferencia (Small interfering RNA)

StarD7: Proteína StarD7 con dominio START (*StAR-related lipid transfer (START) domain containing 7*)

START: Dominio de transferencia de lípidos relacionado a la proteína esteroideogénica aguda (*StAR-related lipid-transfer*)

TA: Temperatura ambiente

TAG: Triacilglicerol

TIM23: Translocasa de la membrana interna mitocondrial

TMRM: *Tetramethylrhodamine methyl ester*

TOM: Translocasa de la membrana externa mitocondrial

UPR: Respuesta a las proteínas no plegadas (*Unfolded Protein Response*)

URL: Unidades relativas de Luz

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

Las mitocondrias son organelas esenciales para la supervivencia de las células eucariotas, ya que ejercen múltiples funciones bioquímicas, incluida la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), la síntesis de aminoácidos, grupo hemo, lípidos y la biogénesis de los grupos de hierro y azufre. Experimentan cambios dinámicos en tamaño, forma, número y distribución dependiendo de estímulos fisiológicos y patológicos. Estos cambios adaptativos ocurren a través de ciclos coordinados de fisión y fusión de mitocondrias. Las proteínas mitofusina 1 (Mfn1) y 2 (Mfn2) localizadas en la membrana mitocondrial externa (MME) y la proteína *Optic atrophy 1* (OPA1) que se encuentra en la membrana mitocondrial interna (MMI) forman parte de la maquinaria de fusión. Por otro lado, la proteína citosólica *Dynamamin-related 1* (Drp1) media los eventos de fisión mitocondrial.

La composición lipídica de las membranas mitocondriales es fundamental para preservar la actividad y estabilidad de los complejos proteicos implicados en la función, distribución y biogénesis de esta organela. Las mitocondrias sintetizan varios lípidos como fosfatidilglicerol, cardiolipina, fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico; mientras que otros como fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esteroides y esfingolípidos, deben importarse de otras organelas, principalmente desde el retículo endoplásmico (RE).

StarD7, implicada en el transporte de PC a la mitocondria, se sintetiza como una proteína precursora (StarD7.I) que contiene una señal de localización mitocondrial la cual se escinde en la mitocondria originando la isoforma madura StarD7.II, que se libera al citoplasma o permanece en el espacio intermembrana mitocondrial (EIM). En estudios previos se demostró que el *knockdown* de StarD7 induce alteraciones en las mitocondrias y el RE con una reducción en el contenido de PC; sin embargo, se desconoce si StarD7 modula la dinámica y función mitocondrial.

En este trabajo de tesis se analizó la participación de StarD7 en la morfología, dinámica y función mitocondrial utilizando dos modelos celulares: la línea HTR-8/SVneo derivada de trofoblasto humano de primer trimestre y la línea de mioblastos C2C12 derivada de tejido muscular de ratón. Se generaron células HTR-8/SVneo y C2C12 que

sobre-expresan establemente las isoformas StarD7.I (D7.I) y StarD7.II (D7.II). Además ambas líneas celulares se silenciaron en forma transiente (siD7) y estable (shD7).

Se demostró en la línea HTR-8/SVneo que la sobre-expresión de D7.I altera la morfología mitocondrial aumentando su fragmentación, mientras que no se observaron cambios en las células que sobre-expresan D7.II en comparación con las células estables control (Ct). Las células D7.I estables transportan mayor cantidad de PC a las mitocondrias que las células Ct, producen fusiones mitocondriales, mantienen el potencial de membrana y generan niveles más bajos de especies reactivas de oxígeno (ERO). Además, expresan mayor nivel de las proteínas Drp1 y Mfn2, con menor cantidad de Mfn1.

Por otro lado, las células D7.I transfectadas con plásmidos que codifican a las mutantes Drp1-K38A, Drp1-S637D o Drp1-S637A indican que el fenotipo mitocondrial observado es dependiente de la actividad GTPasa de Drp1 y del grado de fosforilación de la serina 637. En contraste, el silenciamiento de StarD7 en la línea celular HTR-8/SVneo disminuye la expresión de las proteínas de fusión Mfn1 y Mfn2 sin modificar la cantidad de Drp1. Además, se observó que estas células aumentan los niveles de ERO y presentan mitocondrias fragmentadas en forma de “donut”, indicativas de estrés metabólico (Rojas et al., 2021)

En la línea C2C12, se demostró que cambios en los niveles de StarD7 no modifican la morfología mitocondrial, evidenciada mediante tinción con MitoTracker Deep Red. Tampoco alteran la expresión de las proteínas de fisión/fusión Mfn1, Mfn2, Drp1, ni la expresión de PCG1 α implicada en la biogénesis mitocondrial. Sin embargo, las observaciones realizadas por microscopía electrónica muestran, en las células shD7, una significativa desorganización en sus crestas mitocondriales con menor expresión de L-OPA1, proteína involucrada en su remodelación y mantenimiento.

Finalmente, se demostró que el silenciamiento de StarD7 en las células C2C12, disminuye el potencial de membrana, impide la diferenciación celular a miotubos, mientras que incrementa el ECAR (*extracellular acidification rate*), la captación de glucosa y la acumulación de lípidos neutros.

En conjunto, estos hallazgos proporcionan evidencia novedosa que indica que las alteraciones en la expresión de StarD7 producen cambios significativos en la morfología, dinámica y función mitocondrial dependiente del contexto celular.

ABSTRACT

Mitochondria are essential organelles for the survival of eukaryotic cells, as they exert multiple biochemical functions, including the ATP production through oxidative phosphorylation, the synthesis of amino acids, heme group, lipids, and the biogenesis of iron and sulfur groups. They undergo dynamic changes in size, shape, number and distribution depending on physiological and pathological stimuli. These adaptive changes occur through coordinated cycles of fission and fusion. Mitofusin 1 (Mfn1) and 2 (Mfn2) proteins located in the outer mitochondrial membrane and the Optic atrophy 1 (OPA1) protein found in the inner mitochondrial membrane are part of the fusion machinery. On the other hand, the cytosolic protein Dynamin-related 1 (Drp1) mediates mitochondrial fission events.

The lipid composition of mitochondrial membranes is essential to preserve the activity and stability of the protein complexes involved in the function, distribution and biogenesis of this organelle. Mitochondria synthesize various lipids such as phosphatidylglycerol, cardiolipin, phosphatidylethanolamine and phosphatidic acid; while others such as phosphatidylcholine (PC), phosphatidylserine, phosphatidylinositol, sterols and sphingolipids must be imported from other organelles, mainly from the endoplasmic reticulum (ER).

StarD7 protein, involved in the transport of PC to the mitochondria, is synthesized as a precursor (StarD7.I) that contains a mitochondrial localization signal that is cleaved in mitochondria originating the mature isoform StarD7.II, which is released into the cytoplasm or remains in the mitochondrial intermembrane space. Previous studies have shown that StarD7 knockdown induces alterations in mitochondria and ER with a reduction in PC content; however, it is unknown whether StarD7 modulates mitochondrial dynamics and function.

In this thesis, the participation of StarD7 in mitochondrial morphology, dynamics and function was analyzed using two cell models: the HTR-8/SVneo line derived from first trimester human trophoblast cells and the myoblast cell line C2C12 derived from murine skeletal muscle tissue. HTR-8/SVneo and C2C12 cells that stably overexpress the StarD7.I

(D7.I) and StarD7.II (D7.II) isoforms were generated. In addition, both cellular lines were transiently (siD7) or stably (shD7) silenced against StarD7.

It was demonstrated, in the HTR-8/SVneo cell line, that overexpression of D7.I alters mitochondrial morphology by increasing its fragmentation, while no changes were observed in cells that overexpress D7.II compared to stable control cells (Ct). D7.I stable cells transport higher amounts of PC to the mitochondria than Ct cells, produce mitochondrial fusions, maintain membrane potential, and generate lower levels of reactive oxygen species (ROS). In addition, they express a higher level of the proteins Drp1 and Mfn2, and less Mfn1.

On the other hand, D7.I cells transfected with plasmids encoding the mutants Drp1-K38A, Drp1-S637D or Drp1-S637A indicate that the mitochondrial phenotype detected is dependent on the GTPase activity of Drp1 and the phosphorylation level of serine 637. In contrast, StarD7 silencing in the HTR-8/SVneo cell line decreases the expression of the fusion proteins Mfn1 and Mfn2 without modifying the amount of Drp1. In addition, it was observed that these cells increase the levels of ROS and present fragmented “donut” shaped mitochondria indicative of metabolic stress (Rojas et al., 2021).

Changes in StarD7 levels do not modify mitochondrial morphology in the C2C12 cell line, evidenced by staining with MitoTracker Deep Red. Also, the expression of fission/fusion proteins Mfn1, Mfn2, Drp1, and PCG1 α involved in mitochondrial biogenesis, were not changed. However, the observations made by electron microscopy showed, in shD7 cells, a significant disorganization in their mitochondrial crests with less expression of L-OPA1, a protein involved in their remodeling and maintenance.

Finally, it was shown that the silencing of StarD7 in C2C12 cells decreases membrane potential and prevents cell differentiation to myotubes, while it increases ECAR (extracellular acidification rate), glucose uptake and the accumulation of neutral lipids.

Taken together, these findings provide novel evidence indicating that alterations in StarD7 expression produce significant changes in mitochondrial morphology, dynamics, and function dependent on the cellular context.

INTRODUCCIÓN

I. LAS MITOCONDRIAS

Las mitocondrias son organelas de doble membrana que evolucionaron a partir de ancestros α -proteobacterianos endosimbióticos. Su capacidad para catalizar eficientemente la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) hizo que su presencia sea fundamental durante la evolución de las células eucariotas y le otorgó un rol central en el metabolismo de las mismas (Lane and Martin, 2010; Nunnari and Suomalainen, 2012). El cromosoma mitocondrial humano, de sólo 16 Kb de tamaño, codifica a 2 genes ribosomales y 22 de ARN de transferencia requeridos para la síntesis de proteínas mitocondriales, y 13 genes que codifican a proteínas. La mayor parte del proteoma mitocondrial está codificado en el núcleo por lo que las mitocondrias han adquirido una maquinaria de biogénesis necesaria para importar proteínas y lípidos codificados nuclearmente (Schmidt et al., 2010).

1. Estructura mitocondrial

Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas: la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI). Las dos membranas dan lugar a dos compartimentos: el espacio intermembrana (EIM) y la matriz mitocondrial. Las membranas mitocondriales contienen principalmente fosfolípidos, con sólo trazas de esteroides y esfingolípidos, excepto en las células que sintetizan hormonas esteroideas (Horvath and Daum, 2013), y poseen además un alto contenido de proteínas. La mayoría de estas proteínas son las subunidades de los complejos I-IV de la cadena transportadora de electrones (ETC), la F_1F_0 -ATP sintasa y otras proteínas involucradas en la OXPHOS (Vance, 2015). Las subunidades respiratorias catalizan la transferencia de electrones del NADH generado por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs para crear una fuerza motriz de protones a través de la membrana interna, utilizada para impulsar la producción de ATP a través de la acción del complejo ATP sintasa.

La MMI se divide espacialmente en membrana de las crestas y sus regiones internas. Las crestas son grandes invaginaciones, donde se localizan los complejos de la ETC, las cuales pueden sufrir remodelaciones masivas para permitir la liberación del citocromo C

durante la señalización apoptótica. Otras regiones específicas de la MMI que difieren en la composición de proteínas y lípidos forman sitios de contacto con la MME (Horvath and Daum, 2013; Muñoz-Gómez et al., 2015; van der Laan et al., 2016).

2. Dinámica Mitocondrial

Las mitocondrias son organelas altamente dinámicas sometidas a ciclos coordinados de fisión y fusión, denominados **dinámica mitocondrial**, que les permiten mantener su forma, distribución y tamaño. Estas adaptaciones morfológicas transitorias y rápidas son cruciales para muchos procesos celulares como el ciclo celular, la inmunidad, la apoptosis y el control de calidad mitocondrial. Estas transiciones dinámicas están aseguradas principalmente por grandes GTPasas pertenecientes a la familia Dinamina. El desequilibrio en la fisión y fusión es un mecanismo patogénico común a muchos procesos como apoptosis, autofagia, envejecimiento y neurodegeneración y se correlaciona con miopatías, obesidad, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Itoh et al., 2013; Liesa et al., 2009; Wallace, 2005).

2.1. Fusión mitocondrial

La fusión mitocondrial es esencial para mantener una población de mitocondrias homogénea y asegurar la inter-complementación del ADN mitocondrial. Es un proceso de dos pasos, en el que las membranas externa e interna se fusionan por eventos separados. Requiere la acción de las proteínas de fusión, Mfn1 y Mfn2 en la MME promoviendo la fusión de las membranas de mitocondrias yuxtapuestas y OPA1 en la MMI (Osellame et al., 2012). La proteína OPA1 consta de 8 isoformas y la morfología mitocondrial depende del balance entre las isoformas largas (L-OPA1) y cortas (S-OPA1). OPA1 es escindida por las proteasas AFG3L1/2, paraplegina, OMA1 e YME1L ubicadas en la MMI. La capacidad de OPA1 para auto-interactuar y oligomerizar requiere tanto de las isoformas L-OPA1 como de S-OPA1. La regulación de la escisión de OPA1 por diferentes proteasas depende en gran medida del acceso a los sitios de procesamiento y los estímulos de estrés celular. La pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

o la inducción de la apoptosis ocasionan un incremento en los niveles de S-OPA1 (Anand et al., 2014).

Además de mantener la morfología, la fusión contribuye a aumentar la respiración y el metabolismo mitocondrial al promover una mayor difusión de metabolitos intermedios, como así también de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Fig. 1A).

La fusión mitocondrial es selectiva para las mitocondrias polarizadas y es promovida por fuentes de carbono como la galactosa, que también induce la expresión y la formación de los supercomplejos proteicos de la ETC, el aumento de la densidad de las crestas y de la OXPHOS.

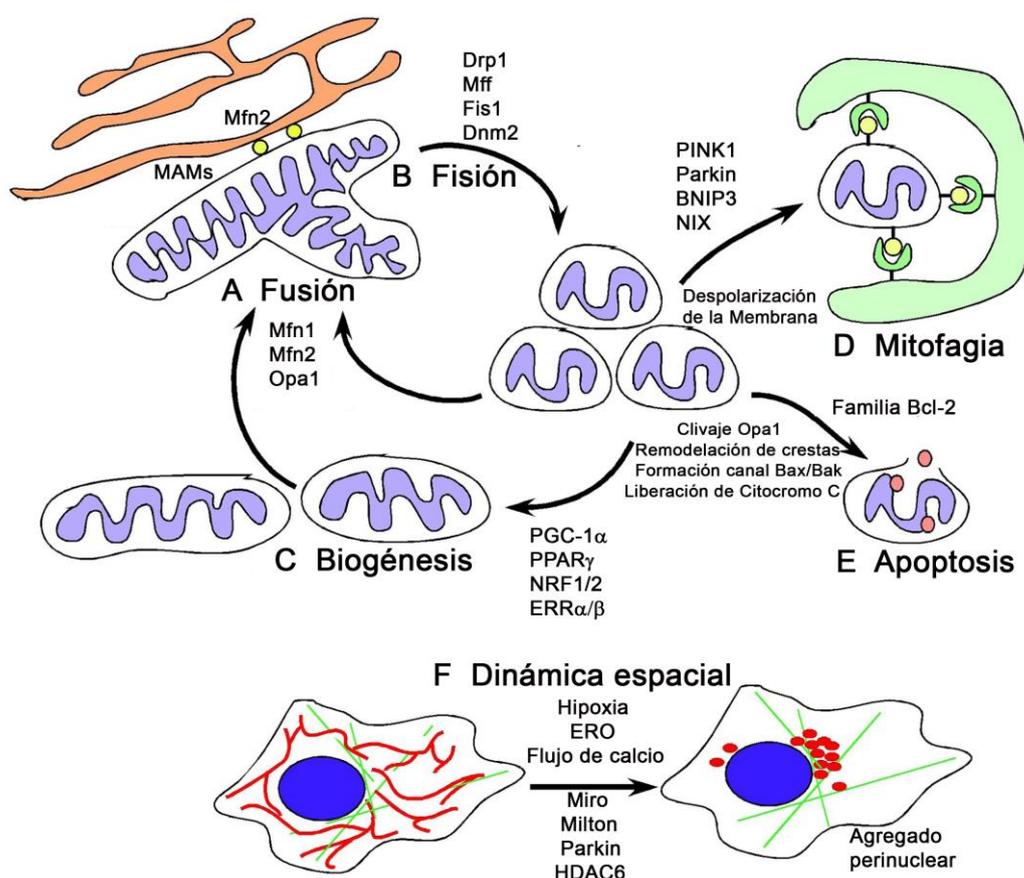


Figura 1. Esquema de las principales vías que controlan la dinámica mitocondrial. (A) La fusión mitocondrial requiere de la acción de OPA1 en la MMI y también de Mfn1 y Mfn2 en la MME que promueven la fusión de las membranas de mitocondrias yuxtapuestas. (B) La fisión mitocondrial es promovida por la actividad GTPasa de Drp1 que se recluta a la MME, donde interactúa con Mff y Fis1. La escisión final de la mitocondria es llevada a cabo por Dnm2. (C) Los factores de transcripción NRF1/2, PPAR, ERR α/β , y PGC-1 α regulan la biogénesis mitocondrial. (D) La mitofagia es promovida por varios mecanismos diferentes, incluidas las vías mediadas por PINK1/Parkin y también por la vía BNIP3/NIX. (E) La apoptosis es un evento terminal controlado por la actividad de los reguladores de muerte celular de la superfamilia Bcl-2. (F) La migración mitocondrial está modulada por Miro y Milton, así como por los efectos poco conocidos de Parkin y HDAC6. Adaptado de (Boland et al., 2013).

2.2. Fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial es un proceso multietapa que permite la división de las mitocondrias. Es promovida por la actividad GTPasa de la proteína citósolica relacionada con la Dinamina (Drp1) y por adaptadores de actina localizados en los sitios de constricción mitocondria-RE. Drp1 es reclutada a las mitocondrias en respuesta a estrés, donde interactúa con sus receptores mitocondriales (Mff, Fis1 y MID 49/51). La oligomerización de Drp1 seguida de la constricción mitocondrial conduce al reclutamiento de Dinamina 2 (Dnm2) que termina la escisión de la membrana (Fig. 1B) (Kamerkar et al., 2018). Las modificaciones postraduccionales de Drp1 que afectan su reclutamiento y función mitocondrial incluyen la fosforilación, ubiquitinación y SUMOilación (Chang and Blackstone, 2010).

La fisión es esencial para la biogénesis mitocondrial y la herencia de esta organela, y si no está regulada puede originar una población heterogénea de mitocondrias con una distribución no uniforme de ADN mitocondrial, alteración en la producción de ATP, mayor capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ERO) y mayor susceptibilidad de las células a la apoptosis (Parone et al., 2008).

La biogénesis mitocondrial es necesaria durante el crecimiento celular ya que genera un aumento de metabolitos y energía, y defectos en este proceso son con frecuencia letales para las células y los organismos. La biogénesis es inducida por la privación de nutrientes y en respuesta al estrés oxidativo y requiere la expresión coordinada de genes que están co-regulados por los factores de transcripción NRF1/2, PPAR, ERR α/β , y el cofactor transcripcional clave, PGC-1 α (Fig. 1C).

La fisión mitocondrial también es necesaria para la eliminación de mitocondrias envejecidas o dañadas mediante una forma especializada de autofagia, denominada mitofagia (Kim et al., 2007).

La disminución del $\Delta\Psi_m$ señala a las mitocondrias a la degradación por mitofagia o dependiendo del estrés, resulta en apoptosis; mientras que la fusión limita la mitofagia y la apoptosis.

En la mitofagia las mitocondrias son dirigidas a fagoforos nacientes y engullidas por autofagosomas que se fusionan con los lisosomas para su degradación. Este proceso es promovido por una serie de mecanismos diferentes incluyendo la vía mediada por PINK1

/Parkin y también por la vía BNIP3/NIX (Fig. 1D). Mutaciones en PINK1 y Parkin están asociadas a defectos en la mitofagia en la enfermedad de Parkinson (Narendra et al., 2008; Valente et al., 2004).

Por otra parte, la apoptosis es un evento terminal promovido por la actividad de los miembros de *BH3-only* y por los reguladores de muerte celular de la superfamilia Bcl-2 (Fig. 1E).

La dinámica espacial mitocondrial está relativamente poco estudiada, pero se sabe que las mitocondrias responden a estrés, como hipoxia y modificaciones en el flujo de calcio, que genera cambios en su localización subcelular, colapsándolas alrededor del núcleo y en proximidad al RE. En muchas células de mamíferos, el transporte mitocondrial se logra a través de la actividad de las proteínas motoras que trabajan a lo largo de la red de los microtúbulos, aunque también puede ocurrir el transporte a lo largo de otros elementos del citoesqueleto. Proteínas motoras de la familia de las quinesinas, en particular quinesina-1, median el transporte en la dirección positiva (o anterógrado), mientras que las dineínas median el transporte en dirección negativa (o retrógrado)(Pilling et al., 2006). En mamíferos, el transporte anterógrado a lo largo de los microtúbulos es mediado por las proteínas Miro1 y 2, GTPasas transmembrana dependientes de Ca²⁺ localizadas en la MME que interactúan con quinesina a través de las proteínas Milton (conocidas también como Trak1 y Trak2), este proceso también es modulado por Parkin y HDAC6 (Fig. 1F).

2.3. Defectos en la dinámica mitocondrial

Las mitocondrias modulan la fusión y la división como parte de los mecanismos fisiológicos y de señalización en respuesta a diferentes estímulos (Shutt and McBride, 2013; Youle and Van Der Bliek, 2012). El aumento de la fisión y la disminución de la fusión fragmentan las mitocondrias durante la apoptosis, lo que facilita la liberación eficiente del factor pro-apoptótico citocromo C. El daño y la disfunción mitocondrial resultan en la hiperdivisión de las mitocondrias en respuesta a estrés, como la pérdida del $\Delta\Psi_m$ a través de la membrana interna, que puede inhibir la fusión mitocondrial, generando daño oxidativo, lo que facilita la degradación de las mitocondrias fragmentadas por mitofagia. Las mitocondrias también hiperfusionan en respuesta a

diferentes tipos de estrés, como el ayuno, que induce la degradación de muchos componentes celulares por autofagia; la elongación de esta organela les permite escapar de su degradación y mantener la producción de energía intracelular (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011). La hiperfusión de las mitocondrias también inhibe la síntesis de proteínas citosólicas, lo que ayuda a mantener la supervivencia celular promoviendo la producción de ATP (Tondera et al., 2009).

Mutaciones en Mfn2, OPA1 y Drp1 pueden causar, en humanos, diferentes trastornos como *Charcot-Marie-Tooth* tipo 2A, atrofia óptica dominante 1 y muerte postneonatal con defectos neuronales, respectivamente (Itoh et al., 2013). Además, anomalías en Drp1 se han asociado con una variedad de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, incluyendo el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington (Itoh et al., 2013; Reddy et al., 2011). Estos defectos se encuentran principalmente en los nervios centrales y periféricos, revelando la necesidad de una dinámica mitocondrial adecuada en las neuronas.

II. LOS LÍPIDOS MITOCONDRIALES

1. Funciones de los lípidos en las mitocondrias

La membrana mitocondrial, al igual que otras membranas celulares, como la membrana plasmática, el RE y el complejo de Golgi contiene fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y ácido fosfático (PA), representando PC y PE un total de 60-80 % de los fosfolípidos mitocondriales (Barth et al., 1983; Claypool et al., 2006; Gu et al., 2004). Además de estos fosfolípidos, las mitocondrias contienen un fosfolípido específico: cardiolipina (CL) (~10%) que se sintetiza en la MMI y permanece principalmente en las mitocondrias (Bione et al., 1996; Gu et al., 2004).

Una composición adecuada de fosfolípidos es necesaria para la biogénesis, el mantenimiento y la actividad de las GTPasas relacionadas con las Dinaminas y las funciones mitocondriales (Fig. 2). Los fosfolípidos también señalan mitofagia (Mårtensson et al., 2017). Además, la composición de fosfolípidos modula las propiedades biofísicas de las membranas mitocondriales afectando la oligomerización y función de proteínas GTPasas que participan en la mezcla eficiente de los lípidos.

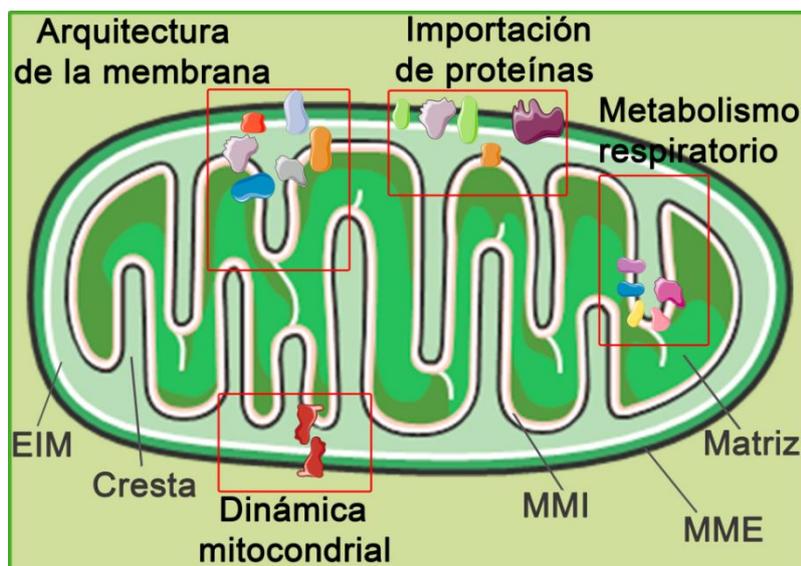


Figura 2. Funciones de los lípidos en las mitocondrias. Los fosfolípidos forman el núcleo hidrofóbico de las dos membranas circundantes de las mitocondrias. Afectan a las funciones de las proteínas implicadas en el metabolismo respiratorio, la importación de proteínas, la arquitectura de las membranas y la dinámica mitocondrial. Además, los fosfolípidos afectan los procesos de mitofagia y apoptosis. Adaptado de (Mårtensson et al., 2017).

1.1. Rol de los lípidos en el metabolismo respiratorio mitocondrial

Las proteínas de la membrana interna catalizan la conversión de la energía a través de la OXPHOS para producir ATP para las funciones celulares. La ETC genera un gradiente de protones a través de la membrana interna, que es utilizado por la F_1F_0 -ATP sintasa para convertir ADP y fosfato en ATP. En los mamíferos la ETC consta de cuatro complejos proteicos, que transfieren electrones de los equivalentes reductores NADH o $FADH_2$ al oxígeno. Los complejos de la ETC utilizan la energía liberada de la transferencia de electrones para bombear protones a través de la membrana interna. La NADH-deshidrogenasa (complejo I), la citocromo c reductasa (complejo III) y la citocromo C oxidasa (complejo IV) forman supercomplejos que facilitan el direccionamiento del sustrato (Mårtensson et al., 2017).

Se reportó que PE se une al complejo III y IV y que su disminución afecta la actividad de los complejos de la ETC. Por otra parte, en levaduras la disminución del PC no afecta la actividad y estabilidad de los supercomplejos de la ETC, mientras que CL es necesaria en el metabolismo respiratorio. En hepatocitos, la pérdida de CL produce disminución del $\Delta\Psi_m$ y estrés oxidativo mitocondrial promoviendo la progresión de diferentes enfermedades hepáticas (Mårtensson et al., 2017; Paradies et al., 2014). En resumen, los lípidos no bicapa como CL y PE son específicamente necesarios para la actividad de los complejos de la ETC.

1.2. Asociación entre la importación de proteínas y los lípidos mitocondriales

La importación de proteínas es esencial para la biogénesis y la función mitocondrial. Alrededor del 99% de las proteínas mitocondriales se sintetizan como precursores en los ribosomas citosólicos y tienen que ser transportadas a las mitocondrias. Proteínas específicas median la importación y posterior distribución de estas proteínas precursoras en los sub-compartimentos mitocondriales. Una compleja red de translocasas media la distribución de las proteínas mitocondriales (Fig. 3).

Los fosfolípidos ejercen funciones específicas en las vías de transporte de proteínas a través de las membranas mitocondriales (Fig. 3). La unión de proteínas precursoras al complejo TOM se reduce en las mitocondrias deficientes en PE o CL (Becker et al., 2013), pero estas uniones no se modifican en las mitocondrias depletadas de PC (Schuler et al.,

2015). Sin embargo, la biogénesis de las proteínas β -barrel mediada por SAM es particularmente sensible a las alteraciones de la composición de los fosfolípidos de la membrana externa, fundamentalmente PE, CL o PC (Becker et al., 2013; Schuler et al., 2015). Los defectos de los complejos de la ETC en las mitocondrias depletadas de PE reducen el $\Delta\Psi_m$, y afectan la importación de proteínas precursoras (Böttinger et al., 2012). Se ha reportado en levaduras que CL, PE y PC afectan diferencialmente a las translocasas proteicas de ambas membranas mitocondriales. En particular, los complejos dinámicos TIM23, SAM y las translocasas son sensibles a las alteraciones de la composición de los fosfolípidos.

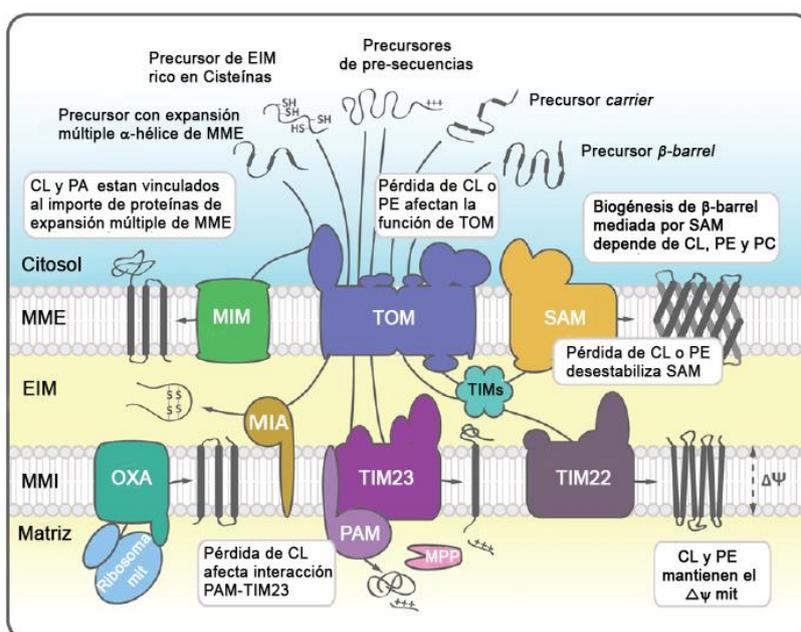


Figura 3. Los lípidos influyen la distribución de las proteínas dentro de la mitocondria. Se han encontrado cinco vías principales de distribución de las proteínas precursoras codificadas nuclearmente, en las mitocondrias de levadura. El complejo TOM transporta la mayoría de las proteínas precursoras a las mitocondrias. Diferentes proteínas dirigen estas proteínas precursoras a los sub-compartimentos mitocondriales. Los precursores con una pre-secuencia clivable se transfieren al complejo TIM23, que dirige las proteínas a la MMI o las transporta a la matriz mitocondrial. La translocación a la matriz depende además de la asociación con una translocasa PAM dependiente de ATP. La peptidasa MPP elimina la pre-secuencia y las chaperonas TIM del EIM guían estas proteínas desde el complejo TOM hasta el complejo TIM22, que media la inserción de la proteína en la membrana interna. El $\Delta\Psi_m$, generado por la ETC, proporciona la fuerza motriz para la importación dependiente de TIM23 y TIM22 a través de la MMI. La proteína MIA media el transporte y el plegado oxidativo de proteínas ricas en cisteína en el EIM. El complejo proteico SAM pliega e inserta proteínas con estructuras β -barrel en la MME. Las chaperonas TIM ayudan en la transferencia de las proteínas β -barrel desde TOM al complejo SAM. El complejo MIM promueve la biogénesis de proteínas de MME con uno o varios segmentos transmembrana. Por último, las proteínas codificadas en el genoma mitocondrial se insertan co-traduccionalmente en la MMI mediante la proteína de ensamblaje OXA. Adaptado de (Mårtensson et al., 2017).

1.3. Rol de los lípidos en la dinámica mitocondrial

Como se mencionó, las mitocondrias forman una red tubular y se someten constantemente a eventos de fusión y fisión para permitir el intercambio de su contenido. Los defectos de la dinámica de las mitocondrias conducen a alteración de la morfología mitocondrial, pérdida de ADN mitocondrial, defectos en la respiración y causan enfermedades neurodegenerativas graves (Fig. 4).

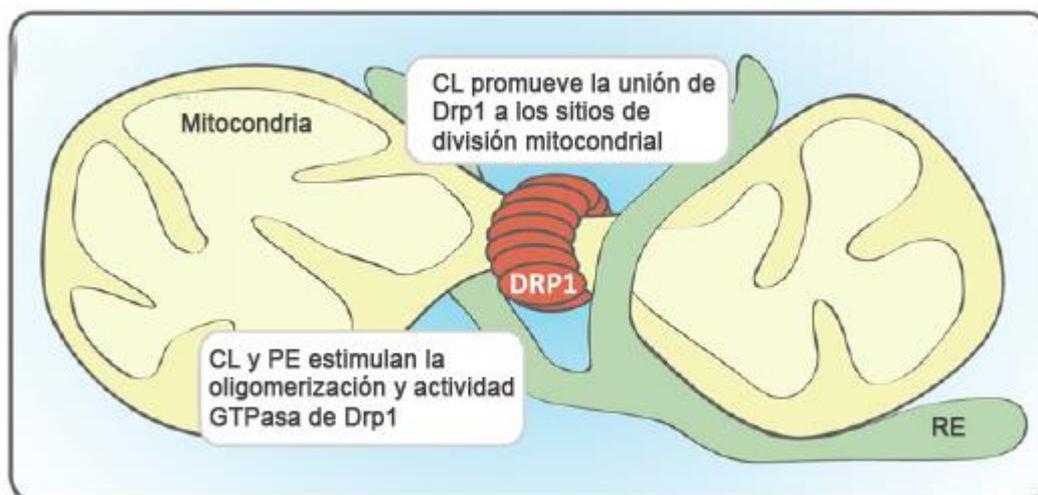


Figura 4. Rol de fosfolípidos en la dinámica mitocondrial. La proteína Drp1 forma estructuras de anillos oligoméricos que pueden restringir la mitocondria y conducir a su fisión. En estos sitios de fisión, el RE rodea la mitocondria. Drp1 es reclutado a las mitocondrias a través de proteínas adaptadoras y posiblemente CL. PE y CL promueven la fisión mitocondrial mediada por Drp1. Adaptado de (Mårtensson et al., 2017).

1.4. Los lípidos afectan la arquitectura de la membrana de las mitocondrias

En levaduras y plantas, mutantes que carecen de CL o que poseen defectos en la remodelación de CL presentan afectada la ultraestructura mitocondrial, incluyendo la formación de las crestas, indicando que CL participa en el mantenimiento de la arquitectura de las membranas mitocondriales (Mårtensson et al., 2017). Se reportó una asociación de la CL sintasa con los sitios de contacto mitocondrial y los sistemas de organización de las crestas (MICOS) (Hoppins et al., 2011). MICOS es crucial para mantener la arquitectura de la membrana interna incluyendo la formación de las uniones de las crestas y los sitios de contacto a la membrana externa. Se ha demostrado que los dímeros de la F_1F_0 -ATP sintasa están organizados en filas en los bordes de las crestas para promover la gran curvatura de la membrana. En resumen, CL promueve la

formación de las crestas estimulando la organización molecular de los complejos proteicos MICOS y F_1F_0 -ATP sintasa (Fig. 5). La organización espacial de fosfolípidos y proteínas en dominios específicos de las membranas mitocondriales es importante para la biogénesis y función de la organela. Las prohibitinas organizan los fosfolípidos y proteínas en dominios específicos. En las células humanas se requieren complejos de prohibitinas para la remodelación de CL por la enzima *taffazin*, revelando la estrecha conexión de las prohibitinas y el metabolismo de CL (Tatsuta et al., 2005).

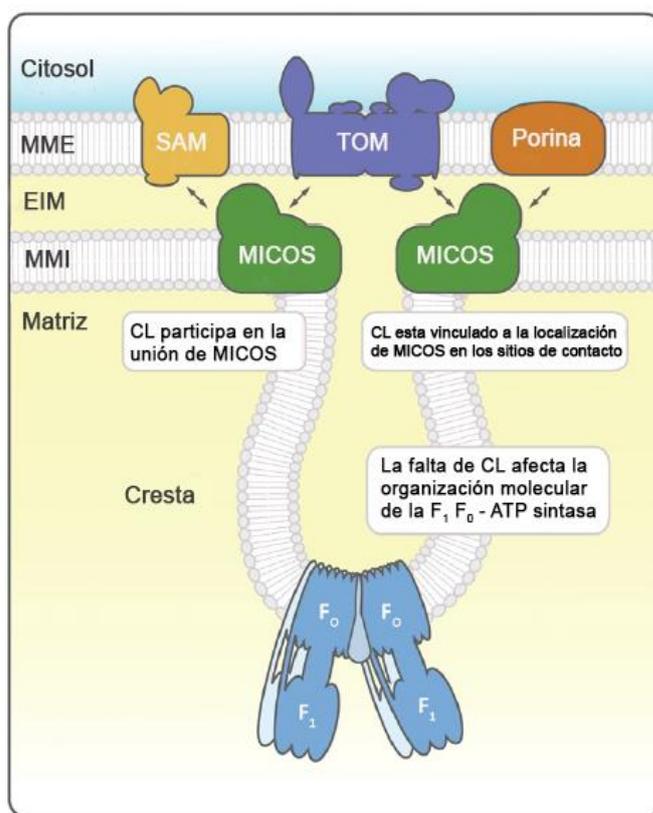


Figura 5. Los fosfolípidos afectan la arquitectura de la membrana mitocondrial interna. La MMI forma grandes invaginaciones, llamadas crestas, y sitios de contacto a la MME. Los sitios de contacto mitocondrial y MICOS interactúan con las proteínas de la membrana externa y median la formación de las uniones de las crestas. Los dímeros de F_1F_0 -ATP sintasa se encuentran en las puntas de las crestas. Los fosfolípidos como CL juegan un papel importante en la formación de las crestas al afectar la organización molecular de MICOS y F_1F_0 -ATP sintasa. Adaptado de (Mårtensson et al., 2017).

2. Biosíntesis de los fosfolípidos mitocondriales

Las membranas mitocondriales sintetizan diferentes fosfolípidos, como CL, PE y fosfatidilglicerol (PG), a partir de precursores como PA y PS, que se sintetizan en el RE y

son importados a la mitocondria (Vance, 2014). PA es un intermediario clave en la biosíntesis tanto de otros glicerofosfolípidos como de triacilgliceroles (TAG). Es estructuralmente uno de los fosfolípidos más simples que influye en la estructura y dinámica de la membrana e interactúa con diversas proteínas.

La síntesis del PA se realiza principalmente a partir del glicerol 3-fosfato (Pagac et al., 2012; Zheng and Zou, 2001). En los mamíferos se produce tanto en la MME (a través de Gpat1 y Gpat2) como en el RE (a través de Gpat3 y Gpat4). Una segunda acilación del liso-PA resultante es mediada por la liso-PA aciltransferasa (AGPAT4/5) (Benghezal et al., 2007; Leung, 2001; Riekhof et al., 2007). PA también se puede generar a través de la eliminación del grupo colina de PC por fosfolipasa D o a través de la fosforilación del diacilglicerol (DAG) por la DAG-quinasa. En mamíferos, otra fosfolipasa D que se encuentra en la membrana externa mitocondrial (mitoPLD) también genera PA a partir de CL (Lu and Claypool, 2015; Zhang et al., 2014).

A través de la vía CDP-DAG, el PA se puede convertir, por la CDP-DAG sintetasa, en el fosfolípido intermediario CDP-DAG (Fig. 6). En las levaduras, Cds1 y Tam41 convierten PA a CDP-DAG en el RE y en la matriz mitocondrial, respectivamente. Dos ortólogos Cds1 de mamíferos (es decir, Cds1 y Cds2) están presentes en el RE. En *Saccharomyces cerevisiae*, PA también se utiliza para la síntesis de PE y PC a través de DAG por la vía de Kennedy (CDP-etanolamina y CDP-colina, respectivamente). El DAG derivado de PA también se utiliza para la síntesis de TAG (Carman and Henry, 2007).

La conversión de PA en DAG por fosfolipasas es necesaria para la producción de PC, PE y PS. Además, DAG a través de la reacción con el trifosfato de citidina también se convierte en CDP-DAG que es el intermediario clave en la síntesis de PG, y por lo tanto de cardiolipina (CL) y de fosfatidilinositol (PI); y en procariotas y levaduras también de PS (Zhang et al., 2014).

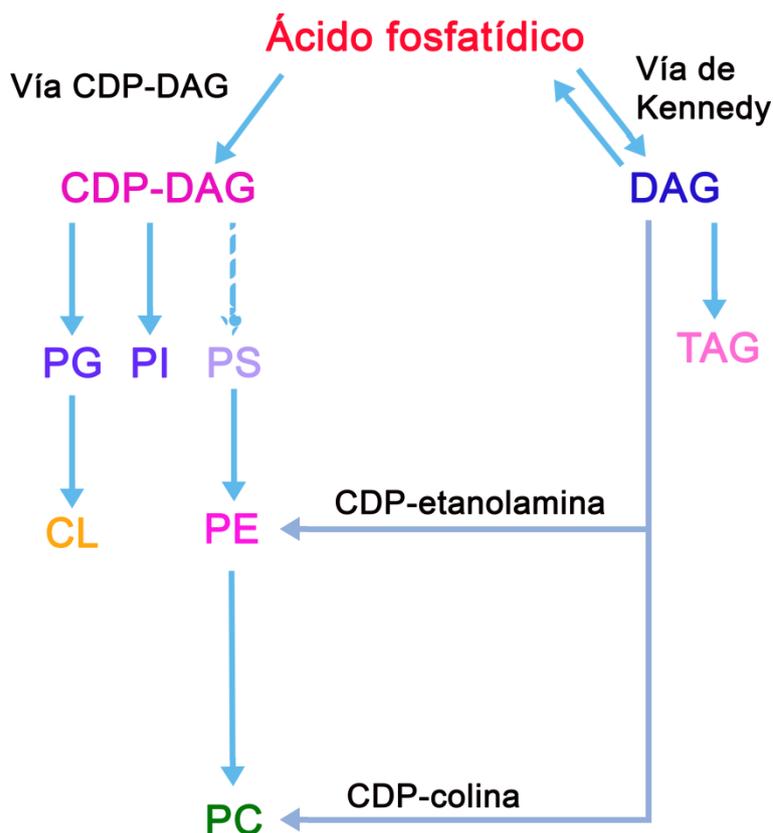


Figura 6. Biosíntesis de fosfolípidos mitocondriales. El principal precursor PA se sintetiza en el RE y en la membrana externa mitocondrial. La vía CDP-DAG se localiza en el RE y en la membrana interna mitocondrial y produce una variedad de fosfolípidos incluyendo PI, PS, PE, PC y CL. Además, PA puede generar DAG que es utilizado para la síntesis de PE y PC a través de la vía de Kennedy, o para la síntesis de TAG.

2.1. La vía de Kennedy: Síntesis de PC, PE y PS

PC puede sintetizarse por 3 vías: *vía de novo* (vía de Kennedy), a través del ciclo de Lands y de la vía de la fosfoetanolamina-metil-transferasa (PEMT).

En la vía de Kennedy, es necesaria la presencia de colina que es incorporada a través de la dieta por transportadores localizados en la membrana celular o reciclada mediante el catabolismo de PC. Una vez en la célula, ocurre el primer paso de la vía en el cual la colina es fosforilada por una colina quinasa citósolica (CK), codificada por *CHKA* y *CHKB*, para producir fosfocolina y ADP. Luego en el RE, fosfocolina y citidina trifosfato (CTP) son utilizados por la CTP: fosfocolina citidiltransferasa (CT), codificada por *PCYT1A* y *PCYT1B*, para producir CDP-colina y pirofosfato. Finalmente, la colinafosfotransferasa (CPT), codificada por *CPT1* y *CEPT1*, transfiere fosfocolina desde CDP-colina al DAG produciendo PC y CMP (Fig. 7).

Por otra parte, en el ciclo de Lands, la fosfolipasa A2 (PLA2) remueve los ácidos grasos de la posición *sn*-2 de PC para dar lugar a lisofosfatidilcolina (LPC), que puede ser usada en una reacción reversa por la LPC aciltransferasa para originar nuevamente PC (McMaster, 2018; Moessinger et al., 2014).

La tercera vía de síntesis de PC es a través de la enzima PEMT localizada principalmente en hígado, la cual convierte PE en PC mediante tres metilaciones secuenciales. La PC producida por esta vía puede luego ser degradada por las fosfolipasas C y D generando colina.

En las células de los mamíferos, PS es sintetizada por la enzima PS sintasa-1 (PSS1) a partir de PC y por PS sintasa-2 (PSS2) que utiliza PE. Ambas enzimas son proteínas transmembrana con su sitio activo expuesto sobre la cara citosólica del RE, particularmente en las membranas de asociación entre RE y las mitocondrias (MAMs). (Hernández-Alvarez et al., 2019).

PE puede ser sintetizada *de novo* de manera similar a PC: en la primera reacción la etanolamina es fosforilada por la etanolamina quinasa (EK1 o EK2) para producir fosfoetanolamina. En el RE, la enzima CTP fosfoetanolamina citidiltransferasa convierte fosfoetanolamina en CDP-etanolamina. Luego, se produce la transferencia de fosfoetanolamina desde la CDP-etanolamina al DAG en una reacción catalizada por la CDP-etanolamina: 1,2 diacilglicerol etanolaminafosfotransferasa (EPT), dando lugar a PE (Fig. 7).

PE también se puede producir en la mitocondria por descarboxilación de PS mediante la enzima fosfatidil serina descarboxilasa (PSD). La PE producida por esta última vía se exporta hacia otras organelas como RE y membrana plasmática. Una tercera vía de síntesis de PE es partiendo de Liso-PE a través de la Liso-PE aciltransferasa (van der Veen et al., 2017; Vance, 2018).

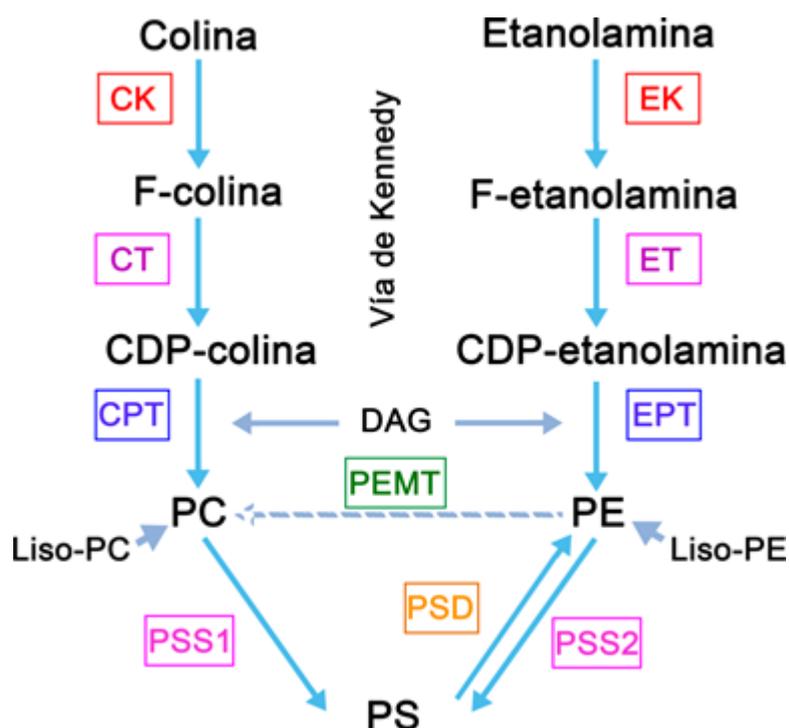


Figura 7. Biosíntesis de los fosfolípidos mitocondriales PC, PE y PS. La vía de Kennedy se localiza en el RE y genera PC y PE *de novo*. PC se produce además por metilaciones secuenciales de PE que ocurren en el RE mediadas por la enzima PEMT. PE también se puede generar en la MMI a partir de PS mediada por la PSD. PS es producida solamente en RE a partir de PC o PE mediante las enzimas PSS1 y PSS2, respectivamente.

3. Distribución y transporte de los fosfolípidos mitocondriales

Como se mencionó, las membranas mitocondriales se caracterizan por un alto contenido de fosfolípidos aproximadamente un 40-50% de PC, 30-40% de PE, 2-9% de PI, 1% de PS y <1% de PA; además contienen CL (5-15%) un fosfolípido específico de esta organela. Se reportó, en los organismos eucariotas, una relación altamente conservada de fosfolípidos bicapa y no bicapa, revelando un rol clave en la función y estructura mitocondrial (Fig. 8A). La composición lipídica de la MME difiere significativamente de la de la MMI. Debido a que la mayoría de la CL se sintetiza en la MMI, este lípido está enriquecido en la MMI y en bajas concentraciones en la MME. PI y PS se encuentran mayoritariamente en la MMI, mientras que PC se encuentra distribuido en ambas membranas (Fig. 8B) (Ball et al., 2018; Tatsuta et al., 2014).

Como ya se mencionó, aproximadamente el 45% de los fosfolípidos de la mitocondria son sintetizados de forma autónoma por esta organela (PE, PA y CL), pero la mitocondria

no puede sintetizar PC y PS y depende de la transferencia de estos lípidos desde el RE (Horibata et al., 2017; Van Meer et al., 2008). En consecuencia, se produce una transferencia bidireccional de lípidos entre el RE y la MME y entre ambas membranas mitocondriales.

Existen diferentes mecanismos que favorecen el transporte desde su sitio de síntesis hacia las otras organelas: puede ser mediante difusión espontánea del fosfolípido, a través de vesículas, de proteínas transportadoras de lípidos o por las MAMs. Las enzimas implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos están enriquecidas en las MAMs (Lev, 2012; Tatsuta et al., 2014).

Se reportó un mayor transporte de PS a la mitocondria en sitios cercanos a las MAMs, ya que esto elimina la transferencia a través del medio acuoso que resulta energéticamente desfavorable (Vance, 2014). Se ha descrito que la PS producida en las MAMs es importada a la mitocondria a través de la proteína Mfn2 (Fig. 8C) (Hernández-Alvarez et al., 2019). Recientemente, se demostró que el complejo PRELID3b/TRIAP1 media la transferencia de PS a través del EIM para que la enzima PSD la convierta en PE, la cual se redistribuye dentro de las mitocondrias o se exporta al RE. La importación de PE a las mitocondrias desde el RE parece ser un proceso parcialmente restringido ya que la PE que reside en las mitocondrias se produce preferentemente a través de la PSD en la MMI. Se ha descrito que la eliminación de la enzima PSD en ratones es letal y causa anomalías mitocondriales graves, a pesar de contar con la producción de PE proveniente de la vía de Kennedy (Steenbergen et al., 2005). Como se mencionó, la metilación de PE en el RE genera PC, que se puede transportar a la mitocondria, al igual que sucede con otros fosfolípidos sintetizados en el RE, como PS o PI. (Horibata et al., 2016; Tatsuta et al., 2014). Se reportó que la distribución de PC, el fosfolípido más abundante en las células de mamíferos, dentro de las membranas mitocondriales está controlada por la proteína de transferencia de lípidos **StarD7** (Horibata and Sugimoto, 2010; Saita et al., 2018).

El complejo proteico PRELID1/TRIAP1 realiza la transferencia de PA a través de las membranas mitocondriales en el EIM proporcionando PA a las enzimas biosintéticas de CL en la MMI, manteniendo así los niveles de CL en las membranas mitocondriales y la resistencia a la apoptosis (Potting et al., 2013; Tatsuta et al., 2014).

A diferencia de los fosfolípidos, los esfingolípidos y esteroides no se pueden sintetizar en las membranas mitocondriales sino que se importan desde el RE. En el caso particular del colesterol la importación se realiza a través de la proteína StarD1 (StAR: *Steroidogenic Acute Regulatory protein*) o por las proteínas de la familia de unión al oxisterol (OSBP) (Alpy and Tomasetto, 2005) (Fig. 8C).

El movimiento de fosfolípidos como PS, PC y PE entre la bicapa resulta energéticamente desfavorable y no ocurre de manera espontánea. La única escramblasa que se ha localizado en las mitocondrias es PLSCR3, que facilita el transporte de CL desde la MMI a la MME (Liu et al., 2003).

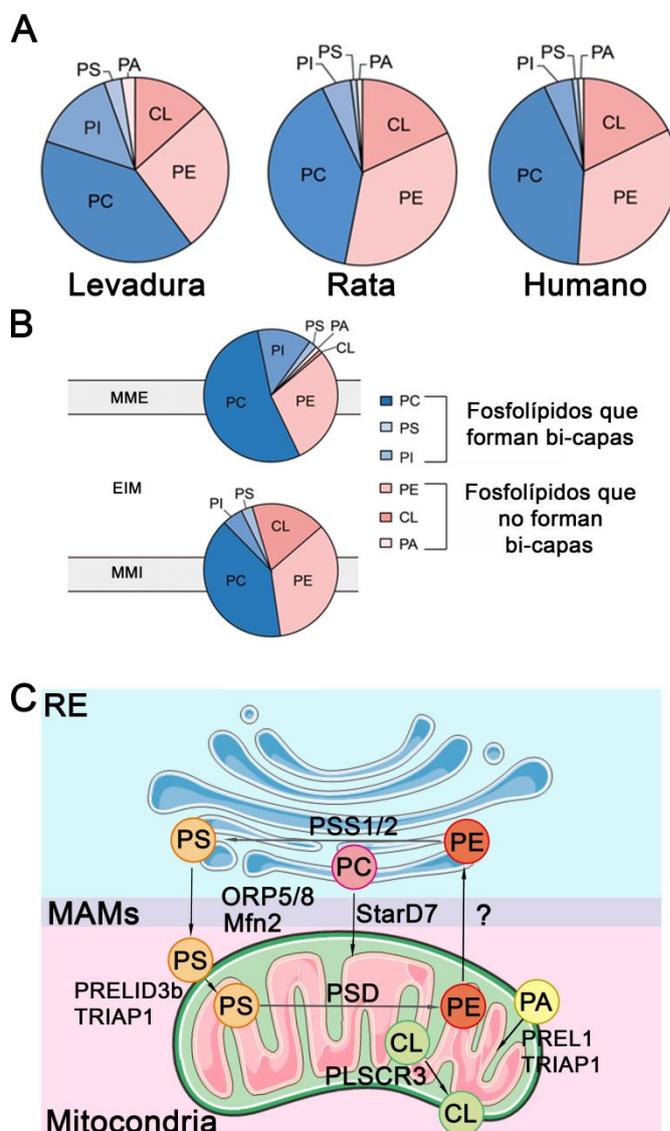


Figura 8: Distribución de fosfolípidos en las membranas mitocondriales y su transporte. (A) Distribución de fosfolípidos en membranas de diferentes especies. **(B)** distribución de fosfolípidos entre MME y MMI adaptado de (Ball et al., 2018). **(C)** Transporte de fosfolípidos mitocondriales (SMART-Servier Medical Art).

3.1. Rol de los sitios de contacto de la MME con la MMI

Inicialmente se describió que los lípidos transportados se acumulaban en fracciones de membrana de densidad intermedia que contienen sitios de contacto entre la MME y la MMI, lo que sugiere que el transporte de lípidos se produce en estos sitios (Ardail et al., 1991; Simbeni et al., 1991). Estudios proteómicos, así como mapas de interacción genética permitieron la identificación de un complejo proteico, llamado MICOS en levaduras (Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011; von der Malsburg et al., 2011). La pérdida de este complejo altera significativamente la estructura de la MMI que forma crestas alargadas, mientras que las uniones de crestas parecen estar ausentes. La eliminación de los genes que codifican las subunidades de este complejo junto a mutaciones que afectan la vía biosintética de CL causa defectos de crecimiento, vinculando la función de los sitios de contacto entre la MME y la MMI con la biogénesis de los fosfolípidos (Hoppins et al., 2011).

4. Importancia de los fosfolípidos en el metabolismo celular

La síntesis de fosfolípidos es vital para la supervivencia celular, el desarrollo normal y el mantenimiento de la salud, por lo que pequeñas alteraciones en el contenido de PC y/o PE de varios tejidos están implicadas en desórdenes metabólicos como la aterosclerosis, la resistencia a la insulina y la obesidad, procesos relacionados con el síndrome metabólico.

Numerosos estudios realizados con cambio de dieta y animales *knockout* han resaltado la importancia del metabolismo de los fosfolípidos en la regulación de los lípidos, las lipoproteínas y el metabolismo energético. Se ha reportado que la relación PC/PE anormalmente alta o baja puede influir en el metabolismo energético y se lo ha relacionado con la progresión de diferentes enfermedades. Cuando el contenido de PE de las mitocondrias se reduce en ~ 20%, y aumenta la relación PC/PE mitocondrial se disminuye el consumo de oxígeno y la tasa de producción de ATP, consistente con defectos en los complejos I y IV de la ETC. Se reportó que células deficientes en la enzima PSD, y por lo tanto con niveles disminuidos de PE, presentan mitocondrias fragmentadas con una ultraestructura mitocondrial aberrante (van der Veen et al., 2017).

PC es un componente estructural esencial de las lipoproteínas de muy baja densidad y es necesaria para su secreción y la exportación de TAG desde el hígado. Por lo tanto, la deficiencia de colina y consecuentemente de PC puede resultar en una acumulación de lípidos en el hígado (Fu et al., 2011; Schiller et al., 2001).

De hecho, pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) presentan una disminución de la proporción hepática de PC/PE. Además, se ha reportado que la deficiencia de colina en la dieta produce una disfunción neurológica y favorece el desarrollo de hígado graso, induciendo NASH en ratones y humanos (Duric et al., 2012; Kartsoli et al., 2020). Por el contrario, el suministro de colina reduce la acumulación de TAG en el hígado.

Se reportó que la abundancia relativa de PC y PE en la superficie de los *lipid droplets* (LDs) es importante para su dinámica. Dado que PC es el fosfolípido principal dentro de la monocapa de los LDs existe una necesidad biológica de síntesis de PC para almacenar energía cuando se estimula la lipogénesis. La inhibición de la biosíntesis de PC en condiciones que promueven el almacenamiento de TAG aumenta el tamaño de los LDs ya que la proporción del área superficial de fosfolípidos relativa al volumen de TAG de los LDs más grandes es menor que el de los LDs pequeños. Además, un aumento en la cantidad relativa de PE en la superficie de los LDs puede promover la fusión de las gotas más pequeñas generando LDs más grandes (van der Veen et al., 2017).

Los fosfolípidos también juegan un papel importante en otros tejidos además del hígado, en el músculo un defecto en la enzima CK causa distrofia muscular congénita con mitocondrias agrandadas en la periferia de las fibras musculares y ausentes en el centro de las mismas (Mitsubishi and Nishino, 2011). Los fosfolípidos del músculo esquelético se remodelan en respuesta a señales metabólicas, incluida la alimentación rica en grasas y el ejercicio, y estos cambios pueden influir en la sensibilidad a la insulina del músculo, así como en la tolerancia a la glucosa. La síntesis desequilibrada de PC y PE en el músculo influye en la sensibilidad a la insulina al interrumpir la homeostasis del calcio celular (van der Veen et al., 2017).

III. LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS StarD7

La proteína transportadora de lípidos StarD7 pertenece al grupo 3 de la familia de proteínas START junto a StarD2, StarD10 y StarD11 (Fig. 9). La familia START participa en una variedad de procesos fisiológicos, como la transferencia de lípidos entre compartimientos intracelulares, el metabolismo lipídico y la modulación de eventos de señalización, habiéndose reportado que la mutación o la expresión desregulada de algunas de estas proteínas generan procesos patológicos, incluyendo trastornos genéticos, enfermedades autoinmunes, enfermedades de la médula espinal y cáncer (Alpy and Tomasetto, 2014).

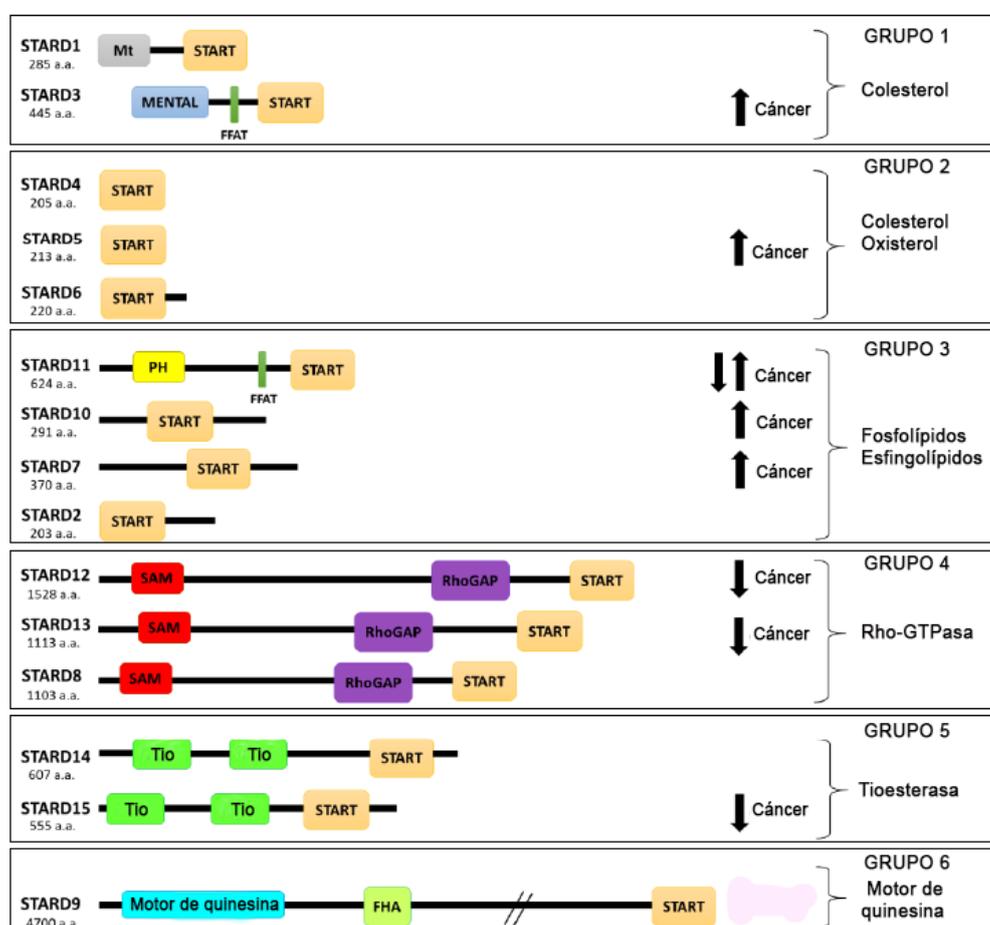


Figura 9. Representación esquemática de la familia de proteínas START agrupadas en seis subfamilias. START (*StAR-related lipid-transfer domain*), Mt (Secuencia de localización mitocondrial), MENTAL (*MLN64 NH(2)-terminal domain*), PH (*Pleckstrin homology domain*), FFAT (Región ácida de dos fenilalaninas), RhoGAP (Dominio de activación Rho-GTPasa), SAM (*Sterile alpha motif domain*), TIO (*Thioesterase active domain*), y FHA (*N-terminal Forkhead-associated domain*). a.a.—aminoácidos. Las flechas indican aumento (arriba) o disminución de la expresión (abajo) en cáncer. Adaptado de (Asif et al., 2021).

1. Características estructurales y bioquímicas

StarD7 es una proteína de expresión ubicua y evolutivamente conservada presente desde organismos simples como *Caenorhabditis elegans* hasta organismos complejos como el *Homo sapiens*. En humanos, el gen de StarD7 posee 8 exones que abarcan 23,96 kb y se localiza en el brazo largo del cromosoma 2p12-2p11.2 (Flores-Martin et al., 2013). El ARNm de StarD7 (designado originalmente como GTT1, número de acceso a *GenBank* AF270647.1) se identificó en nuestro laboratorio por técnicas de expresión diferencial de genes (número de acceso AAF81750.1) (Durand et al., 2004). Además, se reportó por primera vez la presencia de la proteína StarD7 en las células del trofoblasto humano, como una proteína de aproximadamente 34 kDa (Angeletti et al., 2008), posteriormente se la detectó por espectrometría de masa en tejido testicular (Leman et al., 2009). La actualización de la base de datos *GenBank* indica que el ARNm de StarD7 (NM_020151.3) codifica a una proteína de 370 aminoácidos con un peso teórico de 43.1 kDa y una señal de localización mitocondrial. Se identificaron posibles sitios de ubiquitinación en las lisinas 137 y 339 de StarD7 (NP_064536.2) (Kim et al., 2011) y se predicen tres sitios potenciales de fosforilación en las serinas 52, 53 y 350 (Hornbeck et al., 2012). Mediante el uso de una librería de péptidos se predijo que podría ser blanco de una proteína quinasa A (PKA), sugiriendo que StarD7 es una fosfoproteína regulada por la vía cAMP/PKA (Rodríguez et al., 2004).

Estudios realizados por Angeletti y col. indican que StarD7 puede formar monocapas estables por adsorción en la interfase aire-buffer (Angeletti et al., 2004) y que promueve el “*dequenching* de fluorescencia” de vesículas unilamelares así como la formación de células gigantes multinucleares (Angeletti et al., 2012). Mediante ensayos de interacción *in vivo* con lípidos fotoactivables se reportó que StarD7 solo interactuaría con PC (Haberkant et al., 2013). Sin embargo, experimentos de mutagénesis y marcado de fotoafinidad indican que el dominio START de StarD7 posee un sitio de unión común para PC y ceramida, con una fuerte actividad de transferencia de PC *in vitro* la cual es afectada por ceramida (Bockelmann et al., 2018). Por otra parte un estudio reciente determinó que StarD7 es necesaria para el transporte de PG a la mitocondria (Zhang et al., 2020).

Horibata y col., utilizando extractos proteicos preparados a partir de células transfectadas con un vector de expresión que codifica a la proteína de 370 aa detectaron, en ensayos de *Western blot*, dos proteínas con pesos moleculares de 43 kDa (StarD7.I) y 33 kDa (StarD7.II) (Horibata and Sugimoto, 2010). Estos autores propusieron que StarD7 se sintetiza como una proteína precursora de 43 kDa que se procesa, por escisión de la secuencia mitocondrial (Fig. 10), a una forma madura de aproximadamente 33 kDa, facilitando el transporte de PC a la mitocondria.

Recientemente, se demostró que StarD7 contiene, en la región carboxilo terminal de la secuencia de localización mitocondrial, un segmento transmembrana que se cliva entre la metionina 76 y la alanina 77 y entre la alanina 77 y la alanina 78 para producir la forma madura, sugiriendo que StarD7 se ancla en la membrana externa mitocondrial a través del amino terminal extendiendo hacia el citoplasma el carboxilo terminal, lo cual permite el transporte de PC desde el RE (Horibata et al., 2017). Posteriormente, Saita y col. identificaron a StarD7 como una proteína de transferencia intramitocondrial de PC, demostrando que las proteasas MPP y PARL son necesarias para la localización dual de StarD7 en la mitocondria y el citosol y que la proteína YME1L también participa en su procesamiento favoreciendo su degradación (Saita et al., 2018). Concordante con este reporte, se demostró que la ablación de PARL causa en ratones una encefalopatía similar al síndrome de Leigh, una enfermedad mitocondrial caracterizada por disrupción en la producción de energía, alterando el procesamiento de StarD7 (Spinazzi et al., 2019). La Figura 10 muestra el esquema propuesto del procesamiento de StarD7 en la mitocondria y su distribución entre la mitocondria y el citosol.

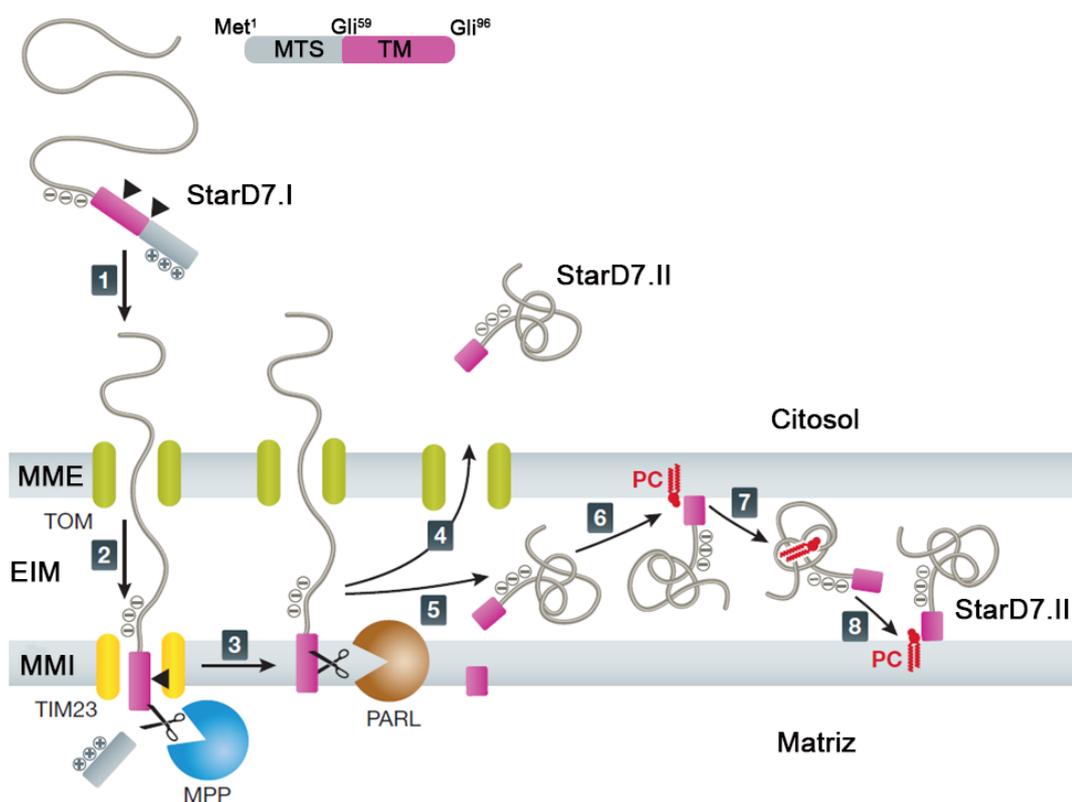


Figura 10. Procesamiento de StarD7 en las mitocondrias y el citosol. (1) StarD7.I es direccionada por la translocasa de la MME (TOM). (2) La secuencia mitocondrial (MTS) de StarD7.I atraviesa la MMI a través de la translocasa de la MMI (TIM23) para llegar a la matriz mitocondrial. StarD7.I es clivada por una peptidasa para generar una isoforma StarD7.I de tamaño intermedio. (3) Esta isoforma se separa del complejo TIM23 para integrarse en la MMI. (4) La proteasa PARL cliva la isoforma intermedia de StarD7.I en el dominio transmembrana (TM) para generar StarD7.II. StarD7.II se libera de la MMI. Los residuos cargados negativamente en el extremo N-terminal de StarD7.II promueven la retro-translocación al citosol. (5) El plegamiento de la proteína en el espacio intermembrana (EIM) promueve la internalización de StarD7.II en el espacio EIM. (6) StarD7.II se une a la MME a través de su dominio transmembrana para unir PC (7) StarD7.II cargada con PC viaja a través del EIM (8) StarD7.II libera PC en la MMI. Adaptada de (Endo and Tamura, 2018).

2. Expresión y regulación de StarD7

Trabajos previos del laboratorio indican que StarD7 tiene una expresión generalizada en las líneas celulares derivadas de trofoblasto JEG-3, JAR, y HTR-8/SVneo, entre otras (Angeletti et al., 2008; Durand et al., 2004). Se reportó a StarD7 como un gen blanco del microARN miR193b en células pancreáticas (Ikeda et al., 2012) y de Has-miR-377, el cual se encuentra disminuido en preeclampsia, lo que sugiere que la expresión de StarD7 puede estar alterada en estas patologías (Zhu et al., 2009). Además, se describió que

miR206 regula negativamente a StarD7 controlando la proliferación de adipocitos porcinos (Xu et al., 2020).

Mediante ensayos con genes reporteros y mutaciones en los sitios de unión para los factores transcripcionales SF-1 y TCF4, se demostró que el promotor de StarD7 es sinérgicamente activado por SF-1 y β -catenina y que el sitio de unión para TCF4 (-614/-608) juega un rol importante en esta activación (Rena et al., 2011). Por otro lado, se reportó que los factores de transcripción MEF2D (*Myocyte Enhancer Factor 2D*) y CRX (*Cone-rodhomeobox protein*) regulan la expresión de StarD7 en las células fotorreceptoras de retina, siendo uno de los genes requeridos para el desarrollo normal de la retina (Andzelm et al., 2015).

Recientemente, nuestro laboratorio reportó que glucosa modula la expresión de StarD7 y β -catenina en células trofoblásticas a través de la vía de la hexosamina asociada a la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR), resaltando la importancia de estudiar la participación de StarD7 en desórdenes placentales relacionados a la disponibilidad de nutrientes (Flores-Martín et al., 2018). Concordante con los resultados del laboratorio se reportó que StarD7 es un gen necesario para el crecimiento celular en condiciones de baja glucosa (Minton et al., 2018).

Estudios de expresión global de genes han reportado que StarD7 se expresa en forma diferencial en diferentes células y tejidos sometidos a diversas condiciones experimentales tales como, inflamación, cáncer, cambios en el estado metabólico y de comportamiento así como en trastornos neurológicos (Flores-Martin et al., 2013).

En resumen, estos trabajos sugieren que los niveles del transcrito StarD7 están fuertemente controlados en la fisiología normal de la célula.

3. Efecto de la deficiencia de StarD7 a nivel celular y molecular

Se reportó, en células trofoblásticas humanas JEG-3, que el silenciamiento de StarD7 mediante el uso de un siRNA dirigido específicamente hacia su ARN mensajero produce una alteración global en la expresión de un número significativo de genes (Flores-Martin, 2015). Algunos de los genes alterados detectados en el análisis de *microarray* fueron validados mediante ensayos de qRT-PCR y estaban asociados a una disminución

en la biosíntesis de fosfolípidos y en la migración y proliferación celular con un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación celular como β -hCG, y sincitina (Flores-Martín et al., 2012).

Por otro lado, Yang y col reportaron que ratones StarD7 +/- desarrollan una respuesta alérgica asociada a un aumento en la permeabilidad epitelial pulmonar y dermatitis atópica espontánea; mientras que los ratones StarD7 -/- mueren entre los días 10-11 de gestación, probablemente relacionado a alteraciones en el desarrollo cardiovascular (Yang et al., 2015). Se demostró en células HepG2 que la deficiencia de StarD7 genera cambios morfológicos en el RE y en las crestas mitocondriales. Estos cambios morfológicos se acompañaron con estrés de RE, activación de la vía UPR y aumento en las ERO (Flores-Martín et al., 2016). Consistente con estos resultados, datos obtenidos por Horibata y col. demuestran que la disminución de StarD7 afecta adversamente la composición de PC, la actividad respiratoria y la estructura de las crestas mitocondriales (Horibata et al., 2016; Horibata et al., 2020; Yang et al., 2017). Por otra parte, Yang y col. encontraron alteraciones similares en las mitocondrias de células epiteliales de pulmón BEAS-2B en las cuales se redujo la expresión de StarD7 mediante el uso de shRNA. Estos cambios morfológicos observados en las mitocondrias de las células BEAS-2B se asociaron a una alteración en la homeostasis mitocondrial con una disminución en la producción de ATP mitocondrial, daño en el ADN mitocondrial y un aumento en la producción de ERO mitocondriales. También se observó un aumento en la permeabilidad de las células silenciadas asociadas a la disminución de las proteínas de unión: claudina-1, claudina-4 y *zonula occludens-1* (ZO-1) (Yang et al., 2017). Recientemente, Horibata y col. reportaron que la deficiencia de StarD7 impide la diferenciación miogénica de los mioblastos C2C12 de ratón y de mioblastos de músculo esquelético humano. (Horibata et al., 2020)

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Como se mencionó, la correcta función mitocondrial requiere de un sistema altamente coordinado de suministro de proteínas y fosfolípidos. Los fosfolípidos y sus precursores deben ser transportados a las mitocondrias, desde el RE a la MME y desde ésta a la MMI a través del EIM. Trabajos previos del laboratorio y de otros autores han reportado que la deficiencia de StarD7 conduce a alteraciones en la estructura mitocondrial y del RE con una reducción en el contenido de PC (Flores-Martín et al., 2016; Horibata and Sugimoto, 2010; Saita et al., 2018; Yang et al., 2017); sin embargo, se desconoce si StarD7 modula la dinámica y función mitocondrial. Considerando los antecedentes expuestos que señalan el requerimiento de mantener una adecuada relación de PC/PE (van der Veen et al., 2017) y la importancia de StarD7 en el transporte de PC a la mitocondria se planteó como hipótesis de trabajo que ***se requiere un nivel adecuado de StarD7 para preservar la fisiología celular y que la desregulación de su expresión, por ganancia o pérdida de función, contribuye a generar alteraciones de la homeostasis mitocondrial con un riesgo incrementado a desarrollar procesos patológicos.***

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Establecer la participación de StarD7 en la morfología, dinámica y función mitocondrial utilizando dos modelos celulares de estudio: la línea HTR-8/SVneo derivada de trofoblasto de primer trimestre y la línea C2C12 derivada de tejido muscular de ratón adulto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analizar el efecto de cambios en los niveles de StarD7 en la morfología y dinámica mitocondrial.
- Analizar el efecto de cambios en los niveles de StarD7 en la función mitocondrial.
- Evaluar el impacto de los cambios en los niveles de StarD7 en otros procesos celulares mediados por la alteración de la función mitocondrial.

RESULTADOS

SECCIÓN I

I. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE StarD7 EN LAS CÉLULAS HTR-8/SVNEO ALTERAN LA MORFOLOGÍA Y DINÁMICA MITOCONDRIAL

Como se mencionó, numerosos reportes indican que la disfunción mitocondrial está implicada en varias patologías que incluyen el cáncer, desórdenes neurodegenerativos, obesidad, así como complicaciones placentales. Con el fin de explorar la participación de StarD7 sobre la morfología mitocondrial se evaluó el impacto que produce la disminución o el aumento de sus niveles de expresión utilizando como modelo de estudio la línea celular HTR-8/SVneo. Para esto, se realizaron ensayos de silenciamiento y sobre-expresión transiente o estable de la proteína.

1.1. Silenciamiento de StarD7 en células HTR-8/SVneo silenciadas en forma transiente o estable

Para lograr la disminución de los niveles de la proteína se empleó un siRNA dirigido contra la secuencia del ARN mensajero de StarD7 (siD7) y un siRNA *scrambled* como control negativo (siC) (Applied Biosystems/Ambion). El grado de silenciamiento se analizó mediante *Western blot* evaluando los niveles de la proteína StarD7 utilizando un anticuerpo generado en el laboratorio. Se observó una disminución significativa de los niveles de StarD7 del 90% luego de 72 h de cultivo respecto al valor de las células transfectadas con siC ($p < 0,05$) (Fig. 11A). Alternativamente, se realizó un silenciamiento estable mediante un shRNA específico para StarD7. La Figura 11B muestra una disminución de StarD7 del 70% en las células establemente silenciadas (shD7) comparado a las células tratadas con un shRNA control (shC).

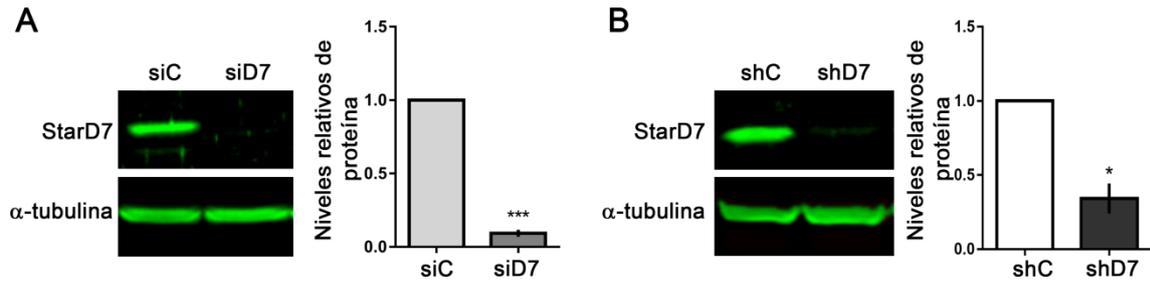


Figura 11: Expresión de StarD7 en células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 o siC o establemente silenciadas. *Western blot* de extractos proteicos provenientes (A) de células HTR-8/SVneo transfectadas con 50 nM de siRNA para StarD7 (siD7) o de siRNA *scrambled* (siC) cultivadas durante 72 h y (B) de células HTR-8/SVneo establemente silenciadas mediante shRNA para StarD7 (shD7) o un shRNA control (shC). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-StarD7 o anti- α -tubulina. Los gráficos de barras muestran la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de la proteína StarD7 respecto al control normalizados con α -tubulina. Las barras indican la media \pm SEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; *one sample t-test*).

1.2. Expresión de StarD7 en células HTR-8/SVneo que sobre-expresan StarD7.I o StarD7.II en forma estable o transiente

Por otra parte, para sobre-expresar de manera estable la proteína se utilizaron dos plásmidos lentivirales generados en este trabajo, uno codificando la isoforma precursora de StarD7 que posee una secuencia de localización mitocondrial (pLenti-StarD7.I) y otro codificando la isoforma madura (pLenti-StarD7.II) que carece de la señal de localización mitocondrial. Se observó un incremento significativo de los niveles proteicos de StarD7 en las células HTR-8/SVneo estables para StarD7.I (D7.I) y para StarD7.II (D7.II) respecto a las células establemente transfectadas con el vector lentiviral vacío, usado como control (Ct) ($p < 0,05$) (Fig. 12A). Los niveles evaluados de StarD7 corresponden a la proteína de 33 kDa, ya que la forma precursora de 43 kDa se procesa rápidamente en la mitocondria para dar lugar a la forma madura de la proteína (Horibata and Sugimoto, 2010). Para corroborar que las células D7.I sobre-expresan la forma precursora de la proteína, se realizó un ensayo en el cual se inhibió el procesamiento mitocondrial de la proteína mediante el tratamiento de las células con CCCP (desacoplante de la OXPHOS). Los ensayos de *Western blot* mostraron una acumulación de la isoforma precursora StarD7.I en los extractos provenientes de las células D7.I respecto a las células D7.II o Ct (Fig. 12B), confirmando la sobre-expresión de la isoforma precursora en las células D7.I.

Por otra parte se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo para StarD7. Las mitocondrias se tiñeron con MitoTracker Deep Red evaluando las

imágenes por microscopía confocal. La Figura 12C muestra un aumento en los niveles de StarD7 en las células D7.I y D7.II respecto a Ct.

Alternativamente, se sobre-expresó de manera transiente las isoformas StarD7.I y StarD7.II de la proteína. Para ello, se utilizaron los plásmidos bi-cistrónicos pLenti-StarD7.I-IRES EGFP (D7.I-IRES EGFP) y pLenti-StarD7.II-IRES EGFP (D7.II-IRES EGFP) que expresan la forma precursora y madura de la proteína, respectivamente; y de manera independientemente la proteína GFP. Como control de transfección se utilizó el plásmido pLenti-IRES EGFP (Ct-IRES EGFP). La sobre-expresión transiente se corroboró mediante ensayos de *Western blot* analizando la expresión de la proteína GFP la cual se correlacionó con los niveles de StarD7 en las células D7.I-IRES EGFP y D7.II-IRES EGFP respecto a las células Ct-IRES EGFP (Fig. 12D).

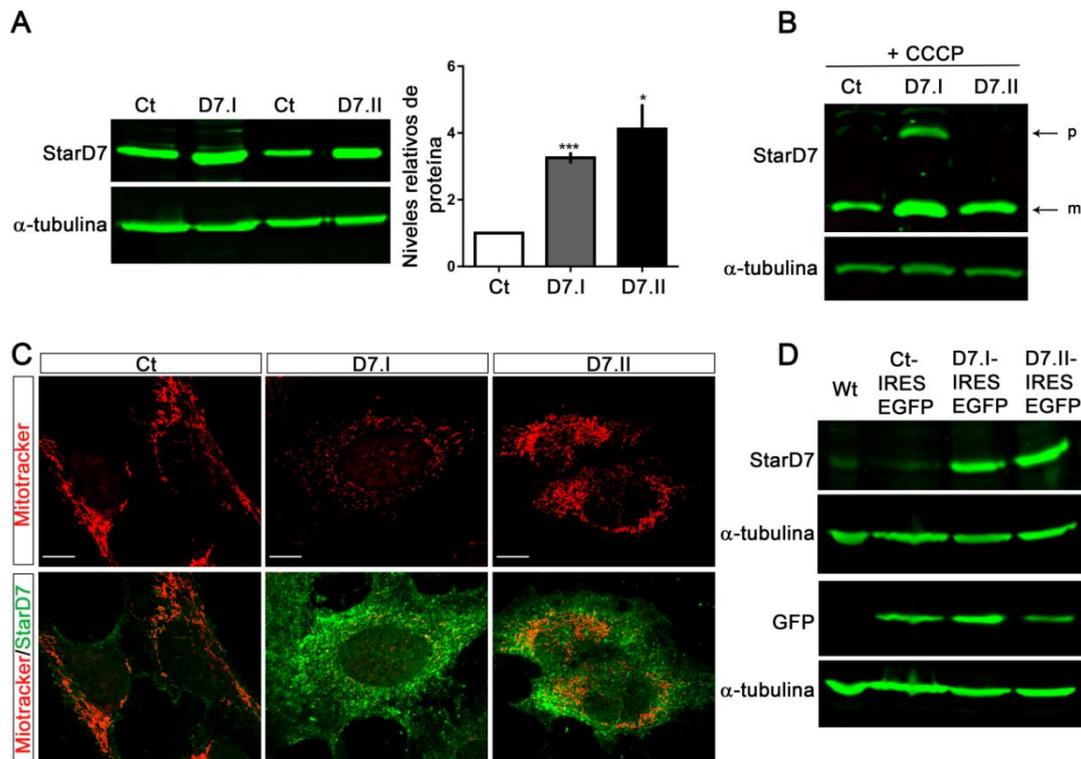


Figura 12: Expresión de StarD7 en células HTR-8/SVneo que sobre-expresan StarD7.I o StarD7.II en forma estable o transiente. (A) Western blot de extractos proteicos provenientes de células HTR-8/SVneo estables para StarD7.I (D7.I), StarD7.II (D7.II) o control (Ct) y **(B)** de células Ct, D7.I y D7.II tratadas con CCCP que muestran la isoforma precursora (p) y madura (m) de StarD7 en las células que sobre-expresan StarD7.I. El gráfico muestra la media \pm SEM de los niveles relativos de la proteína StarD7 respecto al control normalizados con α -tubulina de al menos tres experimentos independientes (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; *one sample t-test*). **(C)** Inmunofluorescencia de células Ct, D7.I y D7.II en donde se marcaron las mitocondrias con MitoTracker Deep Red (rojo) y StarD7 con anti-StarD7 (verde). Barra=10 μ m. **(D)** Western blot de células que sobre-expresan de manera transiente la proteína StarD7.I (D7.I-IRES EGFP), StarD7.II (D7.II-IRES EGFP) o el plásmido control (Ct-IRES EGFP).

1.3. El silenciamiento de StarD7 en células HTR-8/SVneo genera fragmentación mitocondrial

Para evaluar la morfología mitocondrial, las células HTR-8/SVneo transfectadas con 50 nM de siD7 o siC durante 72 h se tiñeron con el marcador mitocondrial MitoTracker Deep Red y se observaron por microscopía confocal. Los resultados muestran que la disminución de los niveles de StarD7 genera alteración de la morfología mitocondrial con un incremento en el porcentaje de células con mitocondrias fragmentadas, respecto a muestras tratadas con siC (Fig. 13A). Las células siD7 presentan una morfología tipo “donut” que es considerada un indicador de estrés metabólico (Ahmad et al., 2013). Por otra parte, la cuantificación del índice MFC (*Mitochondrial Fragmentation Count*),

considerando el número de fragmentos por área mitocondrial, mostró un aumento significativo en las células siD7 respecto a siC (Fig. 13B) (Rehman et al., 2012).

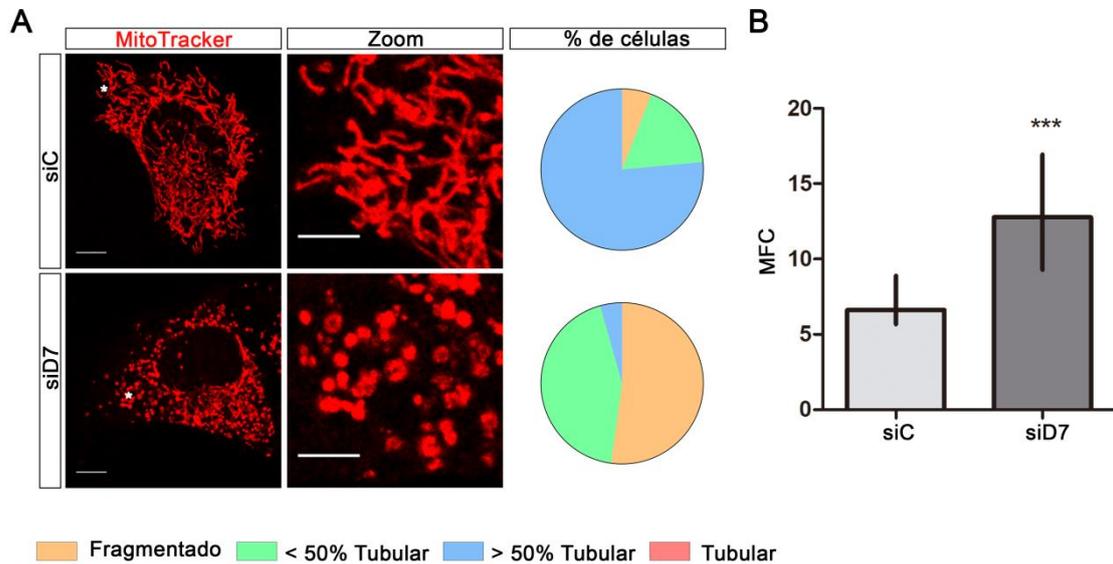


Figura 13: El silenciamiento transiente de la proteína StarD7 en células HTR-8/SVneo genera fragmentación mitocondrial. (A) Morfología mitocondrial en células HTR-8/SVneo tratadas con siD7 o siC. Las imágenes se registraron mediante microscopía confocal en células teñidas con MitoTracker Deep Red. A la derecha se muestra un segmento ampliado del área indicada (*). Los gráficos de torta representan la distribución de la morfología mitocondrial registrada para cada condición de un experimento representativo con ≥ 20 células analizadas. Las células se clasificaron cualitativamente estableciendo cuatro categorías: fragmentadas; < 50% tubulares; > 50% tubulares o tubulares. Barra panel izquierdo = 10 μm ; Barra panel derecho = 5 μm . **(B)** Cuantificación de la fragmentación mitocondrial en siC y siD7 mediante el índice MFC (*Mitochondrial Fragmentation Count*). Mediana \pm rango intercuartil de tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$, *t-test*).

El análisis de la morfología mitocondrial en las células establemente silenciadas para StarD7 (Fig. 14) reveló un incremento en el porcentaje de células con fragmentos mitocondriales (considerando la suma de las fragmentadas más <50% de tubulares) al igual que lo observado en las células tratadas con siD7. En este caso los fragmentos mitocondriales, a diferencia de las células silenciadas de manera transiente, no presentan morfología del tipo “donut”.

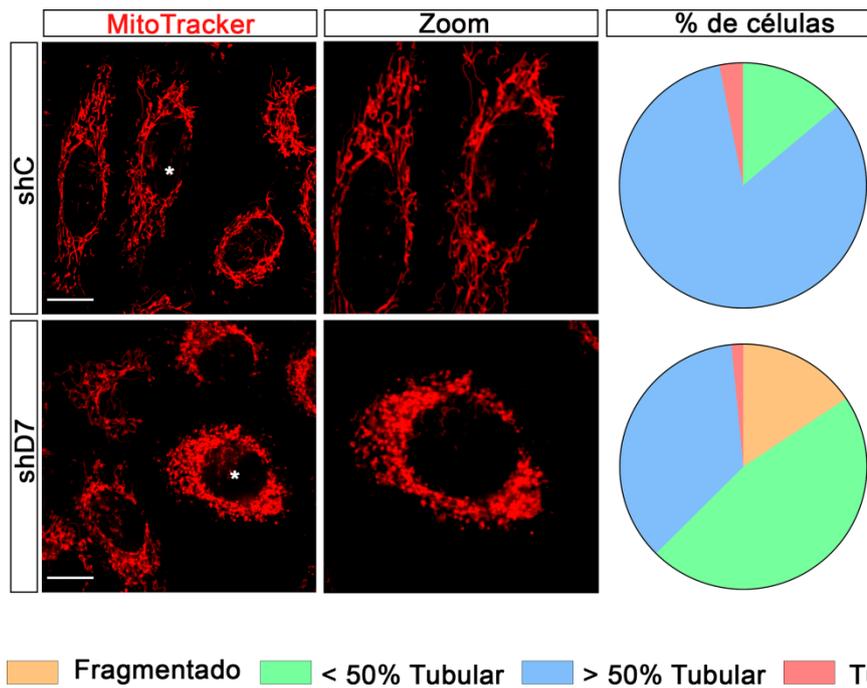


Figura 14: El silenciamiento estable de la proteína StarD7 en células HTR-8/SVneo genera fragmentación mitocondrial. Morfología mitocondrial en células HTR-8/SVneo silenciadas con shD7 o shC. Las imágenes se registraron por microscopía de epifluorescencia en células teñidas tinción MitoTracker Deep Red. A la derecha se muestra un segmento ampliado del área indicada (*). Los gráficos de torta representan la distribución de la morfología mitocondrial registrada para cada condición de un experimento representativo con ≥ 20 células analizadas. Las células se clasificaron cualitativamente estableciendo cuatro categorías: fragmentadas; < 50% tubulares; > 50% tubulares o tubulares. Barra panel izquierdo = 20 μm .

1.4. La sobre-expresión de StarD7.I en células HTR-8/SVneo genera fragmentación mitocondrial

Por otra parte, para evaluar los efectos de la sobre-expresión de StarD7 sobre la morfología mitocondrial las células HTR-8/SVneo estables para StarD7.I (D7.I), StarD7.II (D7.II) y control (Ct) se marcaron con MitoTracker Deep Red y se analizaron por microscopía confocal. Las imágenes registradas muestran un incremento en el porcentaje de células con fragmentos mitocondriales (considerando la suma de las fragmentadas más <50% de tubulares) en las células que sobre-expresan la isoforma StarD7.I comparadas con las células control, mientras que la sobre-expresión de la isoforma madura StarD7.II que carece de la secuencia de localización mitocondrial, no generó cambios significativos en la morfología mitocondrial respecto a Ct (Fig. 15A). Resultados concordantes se obtuvieron en el valor del índice MFC en las células D7.I respecto a las células control (Fig. 15B).

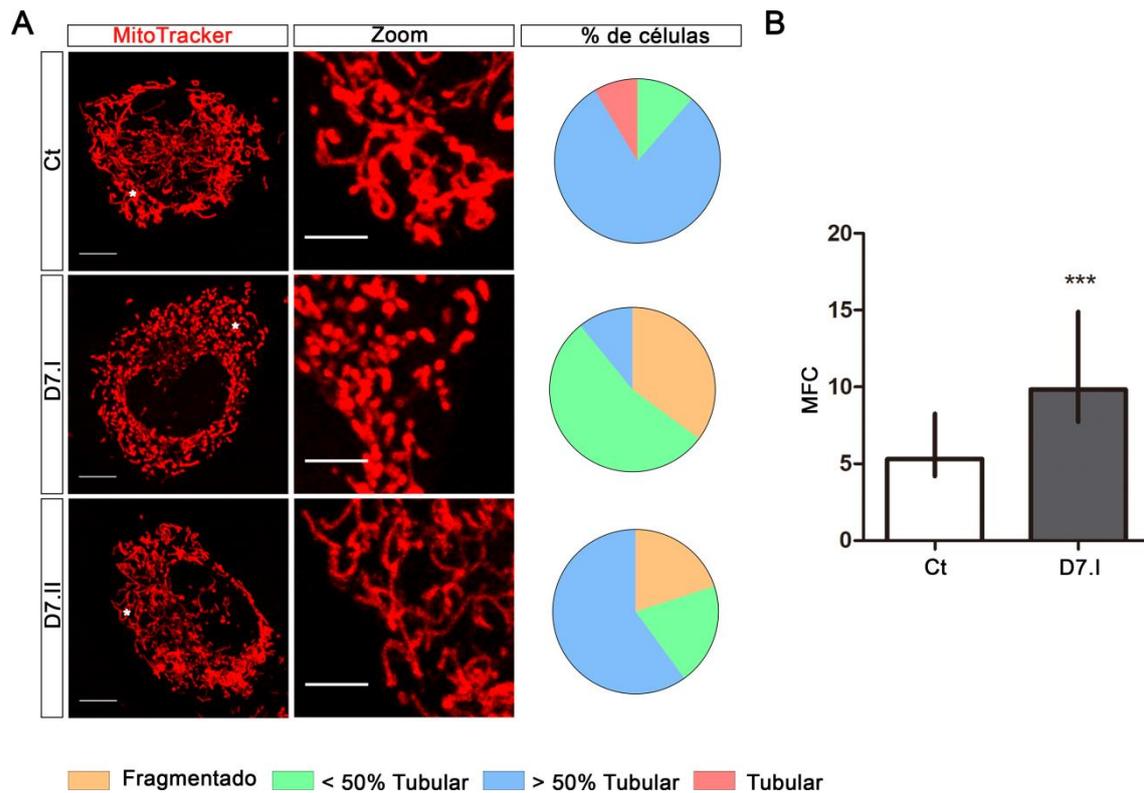


Figura 15: La sobre-expresión de StarD7.1 en células HTR-8/SVneo produce fragmentación mitocondrial. (A) Morfología mitocondrial en células HTR-8/SVneo D7.I; D7.II y Ct, un segmento ampliado del área indicada (*) se muestra a la derecha. Los gráficos de torta representan la proporción de la morfología mitocondrial registrada para cada condición de un experimento representativo con ≥ 20 células analizadas. Las células se clasificaron cualitativamente estableciendo cuatro categorías: fragmentadas; < 50% tubulares; > 50% tubulares o tubulares. Barra panel izquierdo =10 μm ; Barra panel derecho =5 μm . **(B)** Cuantificación de la fragmentación mitocondrial en D7.I y Ct mediante el índice MFC (*Mitochondrial Fragmentation Count*). Mediana \pm rango intercuartil de tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$, *t-test*).

1.5. Análisis ultraestructural de células HTR-8/SVneo que sobre-expresan StarD7.1

Se evaluó en células HTR-8/SVneo Ct y D7.I la ultraestructura celular por microscopía electrónica. Se observó una alteración en la morfología de las células D7.I respecto a Ct, con una mayor desorganización en las crestas mitocondriales (Fig. 16).

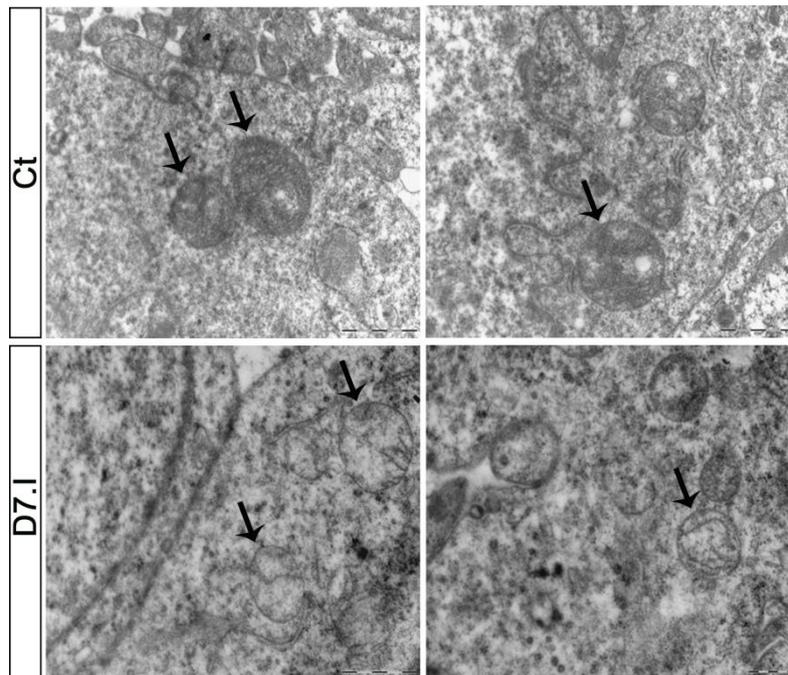


Figura 16: Microscopía electrónica de células HTR-8/SVneo D7.I y Ct. Se observó una estructura mitocondrial conservada en células Ct, mientras que las células D7.I presentaban alteración de la estructura de las crestas mitocondriales (indicado con flechas negras).

Para corroborar que el aumento de la fragmentación mitocondrial observado en las células D7.I es debido al incremento de los niveles de StarD7.I, las células transfectadas con pLenti-StarD7.I-IRES-EGFP, pLenti-StarD7.II-IRES-EGFP o pLenti-IRES-EGFP (mostrado en la Fig. 12 D) se incubaron con el marcador MitoTracker Deep Red para visualizar las mitocondrias. Los cambios en la morfología mitocondrial se evaluaron por microscopía de epifluorescencia, identificando a las células que incorporaron el plásmido como aquellas que poseían la señal GFP. Se observó que las células que sobre-expresaban StarD7.I de manera transiente presentaban un incremento en la fragmentación mitocondrial (Fig. 17) de igual modo que lo observado con la sobre-expresión estable (Fig. 15). Por otra parte, la sobre-expresión transiente de StarD7.II no modificó de manera significativa la morfología mitocondrial respecto a células Ct.

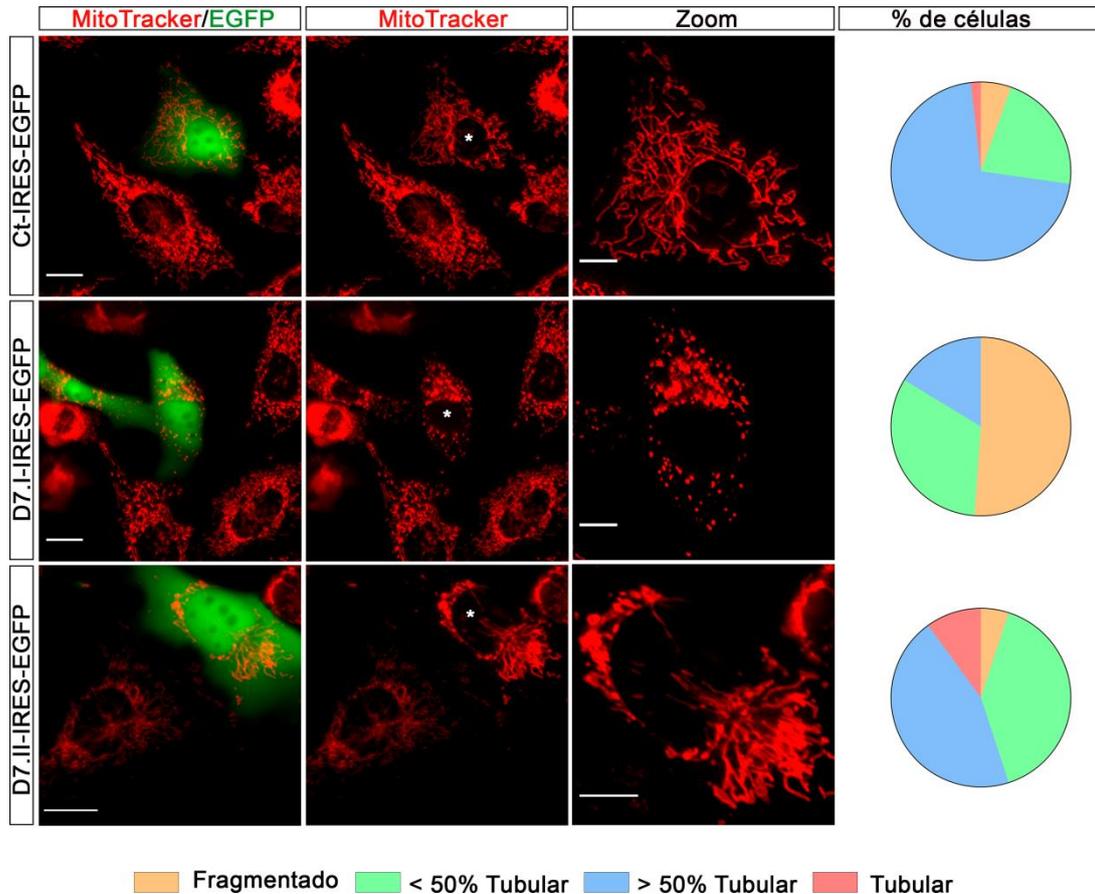


Figura 17: La sobre-expresión transiente de StarD7.I en células HTR-8/SVneo produce fragmentación mitocondrial. Morfología mitocondrial en células HTR-8/SVneo transfectadas transientemente con pLenti-StarD7.I-IRES-GFP, pLenti-StarD7.II-IRES-GFP o pLenti-IRES-EGFP (verde) y teñidas con MitoTracker Deep Red (rojo). En el panel derecho se observa una imagen aumentada de la región indicada (*). Los gráficos de torta representan la proporción de la morfología mitocondrial registrada para cada condición de un experimento representativo con ≥ 20 células analizadas. Las células se clasificaron cualitativamente estableciendo cuatro categorías: fragmentadas; < 50% tubulares; > 50% tubulares o tubulares. Resultados similares se observaron en tres experimentos independientes. Barra panel izquierdo =20 μm ; Barra panel derecho =10 μm .

En resumen, estos resultados indican que la disminución de los niveles de StarD7 ya sea de manera transiente (siD7) o estable (shD7) modifica la morfología mitocondrial de las células HTR-8/SVneo evidenciada por una mayor fragmentación mitocondrial. En el caso del silenciamiento transiente el fenotipo fragmentado es del tipo “donut”, mientras que en las células shD7 las mitocondrias fragmentadas se detectan como pequeños fragmentos aislados. Del mismo modo, la sobre-expresión estable (D7.I) o transiente (D7.I-IRES-EGFP) de la forma precursora de StarD7, la cual contiene una secuencia de

localización mitocondrial, genera un incremento en la fragmentación de las mitocondrias, que no se observa al sobre-expresar la forma madura de la proteína que carece de la señal de localización mitocondrial (D7.II/D7.II-IRES-EGFP).

1.6. Cambios en la expresión de StarD7 modifican los niveles de proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial

En base a los cambios observados en la morfología mitocondrial ante una modificación en los niveles de la proteína StarD7, se propuso evaluar si estos cambios impactan en la expresión de las proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial (PGC1 α) (Wu et al., 1999) y en los procesos de fusión (Mfn2 y Mfn1) y fisión mitocondrial (Drp1) (Chang and Blackstone, 2010; Wai and Langer, 2016). Inicialmente, se analizó la expresión de estas proteínas en extractos proteicos de células HTR-8/SVneo silenciadas durante 72 h (siD7 y siC). Se observó que la disminución de StarD7 genera disminución de las proteínas de fusión Mfn1 y Mfn2, sin diferencias significativas en los niveles de Drp1 y PGC1 α comparado con el control (siC) (Fig. 18A).

El análisis de la expresión de estas proteínas en las células HTR-8/SVneo establemente silenciadas para StarD7 (shD7) no mostró cambios en Mfn1, Mfn2 y Drp1 con disminución en los niveles de la proteína PGC1 α respecto al control (shC) (Fig. 18B)

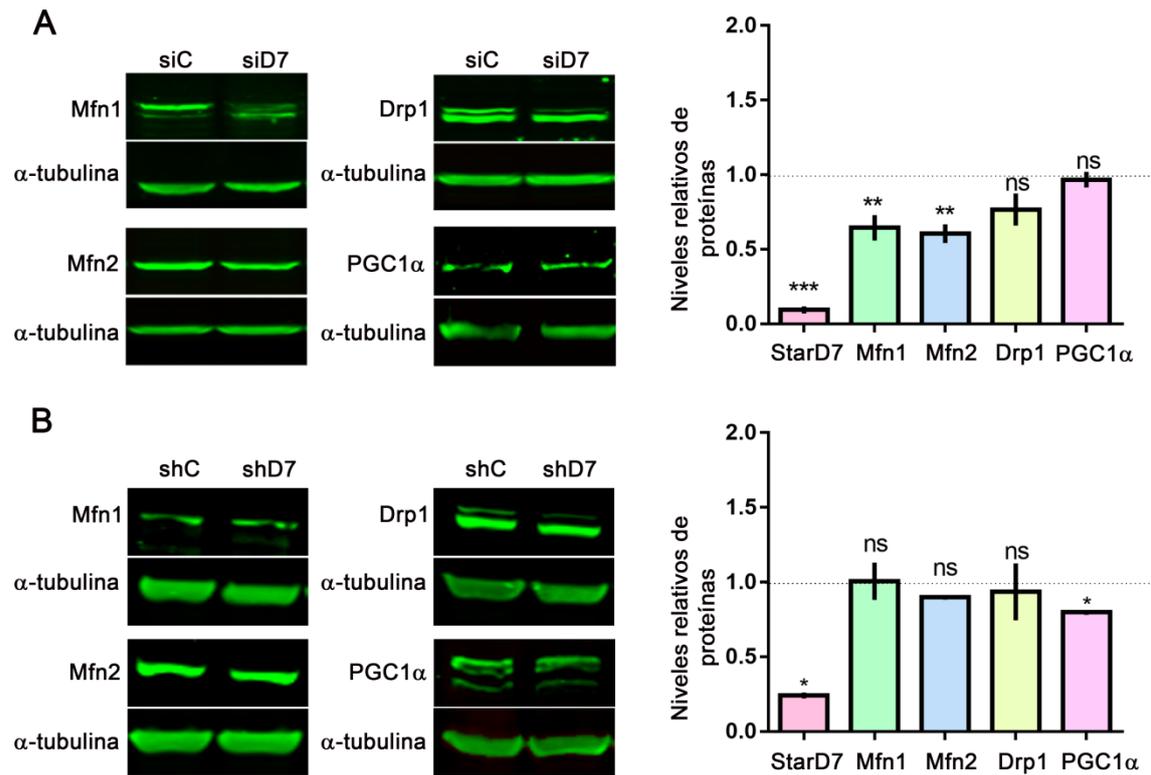


Figura 18: Expresión de Mfn1, Mfn2, Drp1 y PC1α en células HTR-8/SVneo transfectadas con siD7 o siC o establemente silenciadas. *Western blot* realizado con extractos proteicos de (A) células HTR-8/SVneo transientemente silenciadas para StarD7 (siD7) y *scrambled* (siC) y (B) células HTR-8/SVneo establemente silenciadas para StarD7 (shD7) y control (shC). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-StarD7, anti-Mfn2, anti-Mfn1, anti-Drp1 y anti-PGC1α usando como control de carga anti-α-tubulina. Los gráficos de barras muestran la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de las proteínas indicadas respecto al control normalizados con α-tubulina. Se muestra la media ± SEM de tres experimentos independientes (*p<0,05; **p<0,01, ns: no significativo, *one sample t-test*).

Por otra parte, se realizaron ensayos de *Western blot* a partir de extractos proteicos de las líneas HTR-8/SVneo que sobre-expresan establemente D7.I o D7.II y control (Ct). Se observó que el aumento en los niveles de StarD7.I produjo un incremento en los niveles proteicos de Mfn2 y Drp1, disminución de Mfn1, sin cambios en los niveles de PGC1α (Fig. 19A). Por otro lado, la sobre-expresión de StarD7.II no generó cambios en los niveles de Mfn2, Mfn1 y Drp1; sin embargo se detectó una disminución significativa en la expresión de PGC1α respecto al control (Fig. 19B).

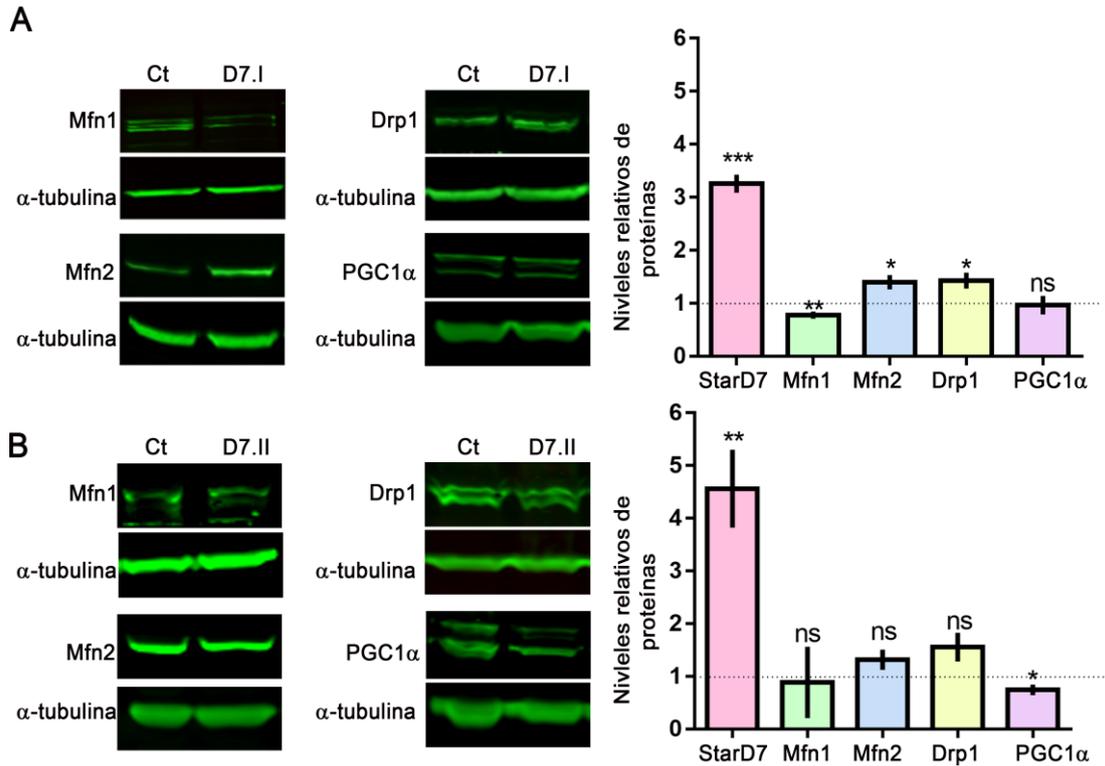


Figura 19: Expresión de Mfn1, Mfn2, Drp1 y PC1α en células HTR-8/SVneo que sobre-expresan StarD7.I y StarD7.II. Western blot realizado con extractos proteicos provenientes de células HTR-8/SVneo estables para **(A)** StarD7.I (D7.I) y **(B)** StarD7.II (D7.II) respecto a células control (Ct). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-StarD7, anti-Mfn2, anti-Mfn1, anti-Drp1 y anti-PGC1α usando como control de carga anti-α-tubulina. Los gráficos de barras representan el análisis densitométrico de los niveles de cada proteína relativos al control, definido como 1. Se muestra la media ± SEM de tres experimentos independientes (**p < 0,01; ***p < 0,001; *p < 0,05; ns: no significativo, *one sample t-test*).

Por otro lado, se analizó los niveles de los transcritos que codifican a las proteínas Mfn1, Mfn2 y Drp1 en las células HTR-8/SVneo con niveles disminuidos (siD7) o aumentados (D7.I) de StarD7. Los resultados muestran que en ambas condiciones no hubo cambios a nivel del ARNm para Mfn1 y Mfn2 (Fig. 20A y B), mientras que el transcripto de Drp1 presentó un leve aumento significativo en las células D7.I respecto a las células Ct (Fig. 20B)

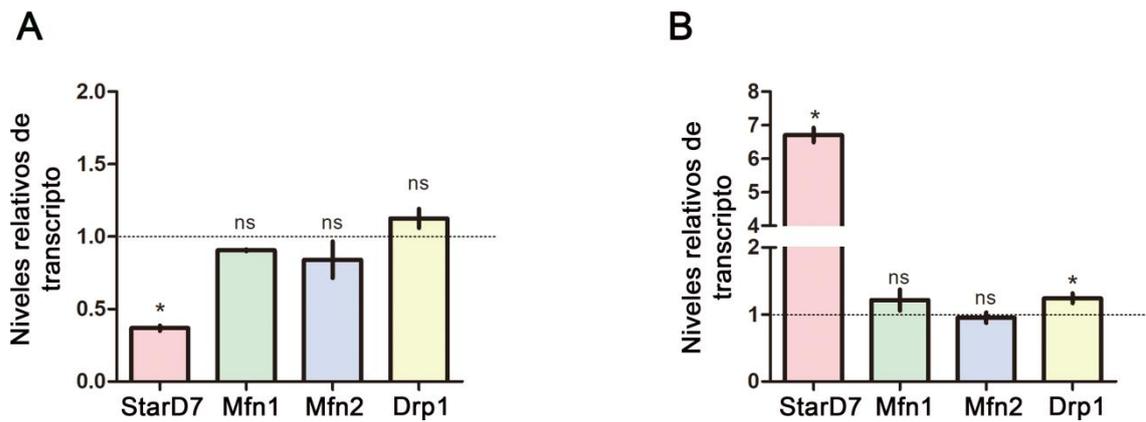


Figura 20: Expresión de StarD7, Mfn1, Mfn2 y Drp1 en células HTR-8/SVneo, analizada mediante PCR en tiempo real. Los gráficos representan los niveles relativos de los transcritpos respecto al control definido como 1 y normalizados con ciclofilina A. Expresión de los transcritpos **(A)** en células silenciadas durante 72h (siD7) y control (siC) y **(B)** en células estables para StarD7.I (D7.I) y control (Ct). Los valores representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; ns: no significativo, *one-sample t-test*).

1.7. Las mitocondrias de células HTR-8/SVneo que sobre-expresan StarD7 pueden realizar fusiones transientes

Considerando que la proteína Mfn1 está involucrada en los procesos de fusión mitocondrial y que las células HTR-8/SVneo D7.I presentan una disminución en su expresión, resultó de interés evaluar si las mitocondrias que se encontraban fragmentadas eran capaces de fusionar de manera transiente. Para esto, las células D7.I y Ct se transfectaron con los plásmidos DsRed-mito y mito-PAGFP. Las células se analizaron por microscopía confocal 48 h después de la transfección. La activación del láser se aplicó a una región de interés en varias células y la señal de la proteína fluorescente GFP de diferentes mitocondrias fotoactivadas se registró durante 30 min. El área correspondiente a la señal fotoactivada del plásmido mito-PAGFP se relativizó al área mitocondrial total correspondiente a la señal del plásmido DsRed-mito. Los resultados indican que células D7.I si bien poseen un mayor porcentaje de mitocondrias fragmentadas, éstas son capaces de realizar fusiones transientes evidenciadas por la difusión de la señal fluorescente desde la región inicial de fotoactivación hacia mitocondrias adyacentes no fotoactivadas a lo largo de 30 min (Fig. 21A). Se observaron incrementos similares en el área de distribución de la señal fluorescente respecto al área inicial fotoactivada tanto en las células Ct como en las D7.I (Fig. 21B). Se muestra un evento puntual de fusión en el tiempo registrado en las células D7.I, en donde se

visualiza el intercambio de la señal fotoactivada a través de un evento de fusión mitocondrial (Fig. 21C). Estos resultados sugieren que el incremento en la fragmentación mitocondrial inducida por la sobre-expresión de StarD7.1 no es debido a una pérdida de fusión mitocondrial, sino a un desbalance en el proceso de fisión/fusión.

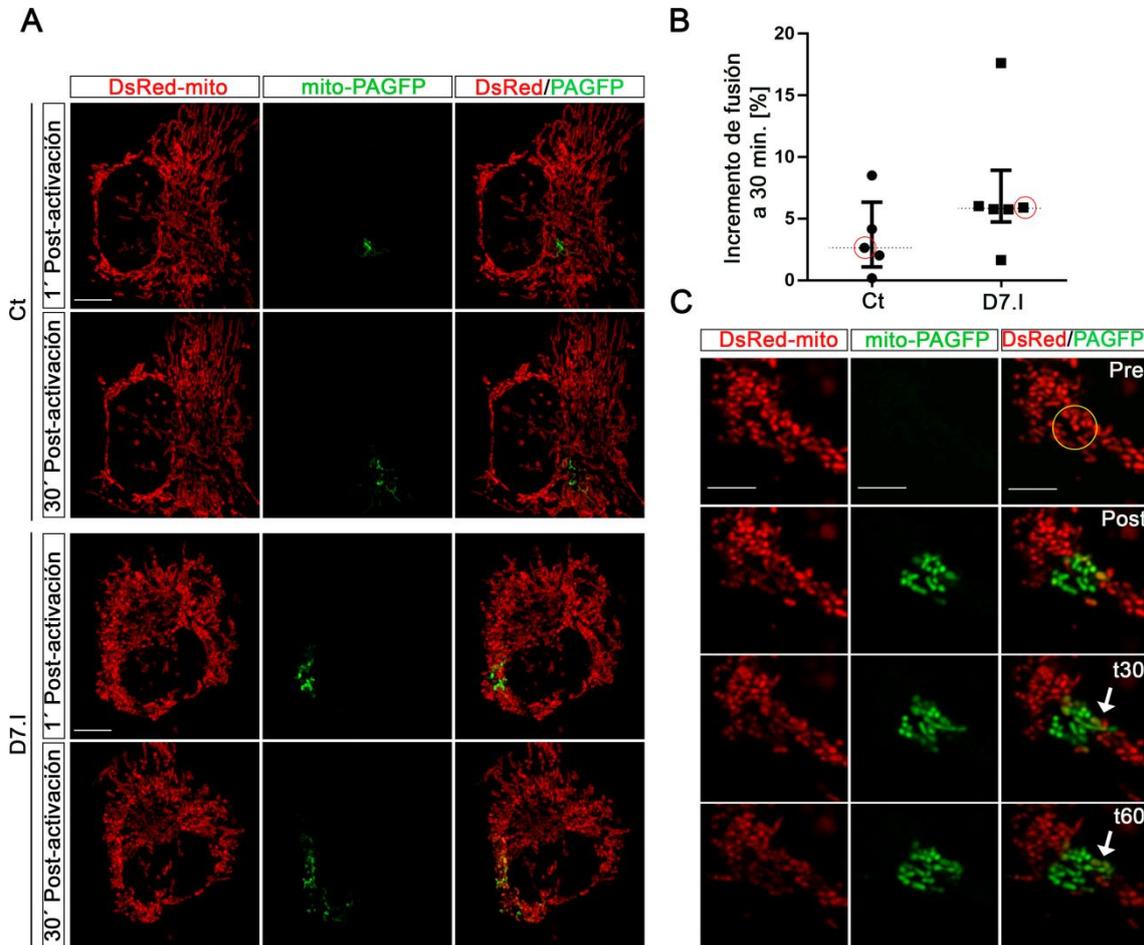


Figura 21: Fusión mitocondrial en las células HTR-8/SVneo Ct y D7.1. (A) Células HTR-8/SVneo Ct y D7.1 que expresan los plásmidos DsRed-mito (rojo) y mito-PAGFP (verde) se fotoactivaron en una región de interés. Las señal fluorescente en las mitocondrias fotoactivadas se evaluó por microscopía confocal 1 min post activación (tiempo inicial) y luego de 30 min. Barra= 10 μ m. **(B)** Incremento de la fusión mitocondrial a los 30 min, expresado como porcentaje del área activada respecto al área inicial. Los valores del gráfico representan la mediana \pm rango intercuartil correspondiente a D7.1 (n=6) y a Ct (n=6). Los círculos rojos indican el valor de fusión de las células mostradas en la imagen A para cada condición. **(C)** Las mitocondrias marcadas con mito-PAGFP fotoactivadas se evaluaron durante 60 min (t60). La flecha indica el evento de fusión. Barra= 5 μ m.

En conjunto estos datos indican que la deficiencia de StarD7 en células HTR-8/SVneo produce una disminución en los niveles de las proteínas de fusión Mfn1 y Mfn2, mientras que no modifica los niveles de Drp1. Por otra parte, el aumento en los niveles de StarD7.1 disminuye la expresión de Mfn1 y aumenta los niveles de Mfn2 y Drp1, con

un incremento en el transcripto que codifica a Drp1. Además, se estableció que las mitocondrias de las células D7.I son capaces de realizar fusiones transientes. Estos resultados sugieren que el incremento en la fragmentación observada en estas células no está dado por un impedimento en el proceso de fusión mitocondrial sino que puede ser debido a un incremento en la fisión mitocondrial mediada por Drp1.

1.8. La sobre-expresión de StarD7.I no induce cambios en la localización celular de Drp1

Como se mencionó en la introducción, la proteína citósolica Drp1 transloca a la membrana mitocondrial en respuesta a señales específicas e inicia el proceso de fisión mitocondrial a través de la hidrólisis de GTP (Chang and Blackstone, 2010).

Considerando que la fragmentación observada en células HTR-8/SVneo D7.I no está dada por un impedimento en la fusión mitocondrial ya que estas células son capaces de realizar fusiones transientes (Fig. 21B), se decidió indagar si el aumento de Drp1 a nivel de transcripto y proteína observado en células D7.I (Fig. 19A y 20B) se acompaña con un cambio en la localización de esta proteína. Para esto, las células se tiñeron con MitoTracker Deep Red y realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Las imágenes registradas por microscopía confocal indican que las señales detectadas mediante inmunotinción para Drp1 y MitoTracker en las células D7.I fueron similares a las observadas en las células control (Ct) (Fig. 22). Los gráficos registrados en los canales verde y rojo muestran perfiles similares en las células D7.I y Ct, sugiriendo que la fragmentación mitocondrial detectada en las células D7.I es independiente de cambios en la localización de Drp1.

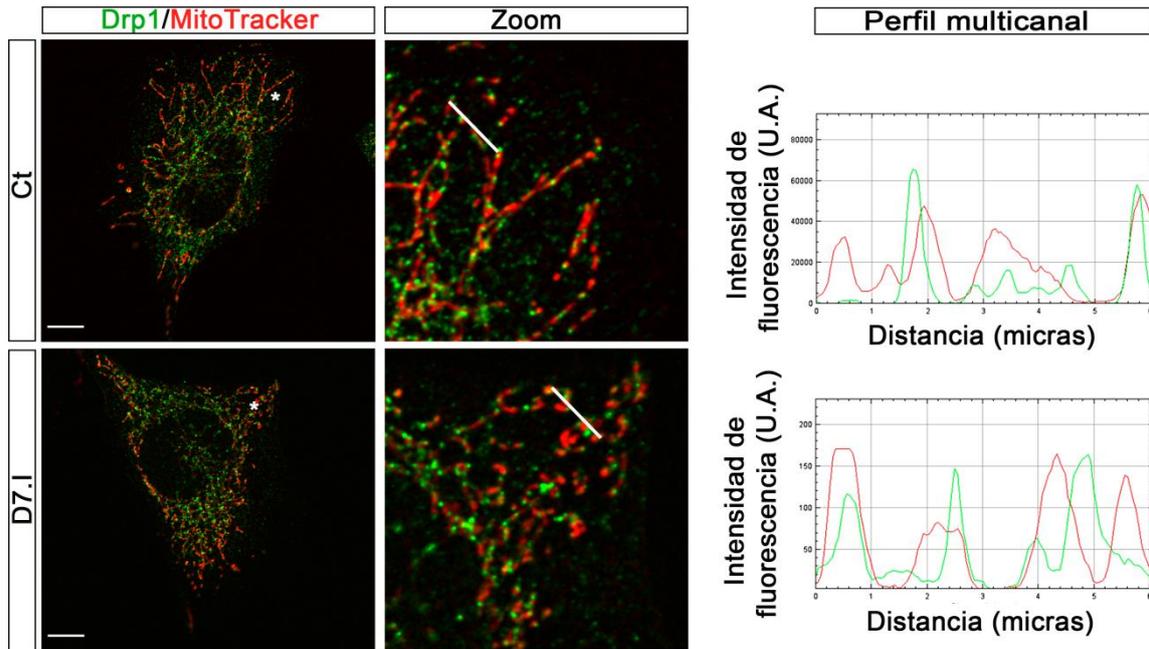


Figura 22: Imágenes de microscopía confocal de Drp1 en células HTR-8/SVneo Ct y D7.I. Se muestran imágenes representativas de ensayos de inmunofluorescencia para Drp1 utilizando un anticuerpo anti-Drp1 (verde) junto con MitoTracker Deep Red (rojo) para marcar mitocondrias. El panel central muestra una imagen aumentada del sector indicado (*) de cada condición. Barra=10 μ m. El gráfico muestra el perfil multicanal de la intensidad de fluorescencia para la señal roja (MitoTracker) y para la señal verde (Drp1) de la región indicada con la línea blanca.

1.9. La morfología mitocondrial en células que sobre-expresan StarD7.I es dependiente de la actividad GTPasa de Drp1

Drp1 es una proteína con actividad GTPasa que presenta modificaciones postraduccionales que modulan su actividad tales como fosforilaciones, ubiquitinaciones y SUMOilaciones (Van der Bliek et al., 2013). Con el fin de establecer si el incremento en la fragmentación mitocondrial observado en las células D7.I es dependiente de la actividad GTPasa se transfectaron de manera transiente células D7.I con una versión dominante negativa de Drp1 para el sitio de unión a GTP (pDrp1K38A) y se evaluó si las mitocondrias fragmentadas recuperaban la morfología mitocondrial. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para Drp1 en células D7.I transfectadas con pDrp1K38A y se marcaron las mitocondrias con MitoTracker Deep Red. Las imágenes registradas por microscopía confocal muestran que las células D7.I que incorporaron el plásmido, evidenciado por la expresión de GFP, revirtieron el fenotipo mitocondrial fragmentado dado por la sobre-expresión de StarD7.I, originando mitocondrias hiperfusadas con agregados perinucleares (Fig. 23 panel inferior).

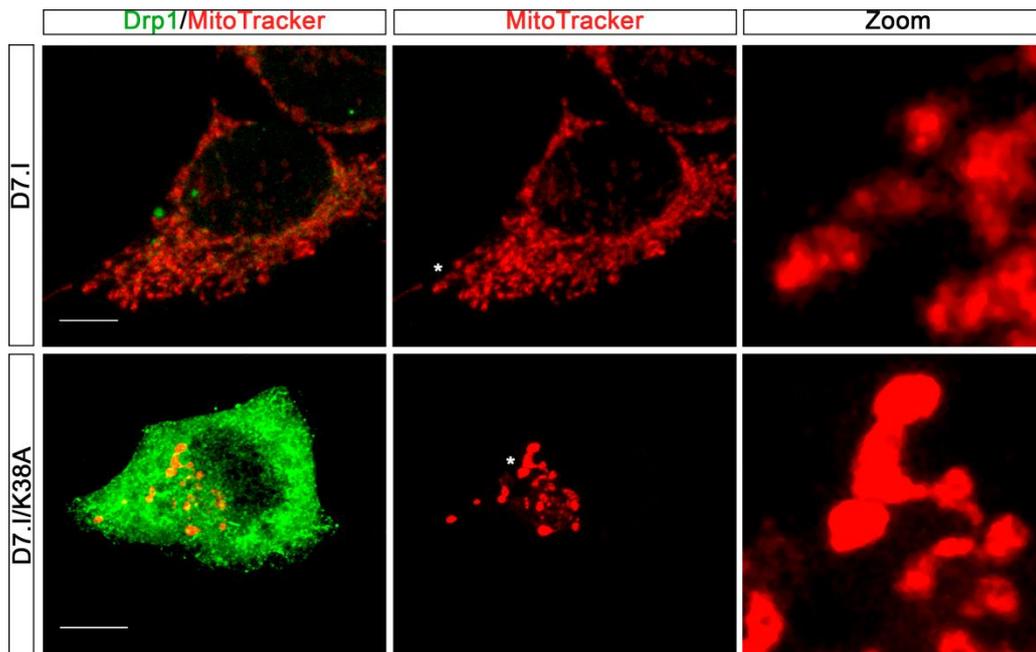


Figura 23: La morfología mitocondrial en células D7.I es dependiente de la actividad GTPasa de Drp1. Imágenes representativas de ensayos de inmunofluorescencia en células D7.I transfectadas (**panel inferior**) o no (**panel superior**) con el plásmido Drp1K38A. Los ensayos de inmunofluorescencia fueron visualizados por microscopía confocal utilizando el anticuerpo anti-Drp1 (verde) para evaluar los niveles de Drp1 y MitoTracker Deep Red (rojo) para visualizar la morfología mitocondrial. El panel derecho muestra una imagen aumentada del sector indicado (*) de cada condición. Barra= 5 μ m.

Entre las modificaciones postraduccionales que presenta Drp1, la fosforilación de la Ser616 promueve la fisión mitocondrial a través del reclutamiento de Drp1 a la MME. Por otro lado, la fosforilación en la Ser637 inhibe la actividad GTPasa reduciendo la fisión y llevando a un fenotipo mitocondrial tubular (Chang and Blackstone, 2007).

Para investigar si la fosforilación de la Ser637 de Drp1 está involucrada en la fragmentación mitocondrial observada en células HTR-8/SVneo D7.I, se transfectó de forma transiente la línea celular D7.I con un plásmido cuya mutación impide que se fosforile la Ser637 (pEGFP-Drp1-S637A) o con un plásmido que codifica a una forma fosfomimética S637D (pEGFP-Drp1-S637D). Los dos plásmidos expresan la proteína GFP que permite identificar las células que lo incorporan. Las células D7.I transfectadas se marcaron con MitoTracker Deep Red y se analizaron mediante microscopía de epifluorescencia. Las imágenes registradas muestran que las células que incorporaron el plásmido EGFP-Drp1-S637A no presentaron cambios en la morfología mitocondrial (Fig. 24 panel superior), mientras que las que células que incorporaron el plásmido que

codifica a la mutante fosfomimética S637D recuperaron la conectividad mitocondrial produciendo agregados mitocondriales perinuclear (Fig. 24 panel inferior).

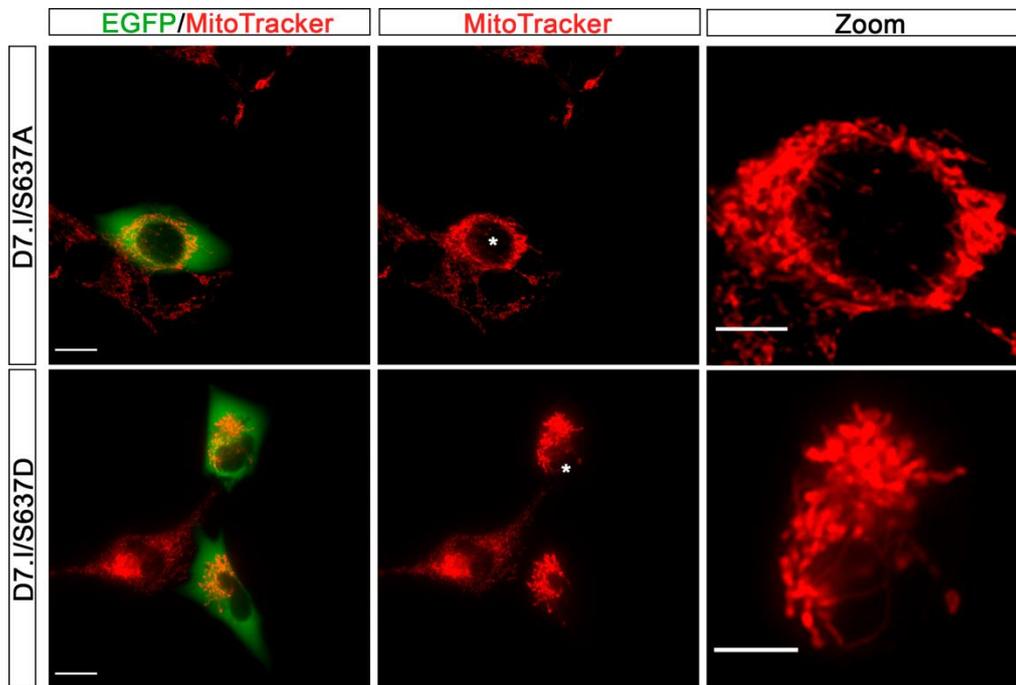


Figura 24: La morfología mitocondrial en células D7.I es dependiente de la fosforilación de la S637 de Drp1. Imágenes representativas de ensayos de inmunofluorescencia en células D7.I transfectadas con pEGFP-Drp1-S637A (**panel superior**) o con pEGFP-Drp1-S637D (**panel inferior**). Los ensayos de inmunofluorescencia fueron observados por microscopía de epifluorescencia utilizando MitoTracker Deep Red (rojo) para visualizar mitocondrias. El panel derecho muestra una imagen aumentada del sector indicado (*) de cada condición. Barra=20 μ m.

Estos resultados indican que la fragmentación mitocondrial observada en células HTR-8/SVneo D7.I es dependiente de la actividad de Drp1, la cual al ser inhibida mediante la incorporación del plásmido Drp1K38A dominante negativo para la unión de GTP o del plásmido EGFP-Drp1-S637D que imita la fosforilación en la serina 637, revierte el fenotipo fragmentado originado por la sobre-expresión de StarD7.I.

II. CONTRIBUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE StarD7 EN LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL

2.1. La deficiencia de StarD7 incrementa los niveles de las especies reactivas de oxígeno sin afectar el potencial de membrana

Las ERO comprenden especies de oxígeno radicales y no radicales producidas por una reducción parcial del oxígeno. Tanto una producción aumentada de ERO como un sistema antioxidante deteriorado pueden inclinar el equilibrio redox de la célula hacia un estado oxidativo con un incremento en los niveles de ERO tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo el óxido nítrico (NO), entre otros (Böttinger et al., 2012). Como se sabe, las mitocondrias representan uno de los principales contribuyentes a la generación de las ERO, donde los complejos I y III son las principales fuentes de las ERO tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y son necesarias para procesos biológicos como la diferenciación y proliferación celular, la detección de oxígeno y la activación del factor inducible por hipoxia (HIF) (Brillo et al., 2021). De hecho, una fuente de radicales libres es la OXPPOS que por la fuga de electrones en la ETC mitocondrial desencadena la producción de O_2^- (Misrani et al., 2021; Ray et al., 2012), que causa daño oxidativo a proteínas y al ADN, lo que lleva al desarrollo de patologías degenerativas y de envejecimiento biológico (Federico et al., 2012). Además, la participación de las ERO en la modulación de la dinámica mitocondrial sugiere la existencia de un vínculo entre la homeostasis redox de la célula y la regulación de la morfología mitocondrial (Willems et al., 2015).

En base a esta información se decidió evaluar si las modificaciones en la morfología mitocondrial observadas en las células deficientes de StarD7 están asociadas a estrés oxidativo, analizando por citometría de flujo los niveles de ERO totales en células silenciadas de manera transiente (siC y siD7) o estable (shCt y shD7). Para esto, las células se incubaron con H2DCFDA, que atraviesa la membrana plásmica, la cual es clivada por esterasas y en presencia de ERO es oxidada generando DCF que es altamente fluorescente. Además, se midieron las ERO mitocondriales utilizando la sonda MitoSOX, que ingresa a la célula y reacciona con los superóxidos mitocondriales. Los resultados indican que las células siD7 producen mayores niveles de ERO totales en comparación a siC (Fig. 25A, panel superior), mientras que los niveles de ERO mitocondriales mostraron

una tendencia a incrementar respecto al control, que no resultó estadísticamente significativa (Fig. 25A, panel inferior). En el caso de las células silenciadas establemente las ERO no mostraron diferencias respecto al control tanto para las especies totales como para las mitocondriales (Fig. 25B).

Por otra parte, se midió en las células silenciadas el $\Delta\Psi_m$ como un indicador de la actividad mitocondrial. Las células se marcaron con JC-1 y se evaluaron por citometría de flujo. Este compuesto exhibe una acumulación dependiente del $\Delta\Psi_m$ indicada por un cambio de emisión de fluorescencia de verde a roja cuando las células poseen un $\Delta\Psi_m$ saludable. Los resultados indican que la disminución de StarD7 ya sea transiente (Fig. 25 C, panel medio) o estable (Fig. 25C, panel derecho) no genera cambios en el $\Delta\Psi$. Como control positivo del ensayo se disrumpió el $\Delta\Psi_m$ utilizando el compuesto CCCP.

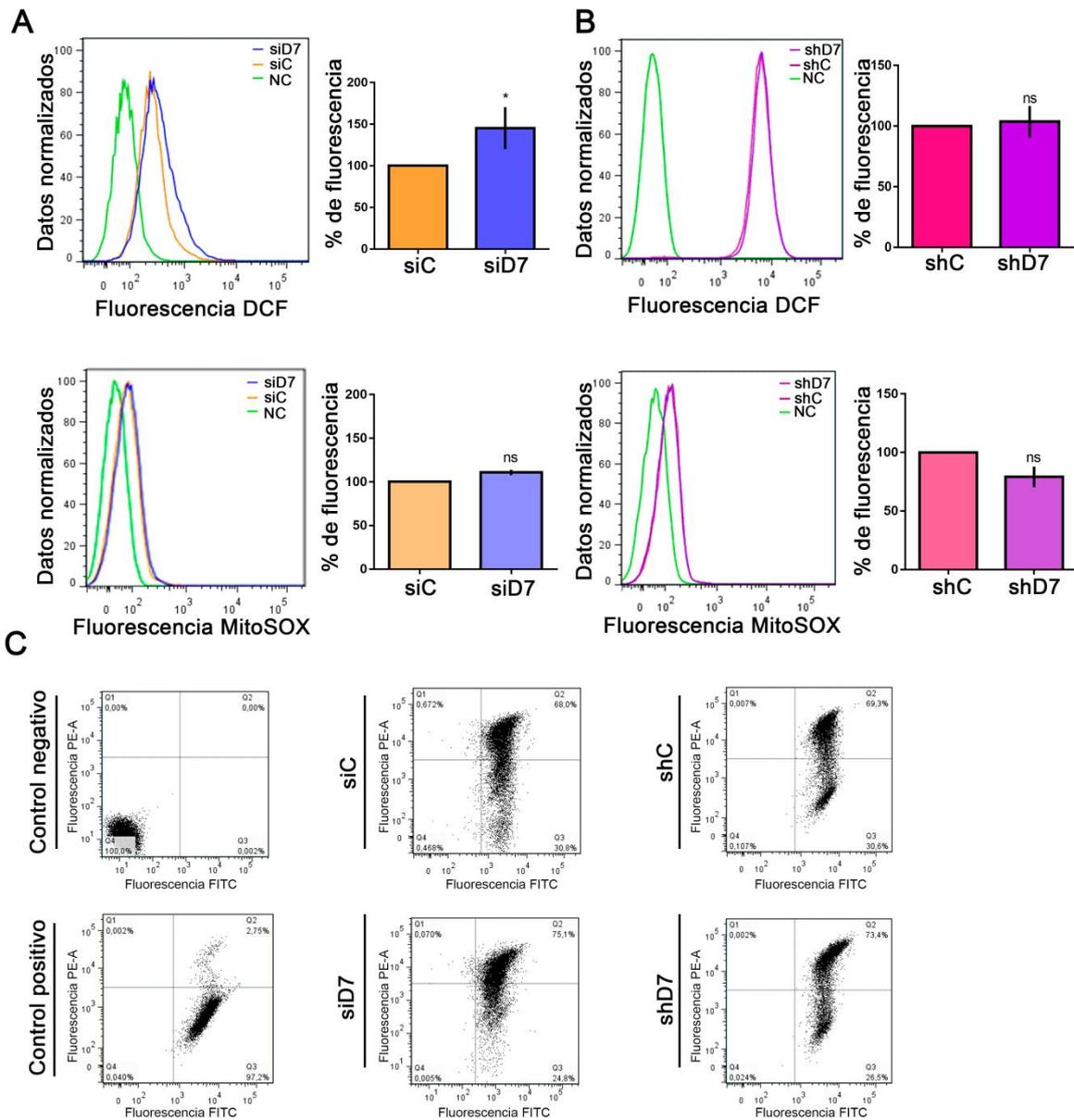


Figura 25: Las células con niveles disminuidos de StarD7 incrementan los niveles de ERO sin afectar el potencial de membrana. Determinación de ERO totales (H2DCFDA) y mitocondriales (MitoSOX) **(A)** en células HTR-8/SVneo siC y siD7 o **(B)** en células HTR-8/SVneo shC y shD7 mediante citometría de flujo. Los gráficos de barra representan el resultado de tres experimentos independientes y muestran la intensidad de fluorescencia media (Media \pm SEM) relativa al control definido como 100 % (ns= no significativo; * $p < 0,05$, one-sample t-test. NC: células sin marca. **(C)** Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en células que presentan niveles disminuidos de StarD7 (siD7 y shD7) y sus respectivos controles (siC y shC) evaluado por citometría de flujo utilizando JC-1. Se muestra el resultado de un experimento representativo. Control negativo: células sin marca. Control positivo: células tratadas con 50 μ M de CCCP.

2.2. La sobre-expresión de StarD7.I disminuye los niveles de las ERO totales sin alterar el potencial de membrana

A continuación, se midieron las ERO totales y mitocondriales en las células que sobre-expresan establemente la isoforma StarD7.I (D7.I) y su control (Ct). Se observó una disminución en las ERO totales evaluadas por la señal fluorescente DCF en células D7.I respecto a Ct (Fig. 26A) mientras que no se detectaron cambios en los niveles de las ERO mitocondriales cuantificadas por MitoSOX (Fig. 26B).

Por otra parte, no se observaron cambios en el $\Delta\Psi_m$ en células D7.I (Fig. 26C) medido por citometría de flujo utilizando la sonda JC-1, compuesto que presenta un incremento en la fluorescencia verde dependiente del $\Delta\Psi_m$. Estos resultados indican que las células que sobre-expresan la isoforma StarD7.I si bien poseen un fenotipo mitocondrial fragmentado no tienen un defecto bioenergético detectable.

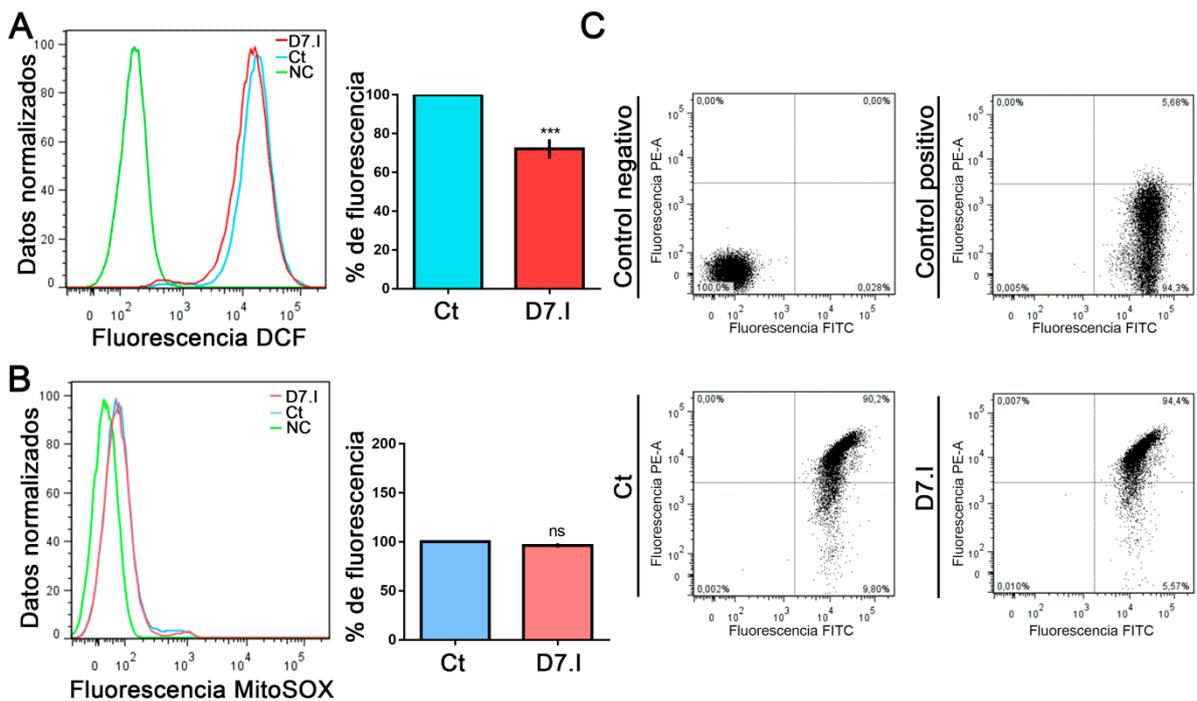


Figura 26: La sobre-expresión de StarD7.I disminuye los niveles de ERO totales sin alterar el potencial de membrana. Determinación de (A) ERO totales (H2DCFDA) y (B) mitocondriales (MitoSOX) en células HTR-8/SVneo Ct y D7.I. Los gráficos de barra representan el resultado de tres experimentos independientes y muestran la intensidad de fluorescencia media (Media \pm SEM) relativa al control definido como 100% (ns= no significativo; *** $p < 0,001$, *one-sample t-test*). NC: células sin marca. (C) $\Delta\Psi_m$ en células Ct y D7.I evaluado por citometría de flujo utilizando JC-1. Se muestra el resultado de un experimento representativo. Control negativo: células sin marca. Control positivo: células tratadas con 50 μ M de CCCP.

2.3. La sobre-expresión de StarD7.I no modifica los niveles de ATP

Las mitocondrias son la fuente principal de producción de energía celular mediante la OXPHOS y un daño en la estructura de las mismas, principalmente en los complejos de la ETC puede reducir el aporte de ATP y contribuir a una pérdida de energía y a la disfunción mitocondrial (Verschueren et al., 2019). Por ello resulta importante evaluar el estado energético de las células D7.I para determinar si el cambio en la morfología mitocondrial observada está impactando en la función mitocondrial. La cuantificación de los niveles de ATP en las células que sobre-expresan StarD7 se realizó en células crecidas en DMEM con 25 mM de glucosa o con 25 mM de galactosa (que fuerza a la célula a generar ATP a través de la OXPHOS). La Figura 27 muestra ensayos realizados en ambas condiciones experimentales utilizando diferentes cantidades de células iniciales. No se detectaron cambios en los niveles de ATP en las células D7.I en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas respecto a las células control (Ct)

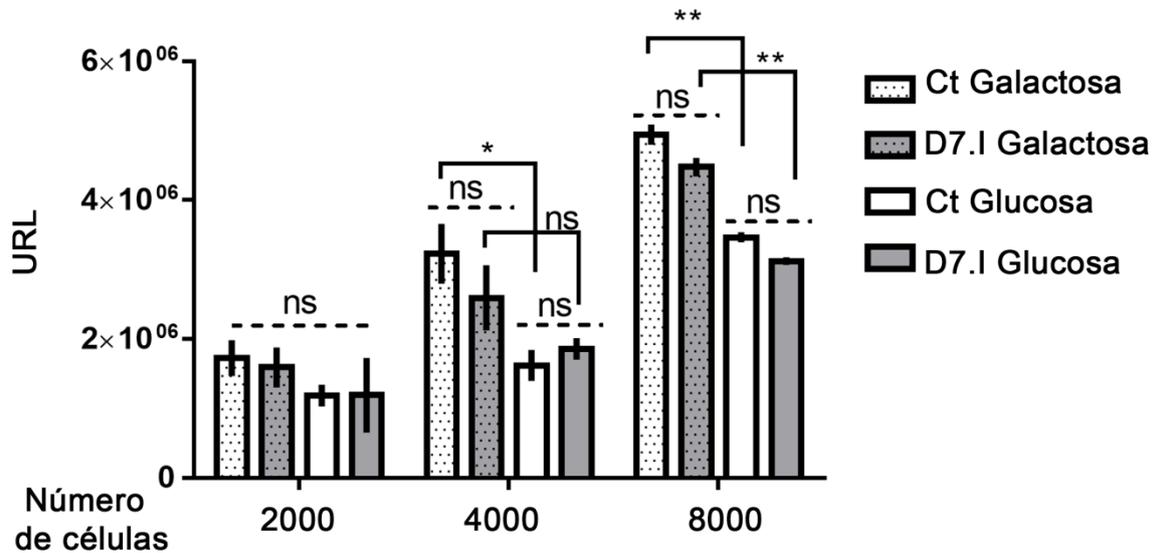


Figura 27: Las células que sobre-expresan StarD7.I no presentan cambios en los niveles de ATP. Cuantificación de los niveles de ATP a partir de diferente número de células HTR-8/SVneo Ct y D7.I cultivadas en medio con 25 mM de glucosa o galactosa. El gráfico de barra representa el resultado expresado en unidades arbitrarias de tres experimentos independientes (Media ± SEM). La significancia estadística fue evaluada por *one way*-ANOVA (**p < 0,01; *p < 0,05; ns: no significativo).

2.4. Las células HTR-8/SVneo que sobre-expresan StarD7.1 transportan mayores niveles de PC a la mitocondria

A continuación se evaluó si las células que sobre-expresan la proteína StarD7.1 son capaces de transportar PC a la mitocondria como se reportó en otras líneas celulares (Horibata et al., 2016; Saita et al., 2018). Para esto, las células D7.1 y Ct se trataron con BODIPY-FL-C5-HPC y PC y se tiñeron con MitoTracker Deep Red. La distribución de la fluorescencia del análogo de PC se examinó por microscopía confocal. Las imágenes registradas indican que las células D7.1 presentan mayor intensidad en la señal de PC fluorescente en las mitocondrias que las células Ct (Fig. 28A). La cuantificación de la fluorescencia de PC mitocondrial y de la fluorescencia de PC mitocondrial relativa al área mitocondrial en células D7.1 fue mayor que la medida en células Ct (Fig. 28B). Este resultado indica fuertemente que las células que sobre-expresan la isoforma StarD7.1 transportan mayores niveles de PC a la mitocondria.

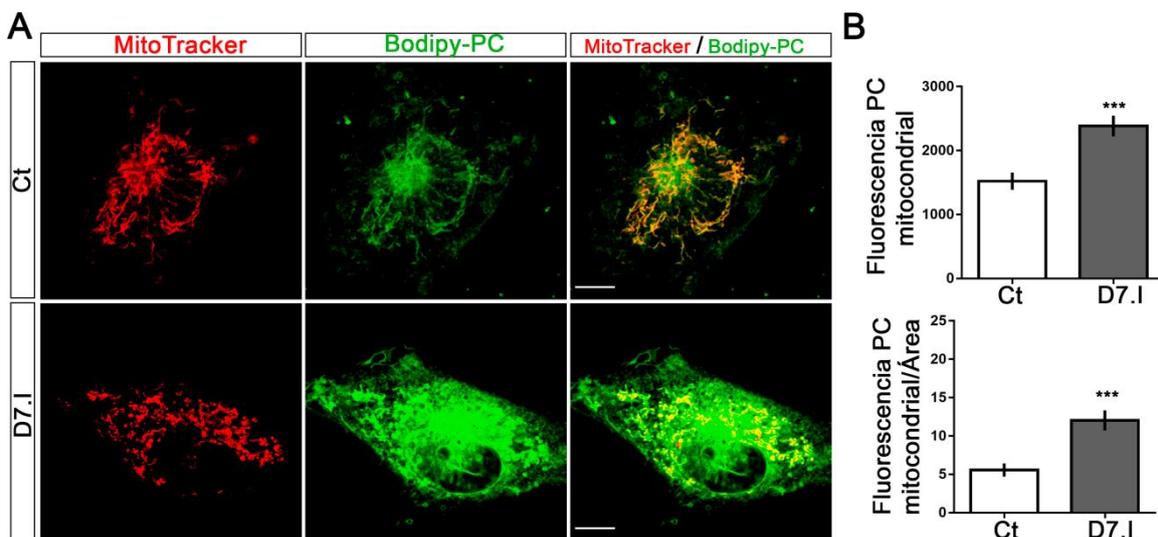


Figura 28: Las células HTR-8/SVneo que sobre-expresan StarD7.1 transportan mayores niveles de PC a la mitocondria. (A) Localización intracelular de PC fluorescente incorporado a las células D7.1 y Ct. Las células se incubaron con MitoTracker Deep Red (rojo) y vesículas lipídicas conteniendo BODIPY-FL-C5-HPC (verde) + PC y se analizaron por microscopía confocal. Barra= 10 μ m. **(B)** Los gráficos representan la cuantificación de los datos obtenidos en las células D7.1 (n=38) y Ct (n=42) expresados como la media de la fluorescencia de PC mitocondrial (gráfico superior) y la media de la fluorescencia de PC mitocondrial relativa al área mitocondrial (gráfico inferior). La significancia estadística de tres experimentos independientes se evaluó por Mann Whitney (***) $p < 0,001$.

En resumen, estos resultados demuestran que la disminución transiente de los niveles de StarD7 produce un aumento de ERO totales, mientras que el silenciamiento estable no produce estrés oxidativo. En ambos casos no hay cambios en el $\Delta\Psi_m$.

Por otra parte, la sobre-expresión de StarD7 aumenta los niveles de PC mitocondrial, disminuye los niveles de ERO totales pero no afecta las ERO mitocondriales y no produce cambios en el $\Delta\Psi_m$. Estas células si bien presentan mitocondrias principalmente fragmentadas no poseen cambios en los niveles de ATP.

III. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE StarD7 EN OTROS PROCESOS CELULARES MEDIADOS POR LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Previamente, se reportó que la depleción transiente de la proteína StarD7 en las células trofoblásticas JEG-3 conduce a una disminución en la proliferación y migración celular polarizada (Flores-Martín et al., 2012). Considerando que las mitocondrias son necesarias para el correcto funcionamiento celular ya que proveen la energía necesaria para los distintos procesos celulares (Bulthuis et al., 2019), se propuso evaluar si las células HTR-8/SVneo D7.I que sobre-expresan StarD7.I presentan cambios en la proliferación y migración celular.

3.1. La sobre-expresión de StarD7.I no genera cambios en la proliferación celular

Con el propósito de analizar el impacto de la sobre-expresión de StarD7 en la proliferación celular, se evaluó la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) al ADN de células que se encuentran en replicación (en fase S). La cantidad de BrdU incorporada se midió por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-bromodeoxiuridina. No se observaron cambios en el número de núcleos en proliferación (rojo, BrdU-positivos) respecto al total de núcleos teñidos con Hoechst (azul) en las células D7.I respecto a las células Ct (Fig. 29A). La cuantificación del ensayo de proliferación se expresó como porcentaje de núcleos en proliferación de las células D7.I respecto al control (Fig. 29B).

Por otra parte, se evaluó la proliferación celular contabilizando en cámara de Neubauer células crecidas durante 5 días en DMEM sin glucosa con 25 mM de dextrosa o en DMEM sin glucosa con 25 mM de galactosa suplementado en ambos casos con SFB

10%. Se creció en galactosa para forzar la producción de ATP vía OXPHOS. No se detectaron diferencias significativas en la proliferación en las células D7.I respecto a las células Ct tanto cuando fueron crecidas en dextrosa como en galactosa (Fig. 29C).

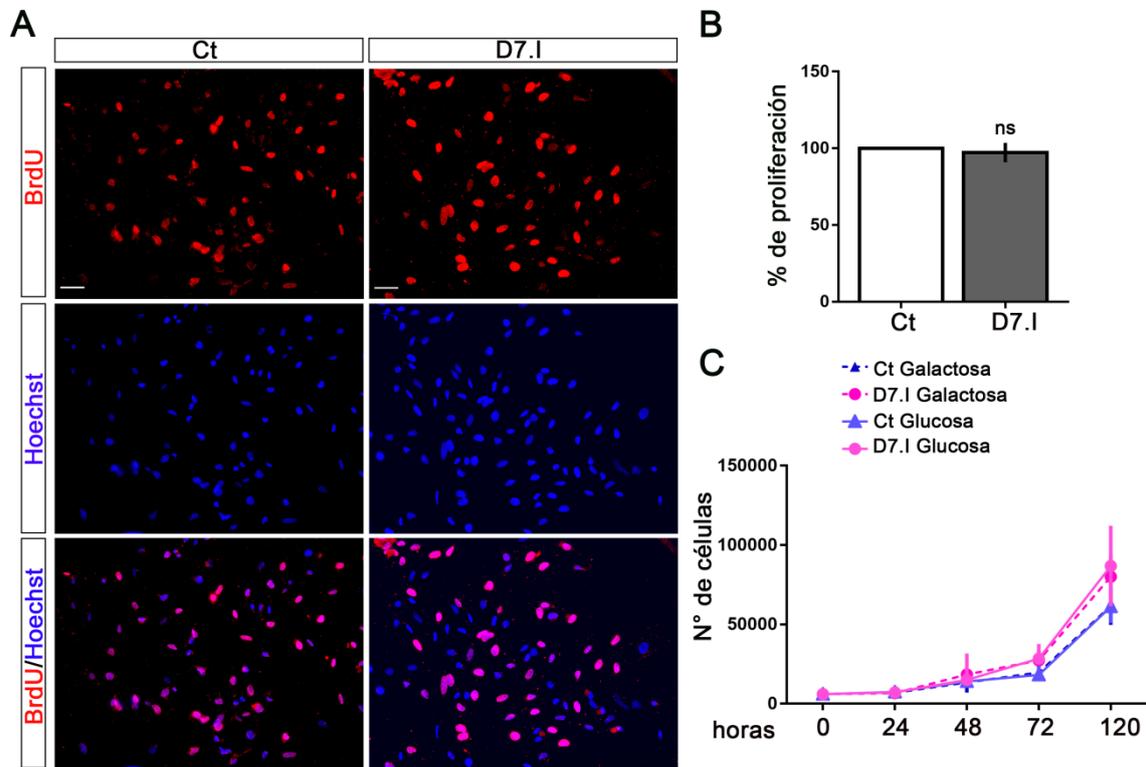


Figura 29: La sobre-expresión estable de StarD7.I no genera cambios en la proliferación celular. (A) La proliferación celular se determinó mediante la incorporación de BrdU (rojo) en células HTR-8/SVneo D7.I o Ct. Se muestran las imágenes superpuestas (panel inferior) donde los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Barra=50 μ m. (B) Porcentaje de proliferación obtenido en tres experimentos independientes respecto al Ct (Media \pm SEM). (C) Número de células crecidas durante 5 días en medio conteniendo 25 mM de glucosa o galactosa según se indica. El gráfico representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes analizados a los diferentes tiempos y condiciones. La significancia estadística fue evaluada por *One-way ANOVA* (ns: no significativo).

3.2. La sobre-expresión de StarD7.I no produce cambios en la migración celular

Se analizó el efecto de la sobre-expresión de StarD7.I sobre la migración celular mediante el ensayo de reparación de la herida. Para realizar el ensayo, se generaron heridas de tamaño similar en monocapas de células HTR-8/SVneo D7.I y Ct y se evaluó por microscopía el tamaño de la herida residual respecto al tamaño inicial a las 4 y 8

horas (Fig. 30A). No se observaron diferencias en el porcentaje del tamaño de la herida en las células transfectadas respecto a las siC (control) (Fig. 30B).

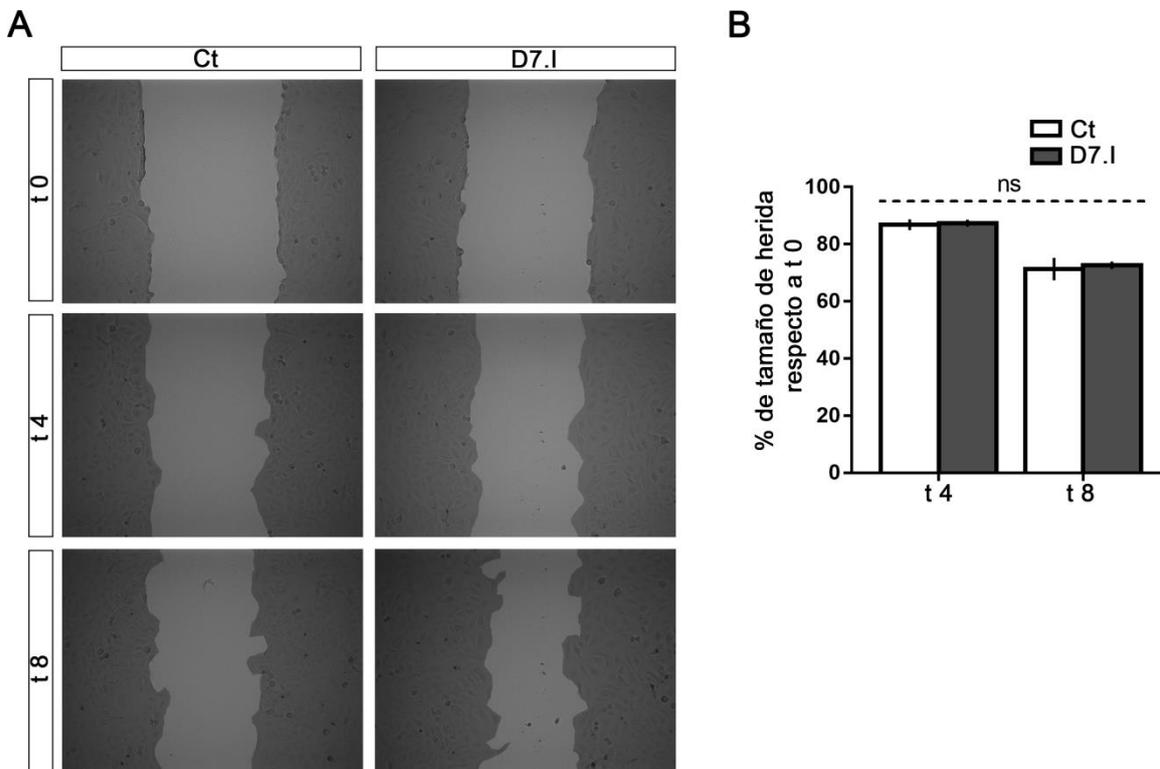


Figura 30: La sobre-expresión de StarD7.1 no produce cambios en la migración celular. (A) Ensayo de la herida en células HTR-8/SVneo D7.1 o Ct. La herida se generó mediante un tip fino de pipeta en una monocapa de células confluentes. Se muestran las fotos representativas de tres experimentos independientes, obtenidas por microscopía de contraste de fase a las 0, 4 y 8 h. **(B)** La distancia entre los bordes de la herida se presentan gráficamente como el porcentaje de la distancia a las 8 h y a las 4 h respecto a la distancia inicial (0 h), en las células D7.1 y Ct. Las barras indican la media \pm SEM de tres experimentos independientes, la significancia estadística se evaluó por *t-test* (ns: no significativo).

Estos resultados indican que las células HTR-8/SVneo con niveles aumentados de la proteína StaD7.1 no modifican la proliferación y ni la migración celular.

SECCIÓN II

Los resultados de la sección II corresponden en su mayoría a resultados obtenidos durante la pasantía de investigación realizada en el laboratorio del Dr. Antonio Zorzano, IRB, Barcelona.

I. PARTICIPACIÓN DE StarD7 EN LA MORFOLOGÍA Y DINÁMICA MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS C2C12

Las células musculares esqueléticas constituyen la unidad funcional del tejido que forma el músculo esquelético, el cual participa de funciones esenciales en la fisiología humana, no sólo como un órgano mecánico de sostén y movilidad sino también como un órgano endócrino (Gomarasca et al., 2020). Los procesos de diferenciación, crecimiento y control de la homeostasis son claves en el desarrollo y mantenimiento de la función celular, tisular y orgánica. A nivel celular, la funcionalidad mitocondrial es central en el mantenimiento de un estado saludable ya que participa en la dinámica del metabolismo celular, la producción de ERO y la apoptosis (Galluzzi et al., 2012; Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2017; Wagatsuma and Sakuma, 2013).

La línea celular C2C12 deriva de tejido muscular de ratón adulto y ha sido reconocida como una herramienta de examen eficaz para el estudio de varios aspectos incluyendo envejecimiento, diabetes mellitus, obesidad, hiperlipidemia, crecimiento muscular, esteatosis hepática y deterioro del crecimiento (Wong et al., 2020). Esta línea es un modelo bien documentado que puede facilitar nuestra comprensión en el metabolismo de la glucosa, mecanismo de señalización de insulina, resistencia a la insulina, estrés oxidativo, ERO y transportadores de glucosa a nivel celular y molecular. Con el fin de explorar la participación de StarD7 en la morfología y dinámica mitocondrial en la célula muscular esquelética, se evaluó el impacto que produce la disminución o el aumento de sus niveles de expresión utilizando como modelo de estudio la línea celular C2C12.

1.1. Expresión de StarD7 en células C2C12 establemente silenciadas o que sobre-expresan establemente las isoformas StarD7.I o StarD7.II

Con el fin de disminuir los niveles de StarD7 se realizó un silenciamiento estable mediante un shRNA específico (shD7). Por otra parte, para sobre-expresar de manera estable la proteína se utilizaron los plásmidos lentivirales generados en este trabajo, que codifican la isoforma precursora de StarD7 (pLenti-StarD7.I) y la isoforma madura (pLenti-StarD7.II). El grado de silenciamiento y sobreexpresión se analizó mediante la valoración de los niveles de la proteína a través de *Western blot* (Fig. 31A). Se observó una disminución de los niveles de StarD7 del 65% en la línea shStarD7 (shD7) respecto al shRNA control (Ct) (Fig. 31B), mientras que las células C2C12 estables para StarD7.I (D7.I) y estables para StarD7.II (D7.II) presentaron un incremento significativo de los niveles proteicos de StarD7 de aproximadamente 4-6 veces comparado con el (Ct) (Fig. 31C).

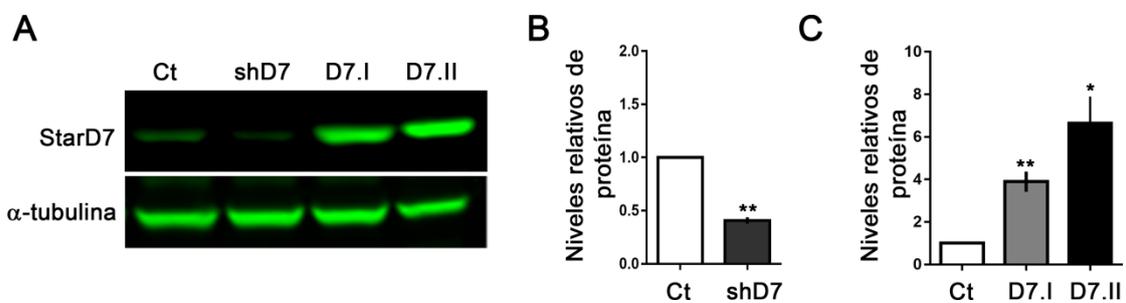
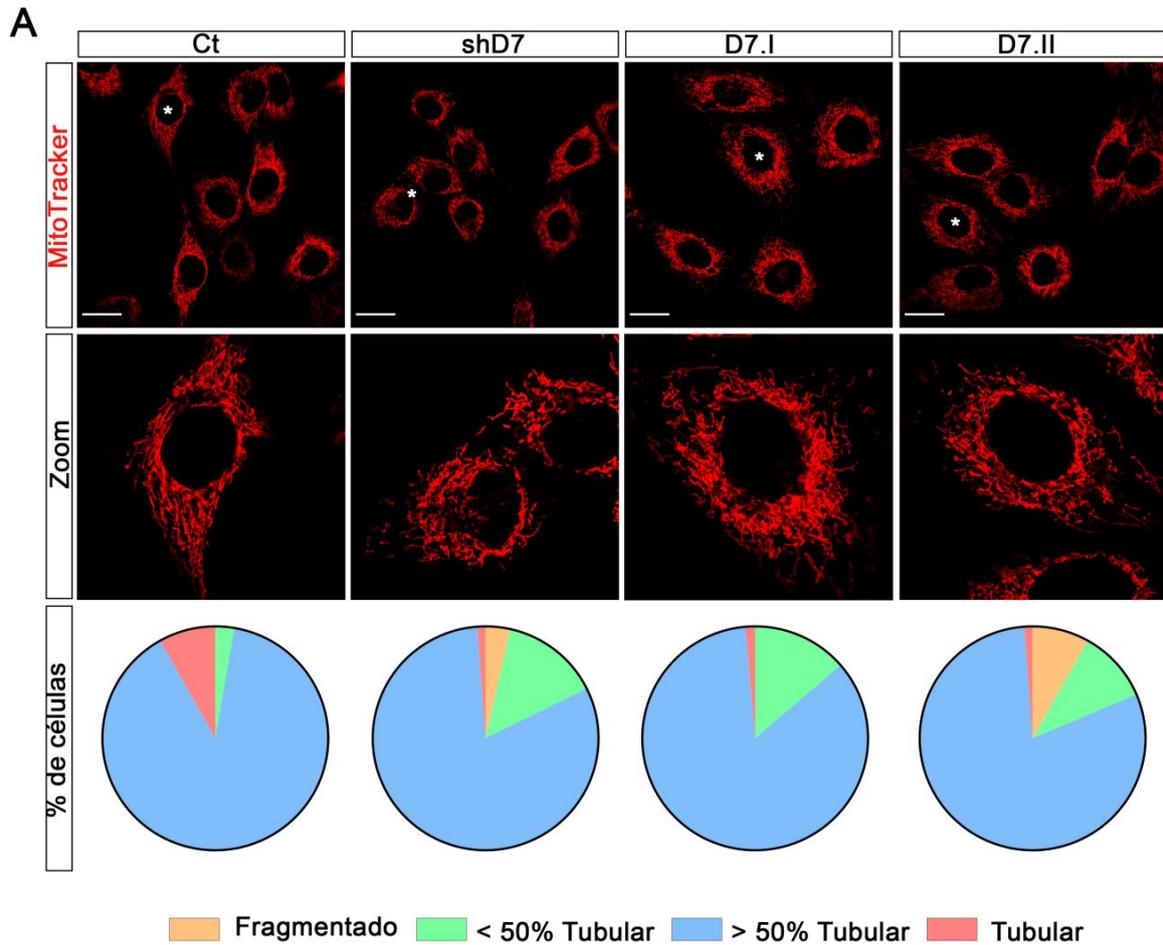


Figura 31: Expresión de StarD7 en células C2C12 establemente silenciadas o que sobre-expresan establemente las isoformas StarD7.I o StarD7.II. (A) *Western blot* de extractos proteicos provenientes de células C2C12 establemente silenciadas mediante un shRNA para StarD7 (shD7) o shRNA control (Ct) o que sobre-expresan de manera estable StarD7.I (D7.I) o StarD7.II (D7.II). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-StarD7 o anti- α -tubulina. (B-C) Los gráficos representan la cuantificación densitométrica de al menos tres experimentos (Media \pm SEM, **p <0,01; *p <0,05, *one-sample t-test*).

1.2. Cambios en la expresión de StarD7 no modifican la morfología ni la masa mitocondrial en células C2C12

A los fines de evaluar el impacto de los cambios en la expresión de StarD7 sobre la morfología mitocondrial, se tiñeron las mitocondrias de las líneas celulares C2C12 estables con Mitotracker Deep Red y se registraron imágenes de las mismas por microscopía confocal. Los resultados mostraron que, a diferencia de lo observado para la línea trofoblástica HTR-8/SVneo, la alteración de los niveles de StarD7 en células C2C12, ya sea por una disminución o por un incremento de StarD7.I o StarD7.II, no producen cambios en la morfología mitocondrial respecto al Ct (Fig. 32A).

Por otra parte, se evaluó en estas células la masa mitocondrial por citometría de flujo utilizando el marcador mitocondrial MitoTracker Green, el cual ha sido utilizado en numerosos trabajos para determinar de manera semi-cuantitativa el contenido mitocondrial (Ahmad et al., 2013; Clutton et al., 2019; de Brito Monteiro et al., 2020). No se detectaron cambios en el contenido mitocondrial de las líneas celulares con niveles modificados de StarD7 (Fig. 32B).



B

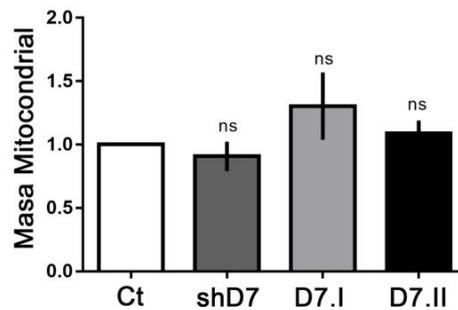


Figura 32: Cambios en la expresión de StarD7 no modifican la morfología ni la masa mitocondrial en células C2C12. (A) La morfología mitocondrial se analizó mediante tinción con MitoTracker Deep Red. En el panel central se muestra un segmento ampliado del área indicada (*). Barra panel superior = 20 μ m. Los gráficos de torta representan la proporción de la morfología mitocondrial registrada por microscopía confocal para cada condición de un experimento representativo con ≥ 20 células analizadas. Las células se clasificaron cualitativamente estableciendo cuatro categorías: fragmentadas; < 50% tubulares; > 50% tubulares o tubulares. **(B)** Cuantificación de la masa mitocondrial realizada mediante tinción con MitoTracker Green y analizada por citometría de flujo. El gráfico representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes (ns= no significativo, *one-sample t-test*).

Por otra parte, se evaluó la ultraestructura celular por microscopía electrónica de transmisión. La Figura 33 muestra alteración en la morfología mitocondrial de las células shD7 respecto a Ct, con una mayor desorganización en sus crestas (paneles superiores). Además, al igual que lo observado en células epiteliales de vías aéreas de ratones *Stard7^{epiΔ/Δ}* (Yang et al., 2017), las células C2C12 deficientes para StarD7 presentan cuerpos multivesiculares, autofagosomas e inclusiones lipídicas. En cuanto a las células D7.I y D7.II muestran dilatación del RE y crestas mitocondriales menos electrodensas que el control (Fig. 33 paneles inferiores).

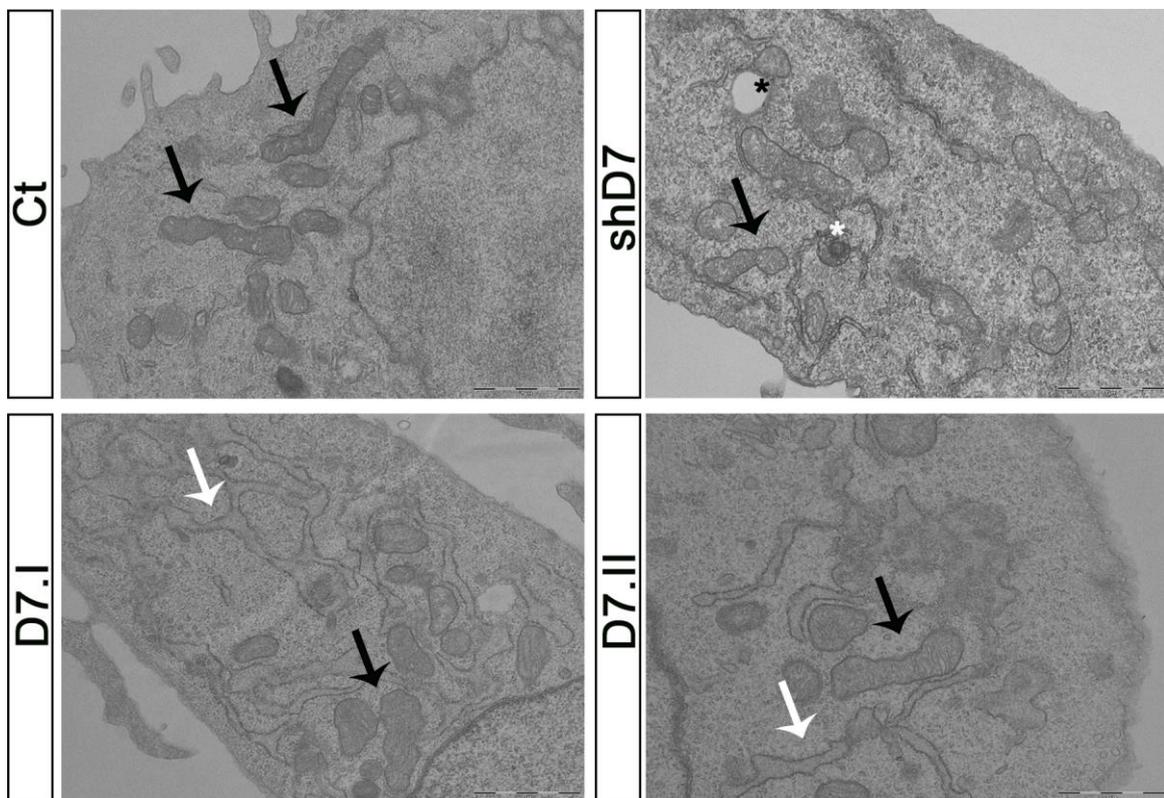


Figura 33: Microscopía electrónica de transmisión en células C2C12 Ct, shD7, D7.I y D7.II. Se observa una estructura mitocondrial conservada en células Ct, mientras que las células shD7 presentan alteradas sus crestas mitocondriales (panel superior derecho, flechas negras), cuerpos multivesiculares (asteriscos blancos) e inclusiones lipídicas (asterisco negro). Las células D7.I y D7.II presentan mitocondrias menos electrodensas (paneles inferiores flechas negras) y el RE dilatado (flecha blanca).

1.3. Cambios en la expresión de StarD7 no modifican la expresión de proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial

A los fines de evaluar si los niveles modificados de StarD7 conducen a alteraciones en la expresión de las proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial (PGC1 α) y en los procesos de fusión (Mfn2 y Mfn1) y fisión (Drp1) mitocondrial se realizaron experimentos de *Western blot*. Para esto, se obtuvieron extractos proteicos de células C2C12 establemente silenciadas para StarD7 (shD7) y que sobre-expresan establemente StarD7 (D7.I y D7.II). Se observó que los cambios en los niveles de StarD7 en esta línea celular, a diferencia de lo que sucede en las células HTR-8/SVneo, no modifican los niveles de las proteínas involucradas tanto en la biogénesis como en la dinámica mitocondrial, a excepción de una leve disminución de la proteína Drp1 detectada en las células shD7 (Fig. 34). Estos resultados se corresponden con lo observado para la morfología mitocondrial, indicando que cambios en los niveles de StarD7 no alteran la morfología, la masa, ni la dinámica mitocondrial de las células C2C12.

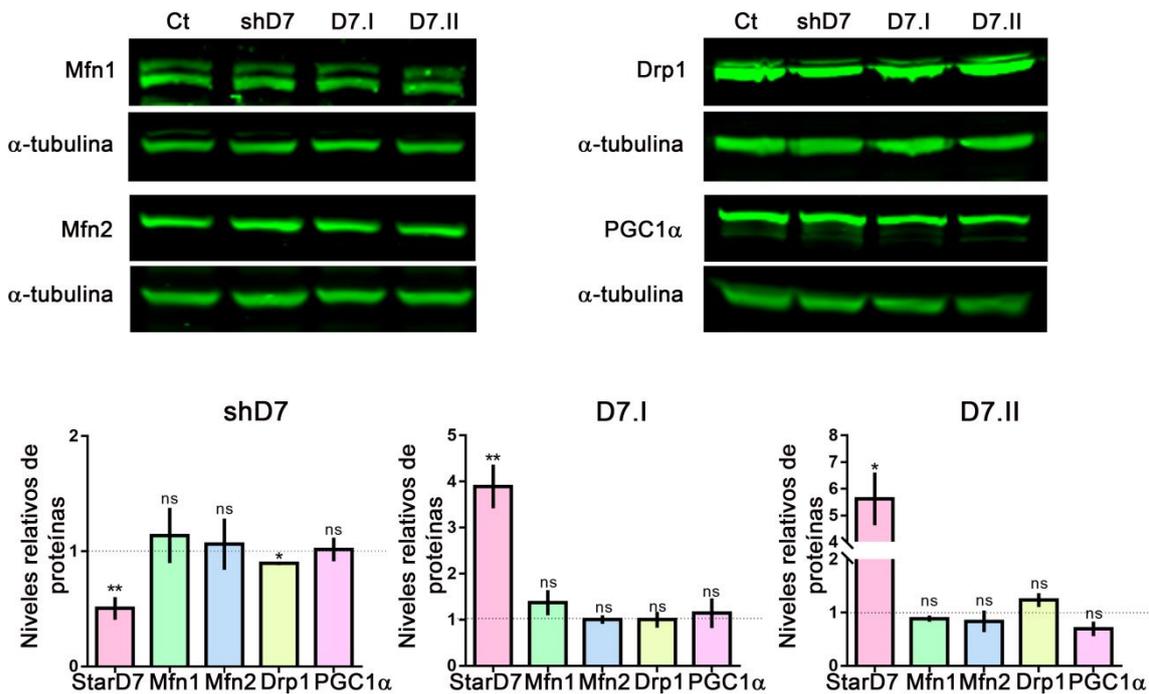


Figura 34: Cambios en la expresión de StarD7 no modifican la expresión de proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial. *Western blot* realizado con extractos proteicos de células C2C12 silenciadas establemente para StarD7 (shD7) y que sobre-expresan StarD7.I (D7.I) o StarD7.II (D7.II). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-StarD7, anti-Mfn2, anti-Mfn1, anti-Drp1 y anti-PGC1 α usando como control de carga anti- α -tubulina. Los gráficos de barras representan el análisis densitométrico de los niveles de cada proteína relativos al control, definido como 1. Se muestra la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes (** <math>p < 0,01</math>; * one-sample t-test).

Dado que el análisis ultraestructural de las células establemente silenciadas mostró una significativa desorganización de las crestas mitocondriales y conociendo que la proteína OPA1 participa en los procesos de fusión de la MMI y es necesaria para la remodelación de las crestas mitocondriales se decidió evaluar su expresión. Para tal fin se realizaron ensayos de *Western blot* utilizando extractos proteicos de células C2C12 Ct, shD7, D7.I y D7.II. Los resultados obtenidos indican que las células shD7 poseen una significativa disminución de la forma larga de la proteína OPA1 (L-OPA1), mientras que no se detectaron cambios en la expresión de OPA1 en las células que sobre-expresan las isoformas de StarD7 (Fig. 35).

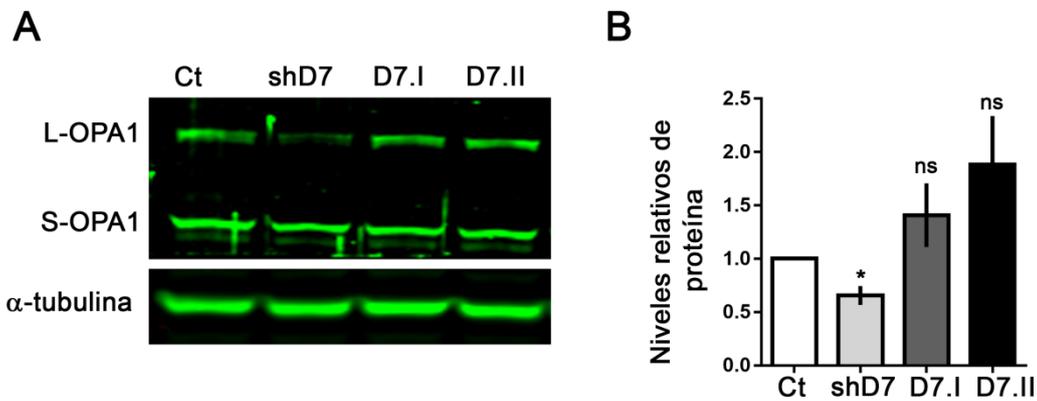


Figura 35: Expresión de la proteína OPA1 en células C2C12. (A) *Western blot* realizado a partir de extractos proteicos de células silenciadas establemente para StarD7 (shD7) y que sobre-expresan StarD7.I (D7.I) o StarD7.II (D7.II). Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-OPA1 usando como control de carga anti-α-tubulina. (B) El gráfico representa la media ± SEM de tres experimentos independientes (*p < 0,05; ns= no significativo, *one-sample t-test*).

En resumen estos resultados indican que en la línea celular C2C12 la disminución o el incremento de los niveles de StarD7 no alteran el contenido ni la morfología mitocondrial visualizada por microscopía confocal y tampoco modifican los niveles de las proteínas PCG1α, Mfn1, Mfn2 y Drp1. Sin embargo, la deficiencia de StarD7 produjo una disminución en los niveles de la proteína L-OPA1 y una disrupción de la estructura de las crestas mitocondriales, al igual que lo observado por microscopía electrónica en otras línea celulares deficientes para StarD7.

II. PARTICIPACIÓN DE StarD7 EN LA HOMEOSTASIS MITOCONDRIAL

2.1. Cambios en la expresión de StarD7 no modifican los niveles de las especies reactivas de oxígeno

Con el fin de investigar la participación de StarD7 en la homeostasis mitocondrial se evaluaron los niveles de ERO en las células C2C12 que presentan niveles disminuidos o aumentados de la proteína StarD7. El análisis se realizó por citometría de flujo utilizando el compuesto H2DCFDA, para medir los niveles de ERO totales, y la sonda MitoSOX para evaluar las ERO mitocondriales.

Los resultados indican que los cambios en la cantidad de la proteína StarD7 en las células C2C12, ya sea por disminución (shD7) o por aumento en su expresión (D7.I y D7.II), no modifican los niveles de las ERO totales (Fig. 36A) ni de las ERO mitocondriales (Fig. 36B) respecto a las células control. El agregado de rotenona 5 μ M, compuesto que inhibe el complejo I de la ETC mitocondrial, produjo un incremento significativo en las ERO mitocondrial en todas las condiciones analizadas. Esto indica que las células son capaces de responder al bloqueo de la OXPHOS con una mayor formación de ERO (Fig. 36B).

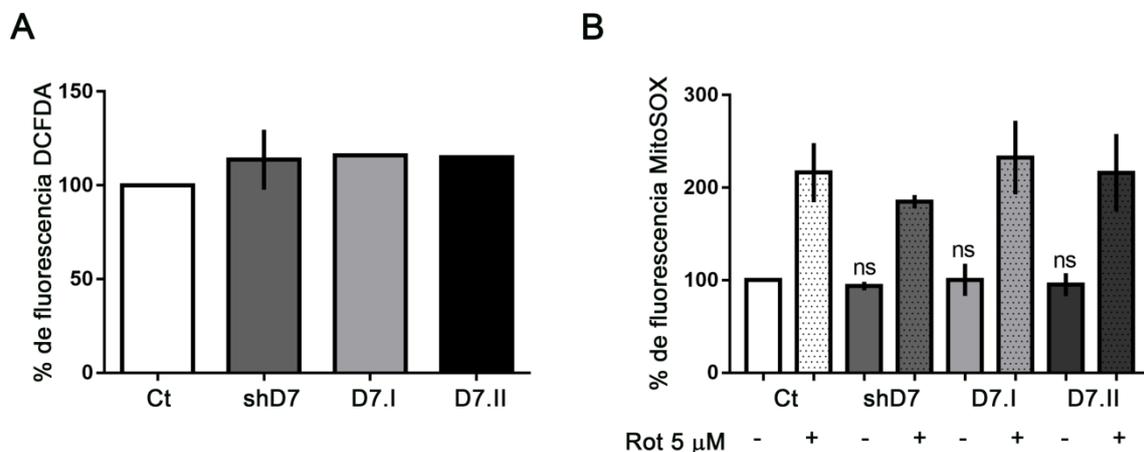


Figura 36: Cambios en la expresión de StarD7 no modifican los niveles de las ERO. Cuantificación de las ERO totales (A) y mitocondriales (B) en células C2C12 Ct, shD7, D7.I y D7.II mediante citometría de flujo. (B) Las células se cultivaron en presencia o no de 5 μ M de rotenona. Los gráficos de barra muestran la intensidad de fluorescencia media (Media \pm SEM) relativa al control definido como 100% de tres experimentos independientes (ns= no significativo; *one-sample t-test*).

2.2. La deficiencia de StarD7 conduce a una disminución en el $\Delta\Psi_m$

Con el fin de analizar la actividad mitocondrial en las células C2C12 con niveles modificados de StarD7 se cuantificó el $\Delta\Psi_m$. Para ello, se marcaron las células con TMRM, el cual penetra en las mitocondrias activas emitiendo fluorescencia que puede ser detectada por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 37 el silenciamiento de StarD7 en las células C2C12 originó una disminución en el $\Delta\Psi_m$ respecto a las células control, mientras que no se detectaron cambios en las células C2C12 con niveles incrementados de ninguna de las isoformas de StarD7.

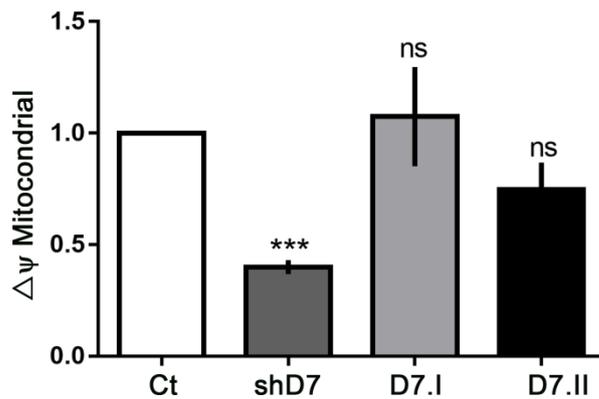


Figura 37: El silenciamiento de StarD7 conduce a una disminución en el potencial de membrana mitocondrial. Determinación del $\Delta\Psi_m$ en células C2C12 Ct, shD7, D7.I y D7.II. El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia media de TMRM (Media \pm SEM) relativa al control definido como 100% de tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$; ns= no significativo; *one-sample t-test*).

2.3. Cambios en la expresión de StarD7 no modifican los niveles de ATP total

Como se mencionó en la introducción, la proteína OPA1 además de ser la responsable de la fusión de la MMI es crucial para el ensamble de los complejos de la ETC (Cogliati et al., 2013).

Habiendo demostrado que el silenciamiento de StarD7 en las células C2C12 conduce a una desorganización de las crestas mitocondriales con una disminución en los niveles de la proteína L-OPA1, se decidió evaluar los niveles de ATP. Para tal fin, se cuantificó en las células C2C12 Ct, shD7, D7.I y D7.II el ATP celular expresado como las Unidades Relativas de Luz (URL) producidas por la reacción del ATP con la enzima luciferasa. Como se observa en la Figura 38 no se detectaron cambios en los niveles de ATP en ninguna de las líneas celulares estables en relación a las células control.

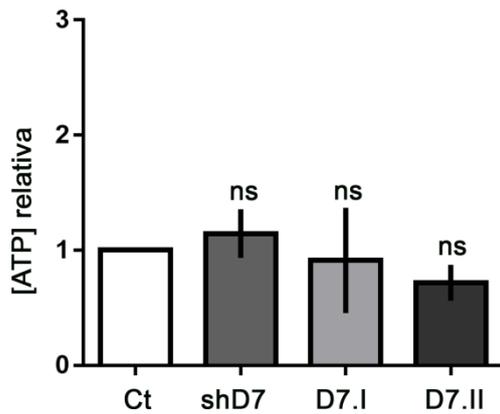


Figura 38: Cambios en la expresión de StarD7 no modifican los niveles de ATP total. Determinación de ATP en las células C2C12 Ct, shD7, D7.I y D7.II. El gráfico de barra representa el resultado de tres experimentos independientes y muestran la absorbancia media (Media \pm SEM) relativa al control definido como 1 (ns= no significativo, *one-sample t-test*).

2.4. La deficiencia de StarD7 incrementa la glicólisis y la producción de ATP glicolítico

La mayor parte del ATP generado en las células es producido en la mitocondria por el ciclo de Krebs y la ETC. La oxidación completa de moléculas a CO₂ genera un gradiente de pH y un $\Delta\Psi_m$ a través del bombeo de protones por los complejos I, III y IV de la ETC que es esencial para que la ATP sintasa produzca ATP a partir de ADP y fosfato.

Como se demostró, las células C2C12 con niveles disminuidos de StarD7 presentan alterada la estructura de las crestas mitocondriales (Fig. 33), tienen un menor $\Delta\Psi_m$ (Fig. 37) sin cambios en los niveles de ATP total (Fig. 38). Se ha reportado que las células C2C12 StarD7-KO tienen un menor consumo de oxígeno mitocondrial (Horibata et al., 2020). Además, se ha descrito que las células que poseen alterada la ETC y la producción de energía mediante la OXPHOS pueden reemplazar su fuente principal de producción de energía incrementando la glicólisis (Vander Heiden et al., 2009).

En base a esta información, se decidió evaluar en las células shD7 la actividad glicolítica y la producción de ATP vinculada a la glicólisis mediante la medición de la acidificación del medio extracelular (ECAR, *extracellular acidification rate*) utilizando el equipo SeaHorse XFe (Fig. 39A). Los resultados muestran que el silenciamiento de StarD7 en las células C2C12 promueve un incremento en la glicólisis y en la capacidad glicolítica (Fig. 39B) generando un aumento en la producción de ATP por la vía glicolítica (Fig. 39C).

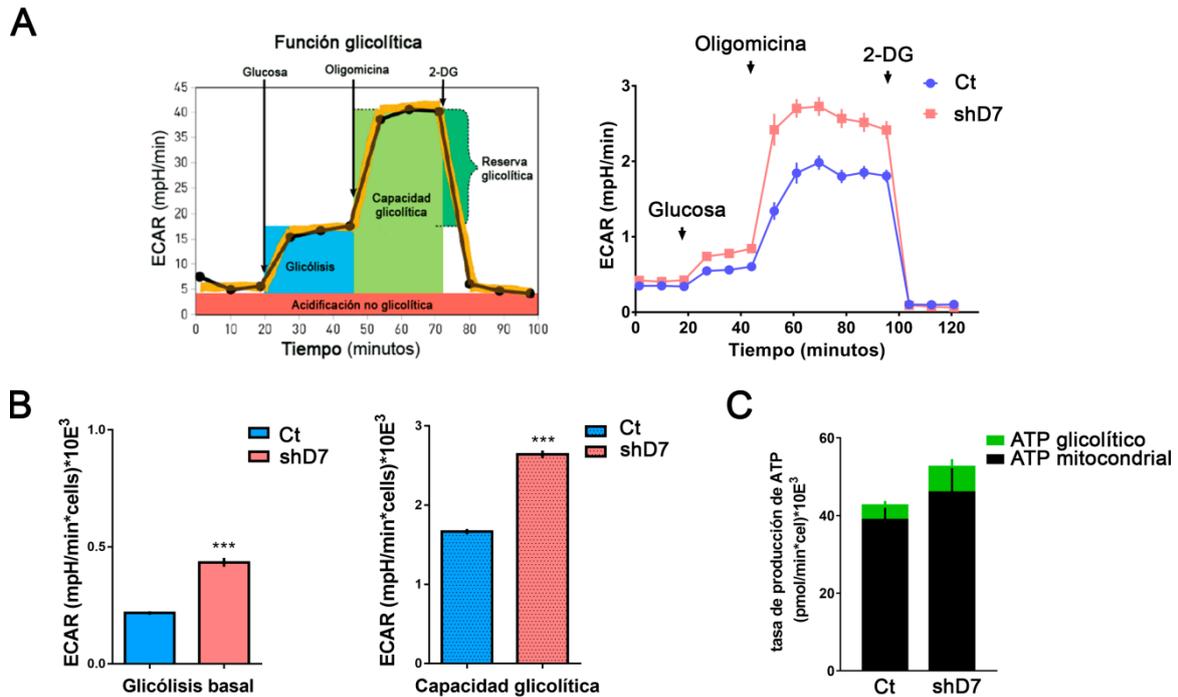


Figura 39: El silenciamiento de StarD7 incrementa la glicólisis y la producción de ATP glicolítico. (A) Determinación de la glicólisis y la capacidad glicolítica en células C2C12 Ct y shD7 expresada como ECAR en función del tiempo utilizando Seahorse XFe. A la izquierda se muestra un gráfico representativo de ECAR en el tiempo. (B) Los gráficos representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes relativa al control. (C) Producción de ATP glicolítico y mitocondrial. El gráfico representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes relativa al control. (***) $p < 0,001$; t-test).

2.5. La deficiencia de StarD7 no produce cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial

Por otra parte, se evaluó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de estas células mediante la medición de la acidificación del medio extracelular utilizando el equipo Seahorse XFe. Contrariamente a lo esperado, las células con niveles disminuidos de StarD7 no presentaron cambios en el consumo de oxígeno respecto al control.

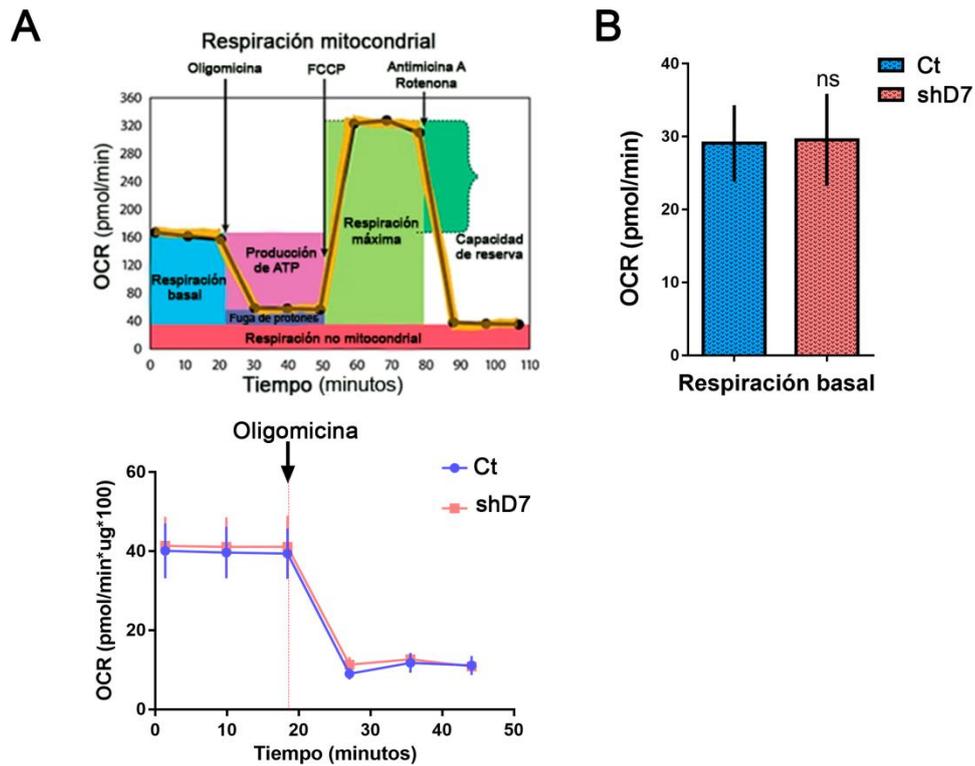


Figura 40: El silenciamiento de StarD7 no produce cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial. (A) Determinación de la respiración basal en células C2C12 Ct y shD7 expresada como OCR en función del tiempo utilizando Seahorse XFe. A la izquierda se muestra un gráfico representativo de ECAR en el tiempo. **(B)** El gráfico representa la media \pm SEM de la respiración basal de tres experimentos independientes relativa al control (ns= no significativo; *t-test*).

En conjunto estos resultados demuestran que los cambios en los niveles de StarD7 en la línea celular C2C12 no generan estrés oxidativo ni modifican el nivel de ATP total. Por otra parte, la deficiencia de StarD7 produce una disminución en el $\Delta\Psi_m$ con incrementos en la capacidad glicolítica, la glicólisis basal y la producción de ATP glicolítico, sin alterar el consumo de oxígeno mitocondrial.

III. EFECTO DE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE StarD7 EN OTROS PROCESOS CELULARES MEDIADOS POR LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

3.1. La deficiencia de StarD7 aumenta la captación de glucosa

Las células pueden utilizar ácidos grasos, aminoácidos y glucosa para generar ATP. La glucosa, después de ser captada por sus transportadores, es fosforilada por la enzima hexoquinasa para producir glucosa 6-fosfato, cuya carga negativa evita la difusión de la glucosa fuera de la célula. La glucosa 6-fosfato es posteriormente procesada por enzimas glicolíticas para generar piruvato como producto principal que puede o no ser utilizado por el ciclo de Krebs (Lunt and Vander Heiden, 2011). Dado que las células C2C12 shD7 poseen mayor capacidad glicolítica que las células control se consideró de interés evaluar en estas células la captación de glucosa. Para esto, se utilizó la sonda 2-NBDG (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-D-glucose), un análogo de la desoxiglucosa que es captado, pero no puede ser utilizado en la glicólisis, acumulándose en el interior celular. Este acúmulo puede cuantificarse por citometría de flujo determinando la fluorescencia que emite.

La Figura 41 muestra que las células C2C12 shD7 en concordancia con el aumento detectado en la glicólisis realizan una mayor captación de glucosa del medio extracelular que las células Ct.

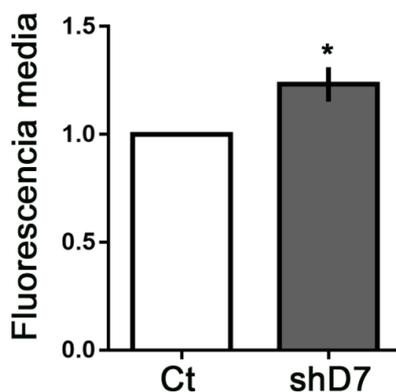


Figura 41: La deficiencia de StarD7 aumenta la captación de glucosa. Captación de glucosa en células C2C12 shD7 y Ct medida por la incorporación de NBD-Glucosa. El gráfico muestra la fluorescencia de la media \pm SEM de tres experimentos independientes relativa al control definido como 1 (* $p < 0,05$, *one-sample t-test*).

3.2. La deficiencia de StarD7 impide la diferenciación de células C2C12

Las células C2C12 crecen fácilmente como mioblastos mononucleados y pueden ser inducidos a diferenciar en miotubos multinucleados. La fusión y alargamiento celular continúan, y pueden desarrollar estrías cruzadas y contraerse espontáneamente. La

producción de energía de los mioblastos depende principalmente de la glicólisis, mientras que los miotubos obtienen sus altas necesidades energéticas principalmente a través de la OXPHOS. Recientemente, se reportó en células C2C12 que la depleción de la proteína StarD7, mediante siRNA o CRISPR/Cas9, impide la correcta diferenciación de estas células a miotubos (Horibata et al., 2020).

A los fines de corroborar que sucedía con el proceso de diferenciación miogénica en las células silenciadas mediante shD7, se evaluó la expresión de la proteína miogenina. Para esto, las células C2C12 Ct y shD7 se diferenciaron durante 7 días en medio DMEM suplementado con 2% de suero de caballo. Como se observa en la Figura 42 la inmunodetección de miogenina muestra una pobre diferenciación celular en las células shD7 en comparación con las células control.

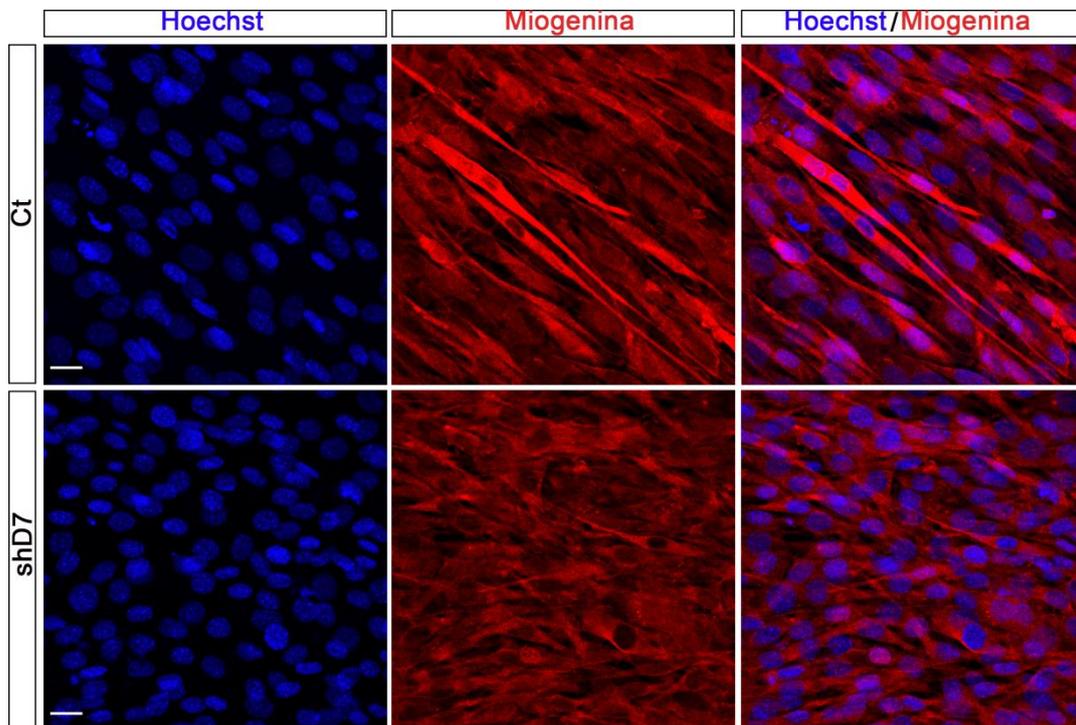


Figura 42: El silenciamiento de StarD7 impide la diferenciación celular. Las células C2C12 Ct y shD7 se cultivaron durante 7 días en DMEM suplementado con 2 % de suero de caballo. Inmunodetección de miogenina con anti-miogenina (rojo) y núcleos teñidos con Hoechst (azul). Las imágenes se registraron por microscopía confocal. Barra = 20µm.

3.3. La deficiencia de StarD7 disminuye los niveles de las enzimas involucradas en la síntesis de PS

Se ha descrito que la disminución de StarD7 produce una reducción en los niveles de PC y un aumento en la cantidad de PE (Horibata et al., 2016), pero no hay datos

disponibles sobre los niveles de PS. Con el objetivo de iniciar estudios relacionados al efecto del silenciamiento de StarD7 sobre el metabolismo lipídico celular, particularmente en lo relacionado a PS se cuantificó mediante *Western blot* la expresión de las enzimas PSS1 y PSS2 que participan en la bioconversión de PC y PE a PS, respectivamente. Resultados preliminares muestran que el silenciamiento de StarD7 se asocia a niveles disminuidos de las proteínas PSS1 y PSS2 (Fig. 43 A y B).

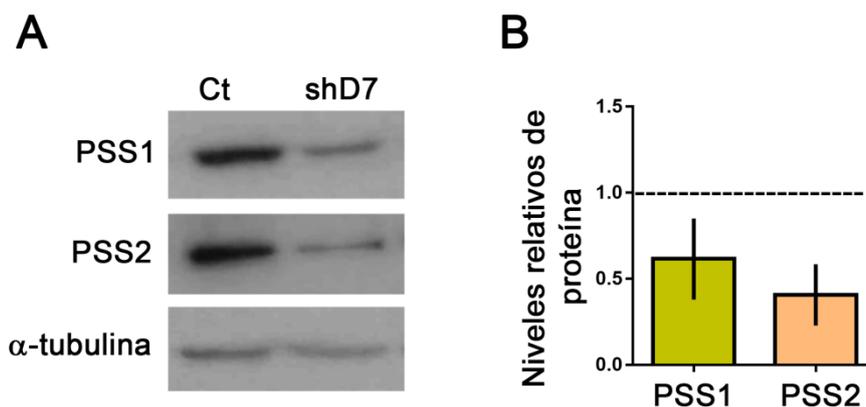


Figura 43: El silenciamiento de StarD7 disminuye los niveles de enzimas involucradas en la síntesis de PS. (A) *Western blot* realizado con extractos proteicos de células C2C12 shD7 y Ct. Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-PSS1 y anti-PSS2 usando como control de carga anti-α-tubulina. **(B)** El gráfico representa la media ± SEM de dos experimentos independientes.

3.4. La deficiencia de StarD7 genera acumulación de lípidos neutros

Recientemente se reportó que la disminución de las proteínas PSS1 y PSS2 en hígado lleva a una acumulación de los niveles de PE en el RE y que esto conduce a una acumulación de TAG (Hernández-Alvarez et al., 2019). En base a esta información resultó de interés evaluar los niveles de lípidos neutros en células C2C12 shD7 las cuales muestran disminución en la expresión de las enzimas PSS1 y PSS2. Los resultados muestran un incremento en la acumulación de lípidos neutros en células shD7 respecto al control determinado por la detección de la sonda Bodipy 493/503 mediante microscopía de epifluorescencia (Fig. 44A). Estos resultados fueron corroborados mediante la detección de dicha sonda fluorescente por citometría de flujo (Fig. 44B).

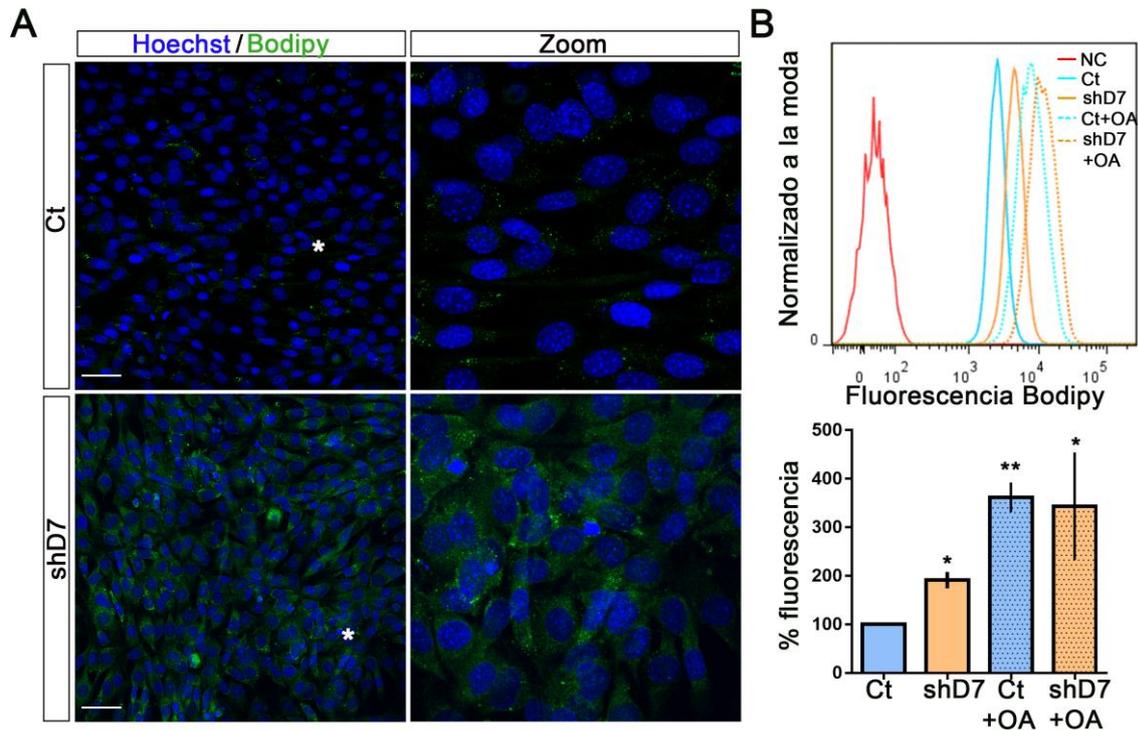


Figura 44: El silenciamiento de StarD7 genera acumulación de lípidos neutros. (A) Análisis del contenido de lípidos neutros en células C2C12 shD7 y Ct por microscopía confocal. Se utilizó la sonda fluorescente BODIPY 493/503 (verde) para marcar los lípidos neutros y Hoechst para marcar los núcleos (azul). Barra= 50 μ m. **(B)** Cuantificación de lípidos neutros marcados con BODIPY493/503 y analizados por citometría de flujo. NC: células sin marca. OA: tratamiento con 60 μ M de ácido oleico como control positivo para inducir acumulación de lípidos neutros (panel superior). El gráfico del panel inferior muestra la media \pm de SEM de tres ensayos independientes (*p <0,05, **p <0,01; *one sample t-test*).

Estos resultados indican que los mioblastos de ratón C2C12 silenciados de manera estable para StarD7 (shD7) realizan una mayor captación de glucosa, expresan niveles reducidos de las enzimas que participan en la síntesis de PS (PSS1 y PSS2). Además, se estableció en esta línea celular que la deficiencia de StarD7 conduce a un incremento en la acumulación de lípidos neutros. Al igual que lo observado para células C2C12 StarD7-KO y StarD7-KD (Horibata et al., 2020), la disminución de StarD7 mediante silenciamiento estable de la proteína impide la correcta diferenciación de los mioblastos a miotubos.

DISCUSIÓN

Como se mencionó, patologías como el cáncer, desórdenes neurodegenerativos, obesidad y complicaciones placentales, entre otras han sido asociadas a patologías mitocondriales (Fisher et al., 2020). De igual manera, la disfunción mitocondrial del músculo esquelético ha sido involucrada en el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Aon et al., 2014). Además, se han reportado alteraciones o deterioros musculares asociados a condiciones patológicas como miopatías metabólicas, distrofias musculares, enfermedades neuromusculares degenerativas, caquexia, y la pérdida de masa y fuerza muscular que se observa en el envejecimiento (Chal and Pourquié, 2017; Finsterer, 2020). Fallas en la fusión mitocondrial, auto/mitofagia, biogénesis, metabolismo y transporte intracelular de lípidos han sido asociadas a desórdenes placentales y del músculo esquelético. (Mårtensson et al., 2017; Nielson and Rutter, 2018).

Los lípidos son el principal combustible mitocondrial, sin embargo pueden actuar como inhibidores de la OXPHOS (Aon et al., 2014). Numerosos informes han establecido que la disposición adecuada de los lípidos en las membranas mitocondriales es esencial para mantener la actividad y estabilidad de los complejos proteicos implicados en la función, distribución y biogénesis mitocondrial, y para mantener el estado energético/redox mitocondrial-celular. Las células almacenan ácidos grasos (FA) como TAG y los empaquetan en LDs que actúan como reservorios de energía. Comprender cómo las alteraciones en la composición de los fosfolípidos y su distribución celular regulan la dinámica mitocondrial y el metabolismo energético podría proporcionar nuevas terapias para las enfermedades metabólicas.

En esta Tesis se analizaron aspectos moleculares básicos relacionados a la participación de la proteína transportadora de lípidos StarD7 en la morfología, dinámica y función mitocondrial utilizando como modelo de estudio la línea HTR-8/SVneo derivada de trofoblasto humano de primer trimestre y la línea C2C12 derivada de tejido muscular de ratón.

SECCIÓN I

PARTICIPACIÓN DE StarD7 EN LA MORFOLOGÍA, DINÁMICA Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS

En esta sección se abordó el estudio de la contribución de la proteína StarD7 en la morfología, dinámica y función mitocondrial en las células trofoblásticas HTR-8/SVneo.

Los resultados obtenidos indican que la deficiencia de StarD7 ya sea de manera transiente (siD7) o estable (shD7) lleva a una mayor fragmentación mitocondrial. En el caso del silenciamiento transiente el fenotipo fragmentado es del tipo “*donut*” (Fig. 13), que se ha asociado a un aumento de estrés oxidativo (Ahmad et al., 2013), mientras que en las células shD7 las mitocondrias fragmentadas se observan como pequeños fragmentos aislados. Consistente con estos hallazgos, trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros autores demostraron por microscopía electrónica que el silenciamiento de StarD7 conduce a una disrupción de la estructura de las crestas mitocondriales en las líneas celulares hepáticas HepG2 y Hepa-1 (Flores-Martín et al., 2016; Horibata et al., 2016), HeLa (Saita et al., 2018) y en las células BEAS-2B (Yang et al., 2017), y a una disminución del contenido de PC en la MMI sin afectar la acumulación en la MME (Saita et al., 2018). Esto conduce a una disrupción de la homeostasis mitocondrial, con una disminución en la respiración aeróbica, en la producción de ATP, aumento de estrés oxidativo y daño al ADN mitocondrial (Horibata et al., 2017; Yang et al., 2017).

Por otro lado, la sobre-expresión de la forma precursora de StarD7, la cual contiene un sitio de localización mitocondrial, de manera estable (D7.I) o transiente (D7.I-IRES-EGFP) produce un incremento en la fragmentación de las mitocondrias (Figs. 15 y 17), que no se observa en las células que sobre-expresan la forma madura de la proteína StarD7.II (D7.II/D7.II-IRES-EGFP). Estos resultados revelan que StarD7 requiere su señal de localización mitocondrial para modular la morfología mitocondrial, lo que sugiere que su efecto puede estar relacionado con la transferencia de PC a las mitocondrias. Ciertamente, el transporte del análogo de PC fluorescente se incrementó en las células

D7.I que sobre-expresan la isoforma StarD7.I (Fig. 28). En base a este hallazgo, se sugiere que un desequilibrio en el nivel de PC podría estar contribuyendo al fenotipo de mitocondrias fragmentado detectado en las células D7.I. Sin embargo, las mitocondrias de las células D7.I fueron capaces de realizar eventos de fusión lo que sugiere que el fenotipo observado es causado por un desequilibrio en los eventos de fusión/fisión y no es el resultado de una pérdida en la fusión mitocondrial (Fig. 22).

Se demostró que la interferencia en la expresión de StarD7 afecta críticamente no solo la morfología mitocondrial sino también la dinámica mitocondrial. La reducción en la expresión de StarD7 de manera transiente conduce a una disminución en las proteínas de fusión Mfn1 y Mfn2, sin modificar la cantidad de las proteínas Drp1 y PGC1 α ; mientras que en las células establemente silenciadas solo se evidenció una disminución de PGC1 α , sugiriendo una disminución en la biogénesis mitocondrial (Fig. 18). En el primer caso, los niveles totales de ERO aumentaron consistente con lo descrito en las células HepG2 (Flores-Martín et al., 2016) y BEAS-2B (Yang et al., 2017), aunque no se detectó ningún cambio significativo en las ERO mitocondriales.

Por otro lado, el aumento en los niveles de StarD7.I disminuye la expresión de Mfn1 y aumenta los niveles de Mfn2 y Drp1, con un incremento en el transcripto que codifica a Drp1 (Fig. 19). Llamativamente, el potencial de membrana mitocondrial no se alteró en las células D7.I y se detectó una ligera disminución en los niveles de ERO total pero no en ERO mitocondrial, lo que sugiere que la disminución en la conectividad mitocondrial no afecta la capacidad bioenergética de estas células. Concordante con los hallazgos observados en las células HTR-8/SVneo se ha reportado alteración en los ciclos de fusión y fisión mitocondrial en diferentes trastornos placentarios (Holland et al., 2017; Zhou et al., 2017). Un estado de pro-fisión mitocondrial dado por una disminución de Mfn1 y Mfn2 se asoció a pre-eclampsia (Zhou et al., 2017), un desorden que complica el 5-8% de los embarazos y representa una causa importante de morbilidad y mortalidad maternal y fetal (Amaral et al., 2015). La dinámica mitocondrial placentaria también se reportó afectada en la diabetes gestacional, con fragmentación mitocondrial a través de un mecanismo que involucra Drp1 (Saben et al., 2016).

El aumento de Drp1 asociado a una disminución en la proteína Mfn1 evidenciado en las células D7.I es compatible con un fenotipo mitocondrial fragmentado dado por incremento en los eventos de fisión. De hecho, se demostró que la morfología mitocondrial en las células D7.I depende de la actividad GTPasa de Drp1 y del grado de fosforilación de la serina 637 (Figs. 23 y 24), siendo llamativo el aumento de Mfn2 detectado, ya que esta proteína está clásicamente involucrada en la promoción de eventos de fusión mitocondrial. Sin embargo, Mfn2 también está implicada en un gran número de actividades independientes de fusión, como el tráfico de mitocondrias, la mitofagia y el metabolismo mitocondrial (Filadi et al., 2018; Schrepfer and Scorrano, 2016). Se ha descrito que también participa facilitando los contactos mitocondria-RE necesarios para la señalización intracelular de calcio y como sitio de contacto para la biosíntesis y el intercambio de lípidos (Ahmad et al., 2013; Koshiba et al., 2004; Raturi and Simmen, 2013). Además, estos contactos son necesarios para que el RE marque los sitios para el reclutamiento de Drp1 y se produzca la fisión mitocondrial (Sebastián et al., 2017).

Ausman y col reportaron incrementos similares en la expresión de Mfn2 y Drp1 en placentas preeclámpticas (Ausman et al., 2018). Estos autores demostraron que el incremento en los niveles de Mfn2 estaba asociado a un aumento de los contactos mitocondria-RE mediado por ceramida/BOK (*Bcl-2-related ovarian killer*), proteína que se localiza en la MME y facilita el proceso de fisión mitocondrial vía Drp1. Consistente con este reporte, se describió a StarD7 en los contactos mitocondria-RE colocalizando en parte con la proteína Mfn2 (Horibata et al., 2017), por lo que un incremento en los niveles de StarD7 también podría estar favoreciendo la formación de estos contactos y facilitando el transporte de PC a la mitocondria vía MAMs.

Un número creciente de trabajos indican que la actividad de PKA dependiente de cAMP fosforila Drp1 en la Ser637 inhibiendo la GTPasa de Drp1 y promoviendo un cambio desde un fenotipo mitocondrial fragmentado a uno interconectado (Chang and Blackstone, 2010; Wai and Langer, 2016). En línea con esta información, se observó que las células D7.I transfectadas transientemente con un plásmido que codifica a la mutante fosfomimética Drp1-S637D muestran un incremento en la conectividad

mitocondrial; mientras que las mitocondrias de las células D7.I transfectadas con la mutante Drp1-S637A, que no puede ser fosforilada permanecieron con un fenotipo fragmentado. Además, se observó que la sobre-expresión de la proteína mutante Drp1-K38A abolió la fragmentación de las mitocondrias en las células D7.I, con un agregado mitocondrial perinuclear similar al descrito para células COS-7 (Zhu et al., 2004).

En conjunto estos datos indican que las mitocondrias fragmentadas detectadas en las células D7.I dependen de la actividad GTPasa de Drp1 y del grado de fosforilación de la serina 637.

SECCIÓN II

PARTICIPACIÓN DE StarD7 EN LA MORFOLOGÍA, DINÁMICA Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LAS CÉLULAS C2C12

En esta sección se abordó el estudio de la contribución de la proteína StarD7 en la morfología, dinámica y función mitocondrial en las células C2C12. Como se señaló, la línea celular C2C12 deriva de tejido muscular de ratón y ha demostrado ser un valioso modelo para estudios del metabolismo de la célula muscular esquelética y su diferenciación. Aberraciones en la función del músculo esquelético con frecuencia se asocian con alteraciones en la función mitocondrial y pueden tener graves consecuencias para la salud debido a su rol central en el metabolismo de glucosa y lípidos así como también en la diferenciación y contracción muscular.

Se demostró que la deficiencia o sobre-expresión de StarD7 en las células C2C12 no produce cambios en la morfología mitocondrial, evaluados por microscopía óptica, ni alteran los niveles de las proteínas Mfn1, Mfn2, Drp1 y PGC1 α , implicadas en la dinámica y biogénesis mitocondrial (Figs. 32 y 34). Sin embargo, el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión evidencia una desorganización de las crestas mitocondriales en las células silenciadas que se correlaciona con una disminución en la expresión de L-OPA1 (Figs. 33 y 35). Como se mencionó, OPA1 es una GTPasa mitocondrial responsable de la fusión de la membrana interna y el mantenimiento y remodelación de la estructura de las crestas (Ban et al., 2017). Esta proteína es procesada en la mitocondria por OMA1 y por YME1L lo que conduce a la acumulación equilibrada de formas cortas (S-) y largas (L-) de OPA1 (MacVicar and Langer, 2016); mientras que un desbalance en su procesamiento lleva a alteraciones en la estructura mitocondrial.

En línea con los resultados de esta tesis, Horibata y col. reportaron en las células C2C12 que la depleción total de StarD7 mediante el sistema CRISPR-Cas9 conduce a una disrupción de la estructura de las crestas mitocondriales (Horibata et al., 2020). Esto

sugiere que la disminución de los niveles de PC mitocondrial altera el balance entre PC y otros lípidos no bicapa, como CL y PE, impactando en la estructura y estabilidad de las crestas mitocondriales.

Está ampliamente aceptado que el comportamiento dinámico de las mitocondrias está ligado al metabolismo celular y la morfología de la red mitocondrial puede variar en adaptación a diversas demandas fisiológicas entre diferentes tejidos. Por otra parte, se ha reportado la diferencia en los mecanismos de procesamiento y maduración de proteínas mitocondriales entre células humanas y murinas. En líneas celulares humanas como HEK293 y HeLa la maduración de StarD7 es mediada por las proteasas mitocondriales MPP y PARL, y es además clivada por la proteasa dependiente de ATP *i*-AAA -YME1L localizada en el EIM (Saita et al., 2018). Esta proteasa está involucrada también en el procesamiento de las proteínas PRELID1, PRELID3B y TRIAP1 regulando la homeostasis de los fosfolípidos mitocondriales (MacVicar et al., 2019; Potting et al., 2013). En cuanto a PARL, también está implicada en el procesamiento de proteínas que son necesarias para mantener la estructura mitocondrial como PINK1 (Jin et al., 2010), PGAM5 (Sekine et al., 2012) y la proteína pro-apoptótica Smac (DIABLO) (Saita et al., 2017), entre otras. Por lo que cambios a nivel celular en los niveles de StarD7 podrían estar modificando el balance del procesamiento de otras proteínas mitocondriales. Por otra parte en las líneas celulares de ratón C2C12 y HEPA-1 se reportó que PARL no está involucrada en el procesamiento de StarD7, desconociendo hasta el momento cuáles son las proteasas que clivan a StarD7 (Horibata et al., 2020).

Las crestas mitocondriales juegan un papel relevante en la organización de los supercomplejos de la ETC incrementando el área disponible para la OXPHOS, por lo que la desestructuración de estos complejos causa una deficiencia del sistema con el consecuente déficit bioenergético. Al respecto, se observó que los cambios en los niveles de StarD7 en células C2C12 no generan estrés oxidativo ni modifican el nivel de ATP total, mientras que la deficiencia de StarD7 produce una caída en el potencial de membrana mitocondrial (Fig. 37).

La producción de energía celular depende de la aportada por las vías de la OXPHOS y la glicólisis, adaptando el uso de ellas a los cambios en su entorno (Orlicka-Płocka et al., 2020). Los resultados muestran que las células shD7 poseen un aumento en la capacidad glicolítica, en la glicólisis basal y en la producción de ATP por glicólisis sin cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial basal, a diferencia de lo que fue reportado para células C2C12 StarD7-KO (Horibata et al., 2020). Esto sugiere que la proteína StarD7 es necesaria no solo para mantener el nivel de PC en las mitocondrias sino también para la estructura mitocondrial, y que dependiendo de su nivel y contexto celular puede generar cambios relevantes en la función mitocondrial. Si bien no se observaron cambios en el consumo de oxígeno basal, el hecho de que estas células tengan incrementada la función glicolítica es indicativo de que están activando ese mecanismo de producción de energía ante una demanda energética. Es necesario considerar que la producción de ATP en los mioblastos depende fuertemente de la glicólisis, por lo tanto, para aumentar la eficiencia de generación de ATP dependiente de la OXPHOS mitocondrial, se debería analizar el consumo de oxígeno máximo y la respiración basal y ligada al ATP en DMEM sin glucosa y con galactosa para forzar la actividad mitocondrial. De todos modos es importante destacar que el cambio en el contenido de PC mitocondrial registrado por Horibata y col. en las células StarD7-KO resulta menor que lo esperado, lo que refleja la posibilidad de otras vías de transferencia de PC a la mitocondria (Horibata et al., 2020). En este sentido, se reportó que la interacción de la proteína de transferencia de PC Stard2/PC-TP con la MME depende de la fosforilación de Ser110, pero se desconoce si esta interacción está acoplada a la transferencia de PC. Sin embargo, se reportó que los ratones StarD2^{-/-} tienen un fenotipo normal sin anomalías mitocondriales, mientras que los adipocitos marrones PC-TP^{-/-} presentan mitocondrias agrandadas y alargadas y una mayor utilización de ácidos grasos. Es posible que las vías de transferencia de PC a la mitocondria involucren otras proteínas de transferencia de fosfolípidos que no son miembros de la familia START y este favorecido además por la presencia de MAMs, puentes transitorios desde el RE hasta las MME (Kang et al., 2009; Vance, 2014).

Consistente con el aumento de la vía glicolítica en las células C2C12 deficientes de StarD7 se evidenció un aumento en la captación de glucosa, lo que acuerda con la menor eficiencia de la glicólisis para la producción de ATP. Este aumento del consumo de glucosa proporciona precursores biosintéticos para las reacciones anabólicas que se ramifican a partir de la glicólisis, incluidas las vías que producen lípidos, nucleósidos o proteínas.

Se ha demostrado que la disfunción mitocondrial produce una miogénesis incompleta, ya que inhibidores mitocondriales como el FCCP (un desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial), rotenona (un inhibidor del complejo mitocondrial I), mixotiazol (un inhibidor del complejo mitocondrial III) u oligomicina (un inhibidor de la ATP sintasa) inhiben la diferenciación miogénica en las células C2C12, sugiriendo que las mitocondrias funcionan potencialmente como un regulador de la miogénesis (Wagatsuma and Sakuma, 2013). Durante la diferenciación de las células musculares y el mantenimiento de su homeostasis intervienen múltiples factores reguladores y vías de señalamiento, compartidos parcialmente durante la regeneración del tejido muscular adulto lesionado (Dumont et al., 2015). Un importante factor de transcripción específico del músculo que promueve la diferenciación muscular y controla el paso de diferenciación final de la miogénesis es la miogenina. Se observó que la deficiencia de StarD7 lleva a una disminución en la expresión de miogenina con un impedimento para la diferenciación de mioblastos a miotubos, concordante con lo reportado para células C2C12 StarD7-KO y StarD7-KD (Horibata et al., 2020). Como se señaló, la producción de energía por los mioblastos depende principalmente de la glicólisis, mientras que en los miotubos dependen principalmente de la OXPHOS. Por lo tanto, la diferenciación miogénica completa requiere cambiar la generación de energía de la glicólisis citosólica a la OXPHOS mitocondrial. El aumento de la función glicolítica observado en las células deficientes de StarD7 podría estar impidiendo la correcta diferenciación miogénica.

Por otra parte, se sabe que cambios en los niveles de PC/PE producen alteraciones en las mitocondrias del músculo esquelético en humanos y ratones. Mutaciones en el gen de la colina quinasa β , y la consecuente disminución de producción de PC en el músculo causan distrofia muscular rostro caudal en ratón (Wu et al., 2009). En

humanos, se han encontrado mutaciones en la colina quinasa β en pacientes que padecen distrofia muscular congénita rara (Mitsuhashi and Nishino, 2011; Oliveira et al., 2015). Se reportó que las mitocondrias del músculo esquelético de ratones y pacientes con niveles reducidos de PC poseen anomalías morfológicas, disminución en la actividad enzimática de la ETC y menor potencial de membrana (Mitsuhashi and Nishino, 2011), por lo que resulta necesario mantener niveles adecuados de PC en las membranas mitocondriales ya que defectos en su biosíntesis o transporte afectan la diferenciación e integridad del músculo esquelético causando patologías musculares.

Finalmente, se observó que las células C2C12 deficientes de StarD7 expresan niveles reducidos de las enzimas que participan en la síntesis de PS (PSS1 y PSS2) con un incremento en la acumulación de lípidos neutros. En línea con estos hallazgos, se reportó recientemente, que la disminución de PSS1/2 en hígados de ratones resulta en una deficiente incorporación de L-Ser en PS y PE llevando a aumento en TAG y a una mayor incorporación de oleato en lípidos (Hernández-Alvarez et al., 2019). El empaquetamiento del exceso de lípidos en LDs puede considerarse una respuesta adaptativa para mantener el suministro de energía sin obstaculizar el estado redox mitocondrial o celular, reduciendo la concentración de intermediarios lipotóxicos (Aon et al., 2014).

La sobrecarga de lípidos que implica la acumulación de TAG en tejidos no adiposos conduce a trastornos como hiperlipidemia y lipodistrofias, disfunción cardíaca, enfermedad hepática, tanto en humanos como en modelos animales de obesidad y diabetes. La función mitocondrial está estrechamente relacionada con la cantidad de ácidos grasos (FA) ya que las mitocondrias son el sitio principal de degradación de los lípidos (Aon et al., 2014). El mantenimiento de altos niveles de β -oxidación mitocondrial reduce la acumulación y el almacenamiento de FA en músculos esqueléticos y cardíacos donde predomina la β -oxidación de FA sobre la lipogénesis de novo (Eaton, 2002).

Se ha reportado que las mitocondrias regulan su suministro de FA regulando la formación de autofagosomas en las MAMs. Esta relación permite la integración física y funcional de la degradación de LDs con el suministro de FA para alimentar el ciclo de

Krebs en las mitocondrias adyacentes, y apoya la noción de que las proteínas de transferencia de lípidos podrían ubicarse en las MAMs. La inhibición de la autofagia y la posterior acumulación de LDs observada tras la inhibición de la ETC son una consecuencia de la interrupción de los contactos mitocondria-RE. (Bosc et al., 2020). Como se mencionó anteriormente, la proteína StarD7 podría estar formando parte de los contactos mitocondria-RE ya que se demostró que colocaliza parcialmente con la proteína Mfn2 (Horibata et al., 2017), en base a esto resultaría de interés evaluar cómo se encuentran los contactos mitocondria-RE en las células shD7, y si podrían estar favoreciendo la acumulación de LDs con una disminución de la autofagia.

Por último es importante señalar que los mecanismos responsables de que las membranas tengan una composición de fosfolípidos determinada son entre otros: la localización y actividad de las enzimas que sintetizan y degradan al fosfolípido y las vías para su transporte desde donde el lípido es sintetizado hacia otras membranas y organelas (Vance, 2014). Asimismo, el balance de fosfolípidos presentes en una membrana determina en forma espontánea su curvatura y es importante durante su remodelamiento, donde ocurren procesos de fusión, fisión y cambios dinámicos en su curvatura (Ball et al., 2018; Harayama and Riezman, 2018).

Los resultados de esta tesis permiten profundizar en el conocimiento de aspectos básicos relacionados a la participación de StarD7 en la morfología y dinámica mitocondrial y aporta nuevos datos del efecto de la sobreexpresión de StarD7 sobre la actividad de la proteína de fisión Drp1, cuyo incremento lleva a un fenotipo mitocondrial fragmentado en la línea celular de trofoblasto HTR-8/SVneo. Además, este trabajo aporta nueva información que involucra a la proteína StarD7 como una proteína necesaria en el mantenimiento del metabolismo mitocondrial y el balance de lípidos en la línea celular de mioblasto de ratón C2C12, ya que la disminución de la misma produce una alteración en la estructura de la MMI lo que lleva a un aumento en la producción de ATP glicolítico y a un incremento en la acumulación de LDs, posiblemente por un bloqueo en la síntesis de PS.

CONCLUSIÓN

En la primera parte de este trabajo se demuestra que la alteración en los niveles de expresión de StarD7 en células trofoblásticas (HTR-8/SVneo) origina cambios morfológicos mitocondriales que se acompañan con modificaciones en la expresión de las proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial. Particularmente, se evidenció que la sobre-expresión de la isoforma StarD7.I, que posee una señal de localización mitocondrial, produce un incremento en el transporte de PC a la mitocondria y un desbalance en los procesos de fusión/fisión mediado por un incremento en Drp1 dependiente de la actividad GTPasa y del grado de fosforilación de la serina 637 (Fig. 45).

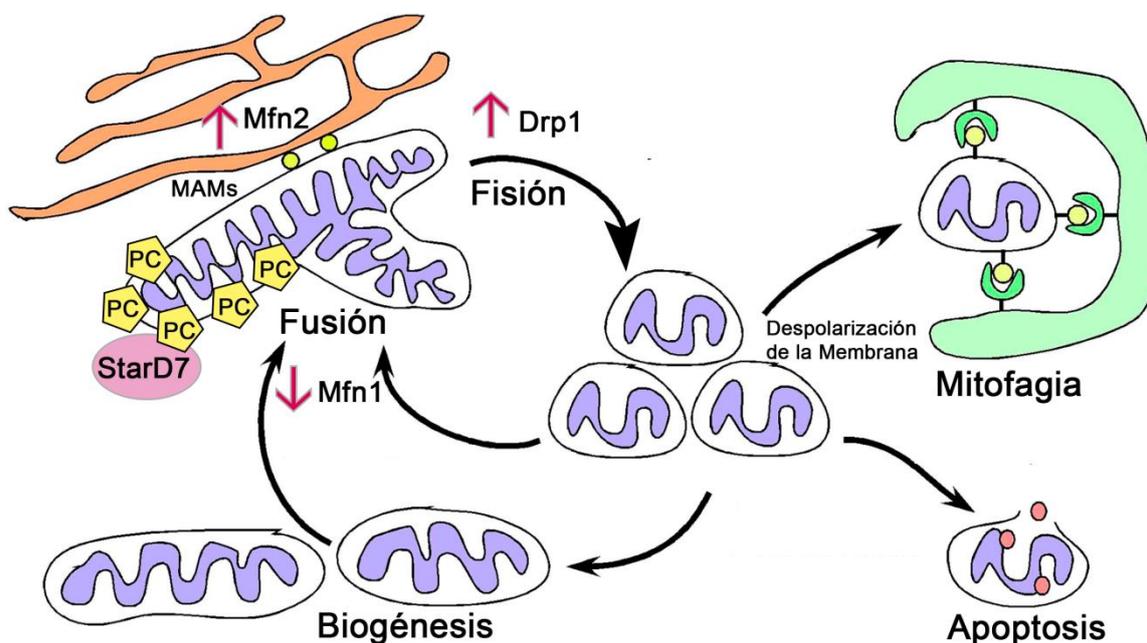


Figura 45. Esquema representativo de los principales resultados observados en las células HTR8/SVneo. El incremento de StarD7 en las células HTR-8/SVneo lleva a un aumento en los niveles de PC mitocondrial y genera un cambio en la morfología mitocondrial dando lugar a un fenotipo fragmentado. Esta fragmentación es la resultante de un desbalance en la expresión de las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial: con incremento en los niveles de Drp1 y Mfn2 y disminución de Mfn1.

En la segunda sección de este trabajo se describe que cambios en las niveles de StarD7 en las células musculares esqueléticas de ratón C2C12 no generan cambios morfológicos mitocondriales visibles por microscopía óptica, ni impactan en modificaciones en la expresión de Mfn1, Mfn2 y Drp1. Sin embargo, se observó que la

deficiencia de StarD7 altera la morfología de las crestas mitocondriales, lo cual se acompaña con disminución en la expresión de la proteína L-OPA-1, implicada en el mantenimiento de las crestas mitocondriales. Además, se demostró que la disminución de StarD7 conduce a una reducción del $\Delta\psi$ mitocondrial, disminución de la expresión de las enzimas PSS1 y PSS2, aumento en la actividad glicolítica, captación de glucosa y acumulación de *lipid droplets* (Fig. 46).

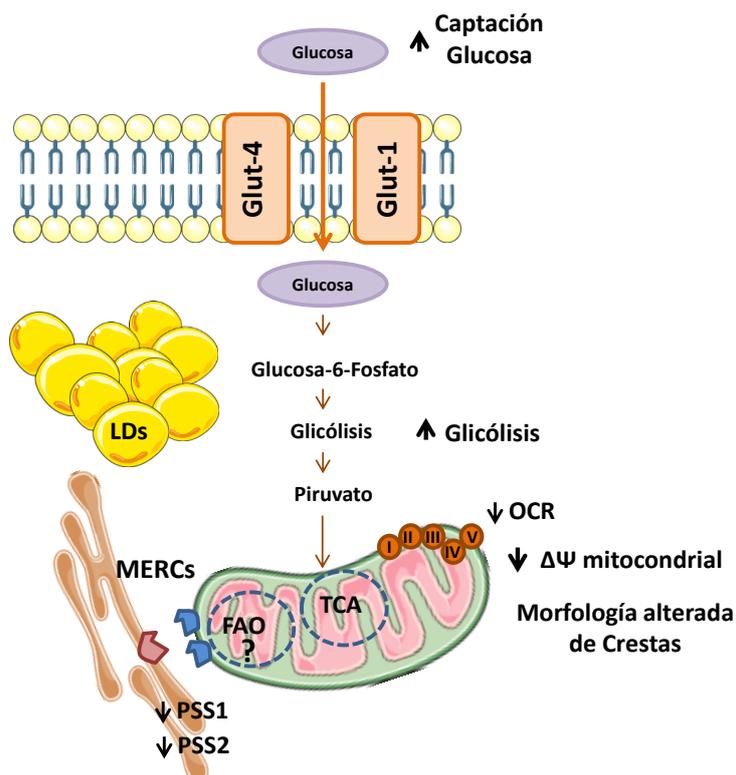


Figura 46. Esquema representativo de los principales resultados observados en las células C2C12. La disminución de StarD7 en las células C2C12 produce alteración en la estructura de las crestas mitocondriales y caída en el $\Delta\psi$ mitocondrial. Además genera incremento en la función glicolítica y en la captación de glucosa. Por otra parte disminuye los niveles de las enzimas involucradas en la síntesis de PS, PSS1 y 2, y aumenta la acumulación de LDs.

En resumen, los hallazgos obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis indican que los niveles de StarD7 están implicados no solo en el tráfico de PC desde el RE a la MME y desde la MME a la interna (Saita et al., 2018), sino también en el mantenimiento de la dinámica y función mitocondrial (Rojas et al., 2021). Como se señaló, se reportaron niveles alterados de transcripción de StarD7 en varias patologías como placentales,

enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular, obesidad y cáncer (Aghamaleki et al., 2019; Durand et al., 2003; Flores-Martin et al., 2013; Su et al., 2019). Llamativamente, estas condiciones están relacionadas con mitocondrias fragmentadas y disfunción mitocondrial (Chakrabarty et al., 2018; Shah et al., 2019). Finalmente, estos hallazgos amplían estudios previos que informaron una morfología mitocondrial alterada (Flores-Martín et al., 2016; Horibata et al., 2016; Yang et al., 2017) y proporcionan evidencia adicional que sugiere que los niveles de StarD7 están estrictamente controlados en la fisiología normal a los fines de mantener la homeostasis celular (Rojas et al., 2021).

PERSPECTIVAS

Responder algunas preguntas e incógnitas en el campo científico implica generar nuevos interrogantes.

Como se mencionó a lo largo de este trabajo, StarD7 se sintetiza como una isoforma precursora (StarD7.I) que contiene una señal de localización mitocondrial y un dominio START que transporta PC desde el RE a la mitocondria (Horibata and Sugimoto, 2010). Una vez en la mitocondria, StarD7.I es clivada liberando el dominio amino terminal que contiene la señal de localización mitocondrial dando lugar a la isoforma madura (StarD7.II) que puede ser liberada al citosol o permanecer en el espacio intermembrana de las mitocondrias transportando PC entre la MME y MMI (Horibata et al., 2017; Saita et al., 2018).

La rápida conversión de StarD7.I a StarD7.II y su localización en el citoplasma, membrana plasmática y núcleo (Angeletti et al., 2008; Leman et al., 2009) sugieren que StarD7 tendría además una función no mitocondrial. StarD7.II conserva el dominio START para unir y transportar PC (Horibata and Sugimoto, 2010), por lo que es posible que pueda facilitar el intercambio de PC entre otras organelas intracelulares. Además, se ha descrito que PC actúa como un ligando endógeno de factores de transcripción como PPAR α y LRHI/NR5A2, y aunque el mecanismo por el cual PC llega al núcleo para unirse a

PPAR α se desconoce, es posible que las proteínas StarD7 y / o StarD2 y StarD10 podrían estar involucradas en este transporte (Yang et al., 2015). En este sentido, resultados previos indican que StarD7.II interacciona con las proteínas GW182 (TNRC6A, B Y C) del complejo argonauta sugiriendo que, más allá de su rol como proteína transportadora de lípidos a la mitocondria, StarD7 podría ser un componente de la maquinaria de silenciamiento celular (Flores-Martin, 2015). Además, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se demostró que StarD7.II interacciona con la proteína KLHDC5, proteína adaptadora de sustrato de la proteína Cul3 (Rojas, 2016), la cual regula la estructura de los microtúbulos a través del control de la degradación de la proteína de microtúbulos p60/katanina y por lo tanto la división celular (Cummings et al., 2009). Este resultado sugiere que la isoforma StarD7.II podría participar junto con KLHDC5, en un complejo proteico, regulando los procesos de división mitótica localizando los lípidos necesarios para dicho proceso (Scaglia et al., 2014).

ANEXO

En esta parte del trabajo y de manera complementaria a los resultados que se documentan en la Secciones I y II de esta Tesis se exploró el efecto de la infección por *Trypanosoma cruzi* sobre la expresión de proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos de ratón.

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular que coloniza una amplia variedad de tejidos y células durante la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es una de las principales causas de miocarditis aguda y miocardiopatía crónica en regiones endémicas de América Latina (Pérez-Molina and Molina, 2018). El corazón es el órgano metabólicamente más activo del cuerpo y tiene el mayor contenido de mitocondrias que otros tejidos y aproximadamente el 95% del ATP celular se utiliza para facilitar el ciclo de contracción-relajación dentro del miocardio (Brown et al., 2017). Una serie de evidencias señalan a las mitocondrias del tejido cardíaco como el blanco principal de la infección por *T. cruzi* (Garg, 2005). De hecho, estudios realizados en miocitos de ratones chagásicos muestran una expresión alterada de proteínas relacionadas con la función mitocondrial (Garg et al., 2004; Mukherjee et al., 2003), así como una deficiencia de los complejos de ETC (Vyatkina et al., 2004). La generación de ERO es uno de los factores más importantes que contribuyen a la disfunción mitocondrial que desencadena el daño del ADN y la expresión génica de citoquinas (Ba et al., 2010; Gupta et al., 2009). Además, está bien establecido que el déficit en la enzima MnSOD, así como del factor de transcripción antioxidante Nrf2 agrava esta disfunción mitocondrial con una producción de energía deteriorada (Wen et al., 2017). El miocardio de los pacientes con cardiomiopatía chagásica y disfunción ventricular muestra disminución en los niveles y actividad de varias enzimas del metabolismo energético mitocondrial, incluida la expresión de la ATP sintasa y la actividad de la creatina quinasa, en comparación con la miocardiopatía dilatada o isquémica idiopática (Teixeira et al., 2011). Se reportó además una disminución del flujo de ATP miocárdico (Leme et al., 2010).

Como se mencionó, las mitocondrias ejercen múltiples funciones bioquímicas como la producción de ATP a través de la OXPHOS, la síntesis de aminoácidos, hemo y lípidos; y la biogénesis de los grupos de azufre de hierro y representan el 30% del volumen total de los cardiomiocitos. Se ha reportado la importancia del desequilibrio entre la fusión y

fisión mitocondrial en fenotipos mitocondriales cardíacos de ratones (Song et al., 2017). Sin embargo, no existen estudios que establezcan si la infección con *T. cruzi* altera el balance entre las proteínas de fusión y fisión en cardiomiocitos. Por lo que resultó de interés explorar el efecto de la infección por *T. cruzi* en la dinámica mitocondrial en cardiomiocitos de ratón así como analizar la expresión de la proteína de transferencia de lípidos StarD7 cuya depleción altera la morfología mitocondrial (Aghamaleki et al., 2019; Flores-Martín et al., 2016; Horibata et al., 2016; Saita et al., 2018). Para esto, se utilizaron ratones BALB/c obtenidos de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA; Buenos Aires, Argentina) los que fueron infectados intraperitonealmente con 500 tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén diluidas en solución salina como se describió en (Ana et al., 2021). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de los Institutos Nacionales de Salud, y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (942/2018). Los ratones se anestesiaron durante la fase aguda (pico de parasitemia día 21 después de la infección (dpi) o crónica de la infección (parasitemia indetectable día 42 ó 100 dpi), en una atmósfera de isoflurano para permitir la extracción de la sangre mediante punción cardíaca, la cual se utilizó para el recuento parasitario (Ana et al., 2021). Posteriormente, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los corazones. Animales no infectados (control) se procesaron en paralelo.

Los corazones se lavaron tres veces en PBS y se cortaron finamente. Las muestras se homogeneizaron sobre hielo con una jeringa de plástico utilizando RIPA para la lisis (50 mM Tris, 1% NP-40, 15 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% desoxicolato de sodio) en una relación 1:10 p/v en presencia de inhibidor de fosfatasa (P0044-Sigma) y proteasas (P8340-Sigma) (1% v/v). Se cuantificó la concentración de proteínas y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Se analizó la expresión de PGC-1 α , Mfn2, Drp1, conexina 43 (Cx43) y β -catenina a partir de lisados proteicos del tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* sacrificados en varios intervalos de tiempo después de la infección.

Los resultados de los análisis de *Western blot* obtenidos en muestras cardíacas de 21 dpi revelaron una disminución significativa de los niveles de las proteínas PGC-1 α y β -catenina en comparación con las muestras de control (Fig.1A y B). No se detectaron cambios en las cantidades de las proteínas Drp1, Mfn2 y Cx43 con una variabilidad biológica importante entre las muestras de tejido.

Además de las proteínas mitocondriales bien conocidas se analizó la expresión de la proteína de transferencia lipídica StarD7. Llamativamente, las muestras de tejido cardíaco de ratones de 21 dpi mostraron una reducción significativa en el nivel de la proteína StarD7 en comparación con los tejidos control (Fig. 1A y B). Mientras que, a 42 y >100 dpi, la expresión de la proteína fue similar a los valores encontrados en el tejido cardíaco de ratones control (Fig. 2A, y B).

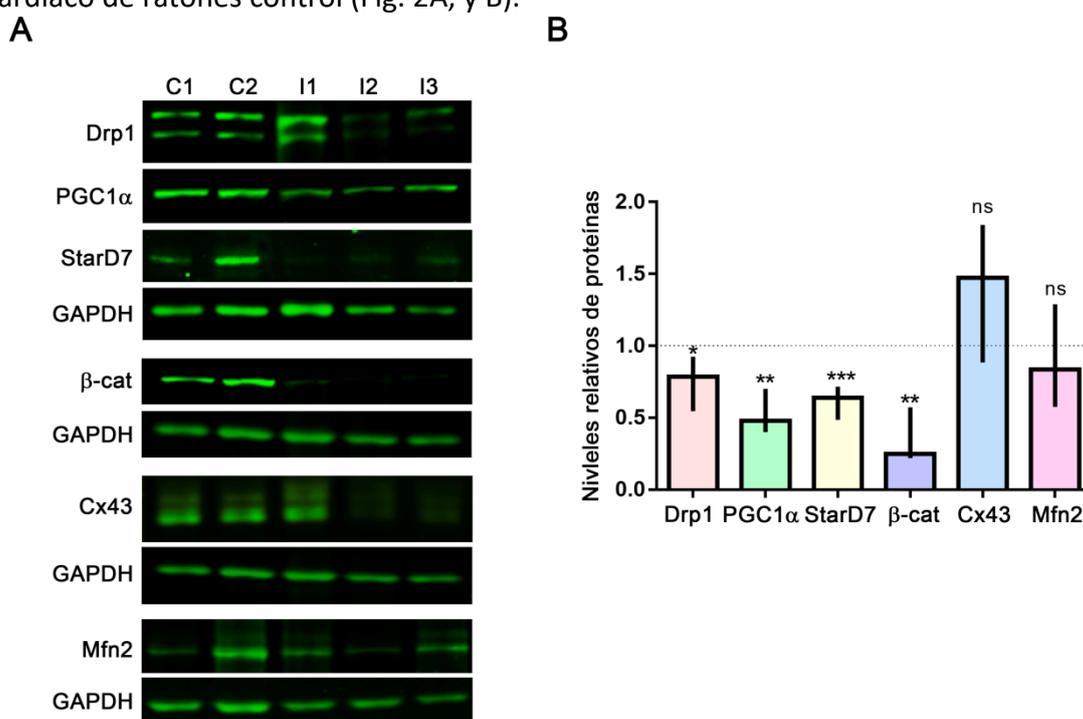


Figura 1. Expresión de Drp1, PC1 α , StarD7, β -catenina, Cx43, Mfn2, en extractos proteicos provenientes de corazones de ratones BALB/c 21 dpi con *T.cruzi*. (A) Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-Drp1, anti-PGC1 α , anti-StarD7, anti- β -catenina, anti-Cx43, anti-Mfn2 y anti-Mfn1, usando como control de carga anti-GAPDH. (B) Los gráficos de barras muestran la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de las proteínas indicadas respecto al control normalizados con GAPDH. Se muestra la mediana \pm rango intercuartil de tres experimentos independientes (* p <0,05; ** p <0,01, * p <0,001; ns: no significativo; test de Wilcoxon).**

Es importante señalar que la alteración en los niveles de las proteínas mitocondriales en tejido cardíaco de ratones fue coincidente con el pico de parasitemia a 21 dpi, mientras que no se modificaron a 42 dpi donde no se detectaron parásitos, a excepción de Mfn2 que disminuyó significativamente. A los 100 dpi se observó una leve disminución en las proteínas Drp1, Mfn2 y Cx43 (Fig. 2 B).

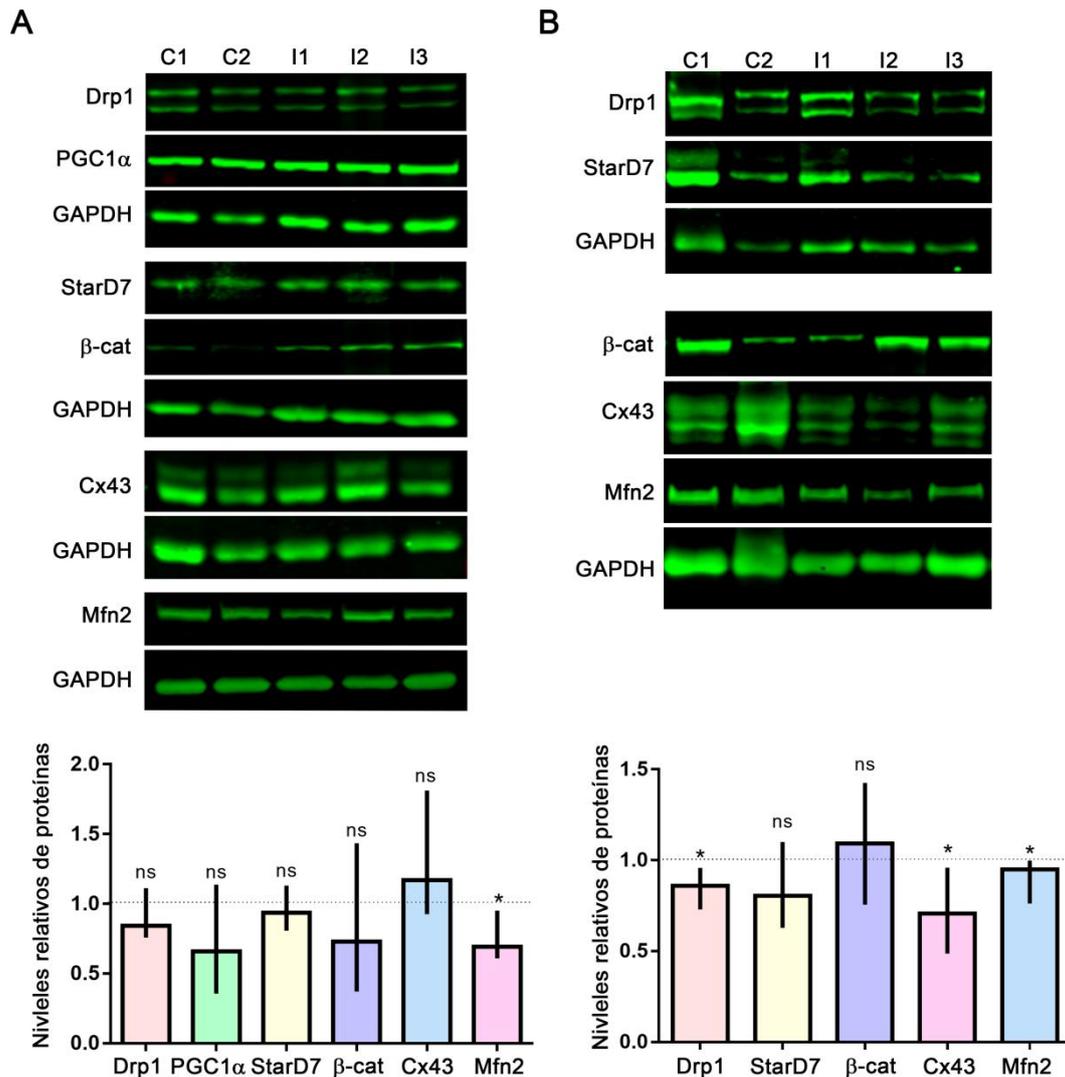


Figura 2. Expresión de Drp1, PC1α, StarD7, β-catenina, Cx43, Mfn2, en extractos proteicos provenientes de corazones de ratones BALB/c con *T.cruzi*. (A) 42 dpi o (B) >100 dpi. Las membranas se incubaron con anticuerpo anti-Drp1, anti-PGC1α, anti-StarD7, anti-β-catenina, anti-Cx43, anti-Mfn2 y anti-Mfn1, usando como control de carga anti-GAPDH. Los gráficos de barras muestran la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de las proteínas indicadas respecto al control normalizados con GAPDH. Se muestra la mediana ± rango intercuartil de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; ns: no significativo; test de Wilcoxon).

En línea con estos resultados, se reportó una reducción significativa en la expresión de las proteínas β -catenina y N-cadherina en cultivos de cardiomiocitos de embriones de ratón de 18 días de edad después de 72 horas de infección por *T. cruzi* (de Melo et al., 2008). Si bien varios reportes documentan alteraciones en la expresión de la proteína Cx43, en los ensayos realizados en este trabajo no se detectaron cambios significativos en las presentes condiciones experimentales, probablemente debido a las variaciones biológicas de las muestras analizadas. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que informa el efecto de la infección por *T. cruzi* en la expresión de Mfn2, Drp1 y StarD7.

En resumen, estos hallazgos revelan que la infección por *T. cruzi* impacta en la expresión de proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial que podrían contribuir a modificar la producción bioenergética comprometida de los cardiomiocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Construcción de plásmidos recombinantes

Para la construcción del plásmido pLentiStarD7.I, se amplificó mediante PCR el cDNA de StarD7I clonado en pcDNA3.1, provisto por el Dr. Horibata (Dokkyo Medical University School of Medicine, Japón), utilizando los primers *forward*: 5'G AAC CCA CTA GTCGAC TTA CTG GCT TAT CGA A3' y *reverse*: 5'AT CTG CAG TCTAGA TCA AGC ATA CTC AAT CCG3' que poseen sitios de restricción para las enzimas Sall (Invitrogen) y XbaI (Thermo Fisher), respectivamente.

De manera similar, se amplificó el cDNA de StarD7.II clonado en pPHAGE-CTAP, utilizando los primers *forward*: 5'AA CAA GTCGAC TTT GTA CAA AAA AAT GGC GG3' y *reverse*: 5'AT CTG CAG TCTAGA TCA AGC ATA CTC AAT CCG 3' que poseen sitios de restricción para las enzimas Sall y XbaI, respectivamente. Los productos de amplificación se clonaron en el vector TOPO TA (Invitrogen) y luego se subclonaron en los sitios Sall y XbaI del plásmido pLenti CMV TO puro empty (Addgene) para generar los plásmidos lentivirales pLenti-StarD7.I y pLenti-StarD7.II.

Por otra parte se realizaron las construcciones bicistrónicas pLenti-StarD7.I-IRES-EGFP y pLenti-StarD7.II-IRES-EGFP conteniendo un sitio IRES *upstream* de StarD7.I o StarD7.II y *downstream* el gen reportero que codifica a la proteína fluorescente EGFP.

Para obtener estos vectores, se amplificó mediante PCR el fragmento IRES-EGFP clonado en pLPCX-Cx43-IRES-EGFP, provisto por el Dr. Trond Aasen (Vall d'Hebron Institute of Research, UAB, España), utilizando los primers *forward*: 5'T GGT TCTAGA TAT CGA ATT CCT GC3' y *reverse*: 5'AGA TCTAGA TCA CTT GTA CAG CTC3' que poseen un sitio de restricción para la enzima XbaI. El producto amplificado se clonó en el vector TOPO TA y luego se subclonó en el vector pLenti-StarD7.I o pLenti-StarD7.II utilizando el sitio XbaI para generar los plásmidos pLenti-StarD7.I-IRES-EGFP y pLenti-StarD7.II-IRES-EGFP, respectivamente. Por otra parte, el plásmido pLenti-StarD7.I-IRES-EGFP se digirió con la enzima BamHI para liberar el fragmento conteniendo StarD7I y se religó para obtener el vector control pLenti-IRES-GFP. Las secuencias se verificaron por el servicio provisto por MacroGen (Korea).

Preparación de bacterias competentes KCM

Para generar bacterias competentes se utilizaron las cepas DH5alpha y StbI3, estas últimas se utilizaron para obtener los plásmidos lentivirales ya que reduce la frecuencia de recombinaciones homólogas de la repetición terminal larga (LTR) que se encuentran en estos vectores.

Partiendo de colonia única, las bacterias se crecieron en agitación en 5 ml de medio LB (Luria Bertani) líquido a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se tomó 1 ml de este cultivo, se inoculó 50 ml de medio LB líquido y se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 600. Una vez alcanzada la DO, el cultivo de bacterias se centrifugó a 1000 x g durante 10 min y se resuspendió en 5 ml de buffer TSB (LB pH 6,5; PEG MW3350 10%; DMSO 5%; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM). Las bacterias se alicuotaron con 10% de Glicerol y se congelaron a -80°C hasta su uso.

Transformación de bacterias competentes KCM

Se descongelaron 100 µL de las bacterias competentes y se dejaron en hielo durante 10 min. Paralelamente, se mezcló el ADN transformante con 40 µL de buffer KCM (KCl 0,5 M; CaCl₂ 0,15 M; MgCl₂ 0,25 M) filtrado y agua estéril hasta completar un volumen de 100 µL y se incubó durante 10 min en hielo. Luego se agregaron los 100 µL de las bacterias competentes, se agitó suavemente varias veces para mezclar bien el contenido y se dejó el tubo en hielo durante 30 min. Posteriormente se transfirió el tubo a un baño seco precalentado a 42°C durante 45 s. Luego, se agregó 800 µL de medio LB y se llevó el tubo a un agitador a 37°C dejándolo durante 1 h para permitir que las bacterias se recuperen y expresen el marcador de resistencia al antibiótico codificado por el plásmido. Finalmente, se sembraron 200 µL de células competentes transformadas en un medio de LB agar con el antibiótico apropiado. Se dejó la placa a temperatura ambiente hasta que el líquido haya sido absorbido y luego se la incubó en estufa a 37°C durante 12-16 h.

Purificación de plásmidos

Para tal fin se cultivaron las bacterias conteniendo el plásmido de interés en un frasco de 5 mL de LB durante toda la noche a 37°C con agitación. Posteriormente, se centrifugó 1-3 ml cultivo a 13000 rpm durante 30 s y se resuspendió el pellet celular en 100 µL de buffer de lisis celular mezclando por inversión 6 veces. Luego, se adicionó 350 µL de la solución de neutralización (4-8°C) y se mezcló vigorosamente por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a una minicolumna (Miniprep, PureYield PROMEGA) sin remover el pellet y se centrifugó la minicolumna a 13000 rpm durante 15 s. Se lavó la minicolumna con 200 µL de buffer para la eliminación de endotoxinas, centrifugando nuevamente a 13000 rpm durante 15 s. Se realizó un último lavado con 400 µL de la solución de lavado y se centrifugó durante 30 s. Finalmente, se realizó la elución del ADN plasmídico de la minicolumna con 40 µL de agua libre de nucleasas, dejando reposar durante 1 min a TA y luego se centrifugó durante 15 s a 13000 rpm. El ADN plasmídico se conservó a -20°C.

Purificación de ARN total de células eucariotas en cultivo

Para realizar la purificación de ARN, células crecidas en placas de 6 pocillos se lavaron dos veces con PBS 1X (solución salina de fosfatos) y se recogieron en 750 µL de TRIZOL (Invitrogen). A la suspensión de células se le agregó 150 µL de cloroformo y luego de 15 min de reposo a TA, se centrifugó 15 min a 12000 x g, a 4°C. La fase superior se transfirió a un nuevo tubo y el ARN se precipitó con 350 µL de isopropanol durante 10 min a TA. El pellet obtenido se centrifugó a 12000 x g 10 min a 4°C y se lavó con etanol 75% v/v. El ARN precipitado se secó a TA y se resuspendió en agua libre de ARNasas (Ambion). La cuantificación del ARN se obtuvo mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, sabiendo que 1 DO₂₆₀ equivale a 40 µg/ml de ARN. La pureza se evaluó mediante la relación de absorbancias obtenida a 260 nm *versus* a 280 nm leídas en el lector de multiplacas Biotek, considerándose valores aceptables entre 1,8 y 2. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Reacción de Transcriptasa Reversa

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1 µg de ARN purificado en un volumen final de 20 µL. Alícuotas conteniendo 1 µg de ARN se incubaron con 1 U/µL de RNAout (Invitrogen), inhibidor de ARNasas, 2 µL de buffer de reacción 1X (Tris-HCl -pH 8,3- 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), 12,5 pmoles/µL de una mezcla de hexadesoxinucleótidos de secuencias al azar (iniciadores de la transcriptasa reversa), DTT (10 mM) y H₂O. La mezcla se incubó a 65°C durante 15 min para destruir estructuras secundarias. Posteriormente se agregaron 0,2 µL dNTPs 1 mM y la enzima M-MLV transcriptasa reversa 10 U/µL (Invitrogen) y se incubó 10 min a 25°C y luego 50 min a 37°C. Finalmente se inactivó la reacción incubando a 95°C durante 3 min.

Semi-cuantificación del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los fragmentos de ADNc sintetizados por la reacción de la transcriptasa reversa se amplificaron por PCR. El número de ciclos utilizados se optimizó para que la amplificación de los transcritos se encontrara en el rango lineal. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa y se visualizaron utilizando SYBR safe.

El protocolo de amplificación para GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) incluyó: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido por 22-24 ciclos (dependiendo de la abundancia del transcripto a amplificar) de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C y un ciclo de 10 min a 72°C. La secuencia (5' - 3') de oligonucleótidos empleados para amplificar GAPDH es: *forward*, GGT GAA GGT CGG AGTC AAC G *reverse*: GAT CTC GCT CCT GGA AGA TGG.

PCR en tiempo real (qPCR)

La amplificación a tiempo real se realizó utilizando el equipo de Applied Biosystems (ABI 7500 SEquence Detection System) con el software de detección v1.4. Los experimentos se realizaron usando SYBRGreen PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems) utilizando los cebadores detallados en la **Tabla I** (Anexo) y 5 µL de una dilución 1/5 de ADNc en un volumen final de reacción de 15 µL. Las condiciones de ciclado incluyeron

un ciclo de desnaturalización de 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. La especificidad se evaluó a través del análisis de las curvas de disociación. Cada muestra se analizó por triplicado y el nivel de expresión relativa de los transcritos se calculó usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando el transcrito de ciclofilina A como gen de referencia endógeno. La eficiencia de amplificación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula matemática: $10^{-1/a}$ donde "a" es la pendiente de la curva estándar de cada transcrito amplificado. La eficiencia de amplificación de los productos de PCR fue cercana al 98%.

MÉTODOS DE BIOLOGÍA CELULAR

Cultivo de líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo de tesis fueron las siguientes:

- HEK-293T (Human Embryonic Kidney) (ATCC), línea celular derivada de células embrionarias de riñón humano establecida a partir de la transfección de células de riñón normal con el gen que codifica al antígeno T grande del virus 40 del simio.

- Células HTR-8/SVneo (provistas por el Dr. Charles Graham, Queen's University, Canadá), línea celular establecida a partir de células extravellosas de placenta humana de primer trimestre transfectadas con el gen que codifica al antígeno T grande del virus 40 del simio.

- Células C2C12 (provistas por el Dr. Antonio Zorzano, Institute for Research in Biomedicine, Barcelona), línea celular de mioblastos de ratón inmortalizada.

Las células HEK-293T y C2C12 se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), mientras que las células HTR-8/SVneo se cultivaron en DMEM/F12. Ambos medios de cultivo fueron suplementados con suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v) (Internegocios S.A., Buenos Aires, Argentina) y antibióticos: penicilina 100 µg/ml – estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen).

Cuando las células llegaron a una confluencia de 80-90% se tripsinizaron para ser repicadas o congeladas. Para repicar, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y posteriormente se trataron con 1 ml de tripsina 0,2% (p/v) 2 min a 37°C. Una vez desprendidas las células, se agregó 1 ml de medio suplementado con SFB al 10%. Posteriormente las células se dividieron de acuerdo al número de placas que se necesitaba o se congelaron gradualmente a – 80°C en SFB con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Para promover la diferenciación de las células C2C12, el medio suplementado con SFB al 10% se reemplazó por medio suplementado con suero de caballo al 2%.

Preparación de líneas celulares estables mediante transducción lentiviral

NOTA: Todas las tareas se deben realizar en una cabina de bioseguridad Tipo 2, en una instalación apropiada. Todos los residuos se deben desechar en un recipiente conteniendo lavandina 10%.

Para generar las partículas virales, mediante el empaquetamiento tanto de los plásmidos pLenti-StarD7.I, pLenti-StarD7.II o pLenti CMV TO puro empty como de los plásmidos pLKO.1 shRNA-StarD7, pLKO.1 empty o pLKO.1 shC002 se utilizaron células HEK-293T (**Tabla V**).

Se plaquearon 1×10^6 células HEK-293T en una placa de 100 mm, de manera de tener una confluencia de 50-60% al momento de transfectarlas.

Para generar las líneas que sobreexpresan establemente StarD7:

El día posterior al plaqueo se realizó la transfección de las células con los plásmidos pSPAX2 (*2nd generation lentiviral packaging plasmid*), pMD2.G (*VSV-G envelope expressing plasmid*) (Addgene) y el plásmido lentiviral mediante los siguientes pasos: se preparó la mezcla de transfección con 500 μ L del buffer del reactivo de transfección JetPRIME (Polypus Transfection), 2,5 μ g de pSPAX2, 0,5 μ g de pMD2.G y 2,5 μ g del vector lentiviral. La mezcla se agitó con vortex durante 10 s y luego se centrifugó a 10000 rpm durante 30 s. A continuación, se agregó 10 μ L del reactivo JetPRIME, se agitó nuevamente con vortex durante 30 s y centrifugó a 10000 rpm por 30 s. La mezcla se dejó reposar durante 15 min a TA y luego se añadió a la placa de cultivo con las células DMEM y SFB 10% completando un volumen final de 10 ml. Después de 16 h de transfección se cambió el medio adicionando 6 ml de medio completo (DMEM+SFB 10% + penicilina/estreptomicina). Luego de 48 h las partículas virales que se encontraban en el medio generadas para los vectores pLenti-StarD7.I, pLenti-StarD7.II o pLenti CMV TO puro empty se recogieron en un Falcon de 15 ml y se agregó a las células 6 ml de medio completo. El tubo Falcon se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min para separar las células muertas del sobrenadante. El sobrenadante se alicuotó en tubos eppendorf y se conservó hasta su uso a -80°C . Después de 24 h se repitió este último paso descartando la placa en la que se crecieron las células HEK-293T.

Para la transducción de las células HTR-8/SVneo y C2C12, se plaquearon $1,5 \times 10^5$ células en placas de 6 pocillos con medio DMEM/F12 durante 24 h. Al día siguiente, las células fueron transducidas con 200 μ L de sobrenadante viral de las células HEK293T conteniendo el vector vacío pLenti CMV TO puro empty, pLenti-StarD7.I o pLenti-StarD7.II en un volumen final de 1 ml conteniendo 8 μ g/ml Polybrene® (Santa Cruz Biotech).

Para generar las líneas que tienen disminuidos de manera estable los niveles de StarD7:

El día posterior al plaqueo se realizó la transfección de las células HEK-293T utilizando polietilenimina (PEI 40K), para lo cual se realizaron 2 mezclas de transfección, por un lado 90 μ l de PEI 40K con 100 μ l de NaCl 150 mM y por el otro 100 μ l de NaCl 150 mM con 5 μ g del plásmido pSPAX2, 5 μ g del pMD2.G y 5 μ g del plásmido pLKO.1 correspondiente y se incubó cada mezcla por 5 min. Luego, se juntaron las dos mezclas, se agitó con vortex durante 30 s, se dejó reposar durante 20 min a TA y se añadió a la placa con células Opti-MEM (31985070 Gibco) completando un volumen final de 10 ml.

Después de 16 h de transfección se cambió el medio adicionando medio completo (DMEM+SFB 10% + penicilina/estreptomicina). Los sobrenadantes virales conteniendo el vector vacío pLKO.1 shRNA-StarD7, pLKO.1 empty y pLKO.1 shC002 se recolectaron cada 24 h y se realizaron 3 transducciones consecutivas utilizando este medio suplementado con 8 μ g/ml Polybrene®.

En todos los casos, el sobrenadante viral finalmente se removió, se reemplazó con medio completo sin antibióticos y se dejó por 24 h para que las células se recuperen. Al día siguiente, se comenzó la selección con puromicina 1 μ g/ml, renovando el medio todos los días. Como control de selección se agregó una placa con células que no fueron infectadas. Las células que incorporaron el plásmido de interés crecieron normalmente, se pudieron repicar, congelar y/o recoger para los diferentes ensayos. De este modo, se obtuvieron las células HTR-8/SVneo y C2C12 que sobreexpresan de manera estable StarD7.I o StarD7.II o que tienen disminuidos de manera estable los niveles de StarD7.

Los niveles proteicos y/o de transcripto de StarD7 se evaluaron mediante *Western Blot* y/o qRT-PCR, respectivamente.

Transfección transiente con plásmidos de expresión

Las células HTR-8/SVneo se transfectaron con los plásmidos que expresan las proteínas recombinantes: pLenti-IRES-GFP, pLenti-StarD7.I-IRES-EGFP o pLenti-StarD7.II-IRES-EGFP (construidas en el laboratorio), pDrp1K38A, pEGFP-Drp1-S637D, o pEGFP-Drp1-S637A (provistas por el Dr Yi-Ren Hong, Department of Biochemistry, Kaohsiung, Taiwan) según el protocolo del reactivo Lipofectamina 3000 (Invitrogen). Para ello, se incubó durante 20 min la mezcla de transfección conteniendo los siguientes reactivos: 4 μ L de Lipofectamina 3000, 1,5 μ g de ADN plasmídico y 5 μ L del reactivo P3000 (Invitrogen) en 125 μ L de Opti-MEM. Posteriormente, se completó con 750 μ L con Opti-MEM suplementado con SFB 10%, y se agregó a las células previamente plaqueadas (60% de confluencia). Después de 6 h, se removió el medio y se agregó medio completo.

Silenciamiento de StarD7

Para silenciar post-transcripcionalmente la expresión del gen StarD7 se utilizó como herramienta el silenciamiento mediante siRNA (small interfering RNA). Para tal fin se utilizó el oligonucleótido siRNA-D7 (*Sense*: GGU AUA GUG UGG AUC AGG ATT y *Antisense*: UCC UGA UCC ACA CUA UAC CGC) correspondiente a la posición 1099-1117 (siD7) (Genbank NM_020151). Se utilizó como control negativo un siRNA scrambled (siC) (SilencerNegative™, AppliedBiosystems/Ambion).

El día previo al silenciamiento, células HTR-8/SVneo se recogieron mediante tripsinización, se contaron en cámara de Neubauer y se colocaron 1×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos con medio completo, de manera de tener a las 24 h una confluencia de 30-40%. Al día siguiente, se realizó una mezcla de transfección conteniendo los siguientes reactivos: 4 μ L de RNAiMax (# 13778100, Invitrogen) y 50 nM de siD7 o siC en 125 μ L de Opti-MEM y se incubó durante 20 min. La mezcla se agregó a las células plaqueadas a las que se les colocó 750 μ L de Opti-MEM completo y se cultivaron durante 48 h o 72 h renovando el medio cada 24 h.

Análisis de la morfología mitocondrial

Para el análisis de la morfología mitocondrial se utilizó el marcador mitocondrial MitoTracker Deep Red (M22426, Thermo Fisher Scientific). Este es un colorante catiónico, lipofílico, fluorescente y específico de mitocondria, cuando ingresa como forma reducida no fluorescente es oxidado dentro de la mitocondria reaccionando con los grupos tioles de las proteínas mitocondriales, de forma específica e irreversible. Las líneas celulares estables se incubaron con MitoTracker Deep Red 150 nM por 10 min en estufa a 37°C con 5% de CO₂ y luego se lavaron con PBS 1X. Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal (Olympus FluoView FV1000 o Zeiss LSM780) a 60x, las que se analizaron con el software ImageJ. Las células se clasificaron según su morfología mitocondrial en: tubulares; >50% tubulares; <50% tubulares; o fragmentadas siguiendo el criterio de (Song et al., 2007). Al menos 40 células fueron analizadas en las diferentes líneas celulares, en tres experimentos independientes. Por otra parte, se cuantificó la morfología mitocondrial mediante el cálculo del índice MFC (*Mitochondrial Fragmentation Count*). Para esto, se generó una máscara del área mitocondrial mediante ImageJ utilizando la señal de Mitotracker y se cuantificó el número de partículas en la misma de igual modo que en (Rehman et al., 2012), en donde:

$$MFC = \frac{\text{número de partículas}}{\text{pixeles mitocondriales totales}}$$

Análisis de la fusión mitocondrial

Para evaluar si las mitocondrias de las células HTR-8/SVneo estables para StarD7.1 eran capaces de fusionar en el tiempo, se realizó una co-transfección con los plásmidos mitocondriales mito-PA-EGFP y DsRed-mito (provistos por el Dr. Alex Saka, CIBICI), siguiendo el protocolo descrito por (Zunino et al., 2007). El plásmido mito-PA-EGFP es un plásmido fotoactivable en una longitud de onda de 405 nm (UV) y su fluorescencia es estable en el tiempo. Esto, permitió determinar si la fluorescencia se dispersaba o no por las mitocondrias desde la región excitada inicialmente gracias a eventos de fusión mitocondrial. Para esto, se plaquearon 2×10^5 células en una placa de 6 pocillos y al día

siguiente se realizó la transfección utilizando el reactivo JetPrime y 1,5 μg de cada plásmido siguiendo el protocolo antes mencionado. Luego de 24 h, las células transfectadas se tripsinizaron y se plaquearon 5×10^4 células en una cámara LabTek de borosilicato (NUNC). A las 24 h las células se observaron en el microscopio confocal (FluoView FV1200 Olympus) y las imágenes se registraron utilizando el objetivo 60x. A lo largo del análisis, las células se mantuvieron en un ambiente con 5% CO_2 a 37°C. Las mitocondrias se fotoactivaron en una región de interés (ROI) por 1 ciclo usando 2% del láser de 405-nm. Inmediatamente después de la fotoactivación, se adquirieron las imágenes a tiempo inicial, 30 min y 60 min post-fotoactivación utilizando los láseres de 488-nm y 594-nm, tomando imágenes de los diferentes planos (*Step size* 0.32 μm).

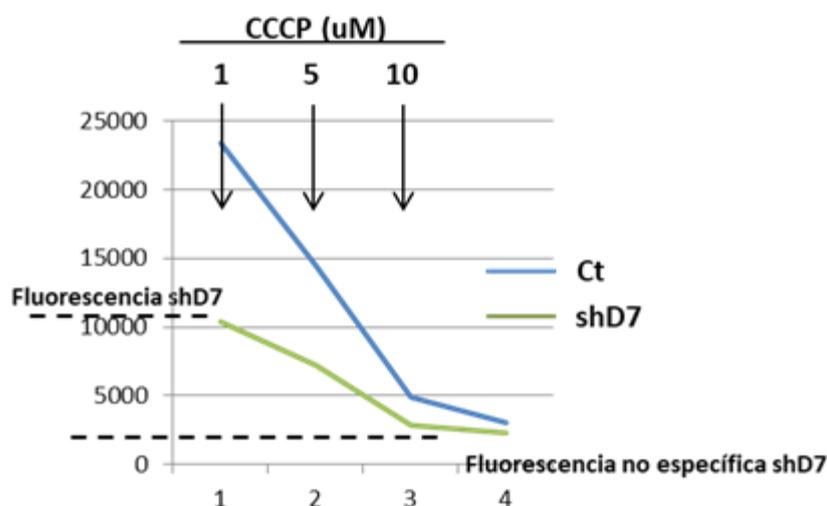
El área total de las mitocondrias se obtuvo generando umbrales en los diferentes planos utilizando el software ImageJ, tanto para la señal de DsRed-mito como para la señal PA-EGFP. Las áreas fotoactivadas se compararon a los distintos tiempos relativizando sus valores al área inicial fotoactivada.

Determinación del potencial de membrana mitocondrial

Para determinar el $\Delta\Psi\text{m}$ en las células HTR-8/SVneo estables para StarD7.I se utilizó el reactivo JC-1 (5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide). El colorante JC-1 exhibe una acumulación dependiente del $\Delta\Psi\text{m}$, indicada por un cambio de emisión de fluorescencia de verde (~ 529 nm) a roja (~ 590 nm). La fluorescencia roja indica que las mitocondrias poseen un $\Delta\Psi\text{m}$ saludable, mientras que un incremento en la señal verde indica que las células poseen un $\Delta\Psi\text{m}$ alterado. Para evaluar el $\Delta\Psi\text{m}$, se plaquearon 1×10^5 células estables para StarD7.I y células estables para el vector vacío (Ct) en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se realizó un lavado con PBS 1X, se agregó 2 μM del reactivo JC-1 (Beyotime Institute of Biotechnology) y se incubó durante 20 min en estufa a 37°C con 5% CO_2 y en oscuridad. Como control positivo de despolarización se usó un tratamiento con 50 μM CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) durante 30 min previo a la incubación con JC-1. Finalizado ese tiempo, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X, se resuspendieron en 100 μL de PBS

1X y la señal fluorescente se adquirió por citometría (FACSCanto II, Becton-Dickinson). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.6.2.

Alternativamente, se evaluó el $\Delta\Psi_m$ en las células C2C12 estables utilizando el reactivo TMRM (T668, Invitrogen). Para esto se sembraron 1×10^5 células por pocillo en placas de 12 pocillos. Al día siguiente, se incubaron las células solo con 100 nM de TMRM y por otro lado se incubaron otros pocillos con 100 nM TMRM más 1 μ M, 10 μ M ó 20 μ M CCCP durante 30 min en estufa a 37°C con 5% CO₂. Luego, las células se lavaron con PBS 1X, se colectaron en 100 μ L de PBS 1X y la señal fluorescente se adquirió por citometría (Gallios, Beckman Coulter). El $\Delta\Psi_m$ para cada condición se calculó restando la fluorescencia no específica que se obtuvo al tratar las células con el desacoplante de membrana mitocondrial CCCP.



$$\Delta\Psi \text{ mitocondrial} = \text{Fluorescencia TMRM} - \text{Fluorescencia no específica}$$

Detección de las especies reactivas del oxígeno

Los niveles de ERO intracelular total se midió utilizando el reactivo H₂DCFDA (diclorodihidro-fluoresceína diacetato) (D399, Invitrogen). Una vez que el reactivo ingresa a las células, los grupos acetilos de la H₂DCFDA son clivados por las esterasas celulares dando lugar a un compuesto que rápidamente es oxidado por las ERO. Este compuesto oxidado, es fluorescente (DCF) y puede ser detectado por citometría de flujo. Para

realizar el ensayo, se plaquearon 1×10^5 células HTR-8/SVneo (siC, siD7, Ct o D7.I) en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, se incubaron con $10 \mu\text{M}$ de H2DCFDA durante 40 min en estufa a 37°C con 5% CO_2 y en oscuridad. Luego, las células se lavaron con PBS 1X, se colectaron en $100 \mu\text{L}$ de PBS 1X y la señal fluorescente se adquirió por citometría (FACSCanto II, Becton-Dickinson).

Por otra parte, para cuantificar las ERO mitocondriales se utilizó el reactivo MitoSox (M36008, Invitrogen). Las células HTR-8/SVneo (Ct o D7.I) se incubaron con $5 \mu\text{M}$ de MitoSox en DMEM sin rojo fenol (21063-029, Gibco) a 37°C durante 30 min en oscuridad. Finalizado ese tiempo, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min, se resuspendieron en $100 \mu\text{L}$ de PBS 1X y la señal fluorescente se adquirió por citometría (FACSCanto II, Becton-Dickinson o Gallios, Beckman Coulter). Como control positivo se utilizó $5 \mu\text{M}$ de rotenona (R8875, Sigma Aldrich) que se incubó junto con MitoSox.

En ambos casos los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.6.2.

Medición de la masa mitocondrial

Para cuantificar la masa mitocondrial se utilizó el marcador mitocondrial Mitotracker Green FM (M7514, Thermo Fisher Scientific). Se plaquearon 1×10^5 células C2C12 (shCt o shD7) en una placa de 12 pocillos y al día siguiente se incubaron con 50 nM de MitoTracker Green durante 15 min en estufa a 37°C con 5% de CO_2 en oscuridad. Posteriormente se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en $100 \mu\text{L}$ de PBS 1X y la señal fluorescente se adquirió por citometría (Gallios, Beckman Coulter). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.6.2.

Medición de la captación de glucosa

Para medir los niveles de captación de glucosa en las líneas estables C2C12, se plaquearon 1×10^5 células por pocillo en una placa de 12 pocillos. Al día siguiente, se cambió el medio por DMEM baja glucosa (DMEM sin glucosa+ 5 mM Glucosa+ BSA 1%+ 4 mM glutamina) y se dejó toda la noche. A las 16 h se retiró el medio y se lavó 2 veces con PBS 1X. Se agregó $300 \mu\text{M}$ de 2 NBD-Glucosa (N13195 Invitrogen) en DMEM sin

glucosa con 4 mM glutamina y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ durante 30 min. Luego se lavaron 2 veces con PBS 1X frío, se resuspendieron en 100 µL de PBS 1X y la señal fluorescente se adquirió por citometría (Gallios, Beckman Coulter). Los datos se analizaron utilizando el Software FlowJo 7.6.2.

Cuantificación de producción de ATP

Para medir los niveles de ATP en las células C2C12 shCT, shD7, D7.I y D7.II se plaquearon 1x10⁵ células por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio DMEM completo o en medio DMEM sin glucosa con galactosa (10 mM galactosa + 1 mM piruvato + 4 mM glutamina+ 10% SFB). Al día siguiente, se lavaron con PBS 1X frío 2 veces y se levantaron las células de cada pocillo en 100 µl de ATP buffer (100 mM Tris-HCL pH 7.75, 4 mM EDTA) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras se hirvieron durante 3 min y luego se colocaron en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante se utilizó para medir ATP siguiendo el protocolo utilizado descrito en el *ATP Determination kit* (A22066 Molecular Probes, Invitrogen) y con el pellet se cuantificaron los niveles de proteína (23225 Pierce™ *BCA Protein Assay Kit*). La enzima luciferasa, se combina con el ATP para producir luz mediante la siguiente reacción:



La medición se realizó en un luminómetro de tubo colocando 100 µL de la solución luciferasa (3,56 mL dH₂O, 0,2 ml 20X *Reaction Buffer* (Componente E), 0,1 ml 0,1 M DTT, 0,5 mL 10 mM *D-luciferin* y 2,5 µl de *Firefly luciferasa*) y 5 µL de la muestra. El nivel de ATP se expresó en Unidades Relativas de Luz (URL) producida en la reacción.

Medición de lípidos neutros

Para cuantificar lípidos neutros mediante citometría de flujo y microscopía confocal se utilizó la sonda BODIPY 495-503 (D392, Invitrogen). Para el ensayo realizado por citometría, se plaquearon 2x10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos con medio completo. Al día siguiente, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS 1X y se

incubaron con 2 μ M BODIPY en PBS 1X a 37°C durante 15 min en oscuridad. Luego, se lavaron las células con PBS 1X y se tripsinizaron neutralizando luego con PBS 1X. Se centrifugaron a 250 x g durante 5 min a 4 °C, el pellet se resuspendió en 100 μ L de PBS 1X y la señal fluorescente se adquirió por citometría (FACSCanto II, Becton-Dickinson). Se usó como control positivo para inducir la formación de lípidos neutros un tratamiento ON con 60 μ M de ácido oleico BSA (1:5) en DMEM suplementado sin SFB.

Por otra parte para el ensayo realizado por microscopía, se plaquearon 2×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos con cubreobjetos. Al día siguiente, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS 1X y se incubaron con 2 μ M BODIPY en PBS 1X a 37°C durante 15 min en oscuridad. Las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con 4% paraformaldehído durante 30 min a TA y finalmente se incubaron con Hoechst 33258 para marcar los núcleos. Luego se montaron en un portaobjetos con *Fluoromount Aqueous Mounting Medium* (F4680, SIGMA) y al día siguiente se tomaron las imágenes por microscopía confocal (Zeiss LSM780).

Medición de PC utilizando Bodipy-PC

Para cuantificar la cantidad de fosfatidilcolina mitocondrial en las células HTR-8/SVneo Ct y D7.I se utilizó la sonda BODIPY-FL-C5-HPC (Invitrogen). Las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron a 37°C con 150 nM de MitoTracker Deep Red en DMEM sin SFB durante 30 min. Luego, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con vesículas lipídicas conteniendo 1 μ M de fosfolípidos totales de los cuales 40 % correspondía a BODIPY y 60% a C17:0 PC (*1,2 diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Avanti Polar Lipids*) en DMEM sin SFB con BSA durante 30 min. Después, se lavaron con PBS 1X, se fijaron en 4% PFA durante 30 min a TA y se tomaron imágenes por microscopía confocal. El área total de las mitocondrias se obtuvo generando umbrales para la señal de Mitotracker utilizando el software ImageJ y se cuantificó la intensidad de la señal de BODIPY-PC correspondiente al área mitocondrial. Por otra parte, para calcular la Intensidad de PC mitocondrial relativa al área se cuantificó el área mitocondrial.

Medición de la función glicolítica, OCR y del contenido de ATP mitocondrial/ glicolítico

Para evaluar la función glicolítica en células C2C12 Ct y shD7 se utilizó el analizador de acidificación extracelular (ECAR) SeaHorse XFe 24 (Agilent). El día previo a la medición, se plaquearon 2×10^4 células por pocillo en una placa de 24 pocillos (Agilent) con DMEM suplementado y por otro lado se dejó hidratando el cartucho sensor con *Agilent XF Calibrant* (Agilent) a 37°C ON. Al día siguiente, se reemplazó el medio donde fueron plaqueadas las células por medio sin glucosa ni piruvato y se incubaron durante 1 h. Se comenzó la medición colocando ambas placas en el equipo, se midió la acidificación del medio que indicó los niveles de acidificación no-glicolítica de las células. Luego de 20 min, se inyectó glucosa a una concentración final por pocillo de 10 mM, ésta ingresa a las células y se cataboliza rápidamente vía glicólisis aumentando la liberación de protones y produciendo un aumento en la acidificación del medio indicando el estado de la **glicólisis basal** de las células. A los 50 min, se realizó la segunda inyección a una concentración final por pocillo de 1 μ M de oligomicina A (75351, Sigma Aldrich), inhibidor de la ATP sintasa, que inhibe la producción de ATP mitocondrial forzando a la célula a producir energía solo a través de la glicólisis. Esto permite determinar la **capacidad glicolítica** de las células. Por último, se inyectó a una concentración final de 50 mM 2-Desoxi-D Glucosa (2DG) (D8375, Sigma Aldrich), análogo de la glucosa que se une a la enzima hexoquinasa inhibiendo la glicólisis y produciendo una caída en la acidificación del medio que sirve para controlar que los valores que se obtuvieron previamente corresponden a la acidificación del medio debido a la actividad glicolítica.

A partir de los valores obtenidos y aplicando las siguientes ecuaciones se calculó el ATP mitocondrial y el ATP glicolítico, donde:

(1)

$$\mathbf{glycoATP\ Production\ Rate} \text{ (pmol ATP/min)} = \mathbf{glycoPER} \text{ (pmol H +/min)}$$

(2)

$$\mathbf{glycoPER} \text{ (pmol H +/min)} = \mathbf{PER} \text{ (pmol H +/min)} - \mathbf{mitoPER} \text{ (pmol H +/min)}$$

En donde PER:

(3)

$$\begin{aligned} \mathbf{PER} \text{ (pmol H } +/\text{min)} \\ = \mathbf{ECAR} \text{ (mpH/min)} \times \mathbf{BF} \text{ (mmol H} \\ +/\text{L/pH)} \times \mathbf{Vol XF microchamber} \text{ (}\mu\text{L)} \times \mathbf{Kvol} \end{aligned}$$

Siendo BF el factor buffer y representa la capacidad buffer del sistema y Kvol una constante que para el SeaHorse Xfe24 es 1,1.

(4)

$$\mathbf{mitoPER} \text{ (pmol H } +/\text{min)} = \mathbf{mitoOCR} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} \times \mathbf{CCF} \text{ (pmol H } +/\text{pmol O}_2\text{)}$$

Siendo CCF el factor contribución del CO₂ = 0,60

(5)

$$\mathbf{mitoOCR} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} = \mathbf{OCR basal} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} - \mathbf{OCR (Rot/AA)} \text{ (pmol O}_2\text{/min)}$$

El OCR acoplado a la producción de ATP durante la fosforilación oxidativa puede calcularse como el OCR que es inhibido al agregar el inhibidor de la ATP sintasa oligomicina:

(6)

$$\mathbf{OCRATP} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} = \mathbf{OCR basal} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} - \mathbf{OCR Oligo} \text{ (pmol O}_2\text{/min)}$$

(7)

$$\begin{aligned} \mathbf{mitoATP Production Rate} \text{ (pmol ATP/min)} = \\ \mathbf{OCRATP} \text{ (pmol O}_2\text{/min)} \times \mathbf{2} \text{ (pmol O/pmol O}_2\text{)} \times \mathbf{P/O} \text{ (pmol ATP/pmol O)} \end{aligned}$$

Donde P/O = 2,75. Entonces:

(8)

$$\begin{aligned} \mathbf{ATP Production Rate} \text{ (pmol ATP/min)} = \\ \mathbf{glycoATP Production Rate} \text{ (pmol ATP/min)} + \mathbf{mitoATP Production Rate} \text{ (pmol ATP/min)} \end{aligned}$$

Microscopía electrónica

Las células HTR-8/SVneo D7.I o Ct se cultivaron durante 24 h en placas de 100 mm. Al día siguiente se lavaron con PBS 1X, se tripsinizaron y se colocaron en tubos eppendorf, manteniéndolos siempre en frío. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X, se centrifugaron a 1000 rpm 5 min y el pellet de cada condición se sumergió en la solución de fijado.

Para la obtención de las imágenes se contrató el servicio que brinda el Centro de Microscopía de la Facultad de Ciencias Médicas, donde funciona un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906-E. Posteriormente las imágenes se analizaron con la ayuda de la Dra. Ana De Paul especialista en el tema.

Por otra parte, las imágenes correspondientes a células C2C12 Ct, shD7, D7.I y D7.II fueron obtenidas en el microscopio de transmisión electrónica JEOL jem 1010 100Kv (Unidad de Crio-Microscopía Electrónica, Parc Cientific de Barcelona).

Ensayo de reparación de la herida

Se trabajó con monocapas confluentes de células HTR-8/SVneo Ct o D7.I cultivadas durante 48 h. Transcurrido ese tiempo se realizó sobre la monocapa una herida con una punta estéril fina, la monocapa se lavó 3 veces cuidadosamente con PBS 1X para sacar las células que se desprendieron y se colocó medio suplementado. Se realizaron 3 heridas por pocillo en una placa de 6 pocillos. Después de lavar las células, se obtuvieron imágenes mediante microscopio invertido con contraste de fase (20X, Leica DMI8) y mediante la memoria de la platina motorizada se guardaron las coordenadas de la localización de la herida para después de 8 h obtener la imagen exacta de la herida analizada a tiempo "0". Finalmente las imágenes se analizaron mediante el programa ImageJ para determinar el área de la herida correspondiente a los tiempos de observación a las 0 h (t0), 4 h (t4) y 8 h (t8). Los resultados se expresaron en porcentaje de tamaño de la herida relativo al tamaño de herida del tiempo inicial.

MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Detección inmunológica de proteínas transferidas a soporte sólido: *Western blot*

Las muestras a analizar se prepararon en buffer de Laemmli (Tris-HCl mM pH: 6,8, glicerol 10%, dodecilsulfato sódico 2%, 2-β-mercaptoetanol 1% y azul de bromofenol 0,002%), luego se calentaron 5 min a 90°C en baño seco. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10%, durante 60 min a 150 V en buffer de corrida (25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina y 1% de SDS p/v). Una vez terminada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Bioscience) mediante transferencia húmeda (buffer de transferencia Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375% p/v, metanol 20% v/v, pH: 9,2) durante 60 min a 100 V. Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo Ponceau (rojo Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%, ácido sulfosalicílico 3%) y se lavó con abundante agua destilada. El perfil proteico obtenido permite determinar la cantidad y la calidad de la transferencia de las proteínas a la membrana. Finalmente, la membrana se decoloró mediante lavados con TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH: 7,8), y se bloqueó con leche descremada 5% p/v en TBS 0,02% v/v Tween-20 (TBS-T) durante 1 h a TA, con agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 1 hora a TA, o toda la noche a 4°C con agitación. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS 1X o en leche 5% p/v en TBS-T. Luego, se realizaron 2 lavados de 5 min en agitación con TBS-T y un lavado con agitación con TBS 1X. La membrana se incubó 1 h a TA con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado (IRDye LI-COR) dilución 1/15000 en TBS 1X, anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón durante 1 h a TA con agitación suave. Por último se realizaron 2 lavados con TBS-T y un lavado con TBS 1X, ambos con agitación. La señal se observó y analizó en el equipo lector Odyssey Clx a través del software Image Studio. Las características generales de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de *Western blot* se detallan en las **Tablas II y III** del Anexo, respectivamente.

Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron en placas LabTek de 8 pocillos a baja confluencia por 24 h. Al día siguiente, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con el marcador mitocondrial MitoTracker Deep Red siguiendo el procedimiento antes descrito. Finalizada la incubación, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron con metanol frío 10 min a 4°C. Luego, se lavaron con PBS 1X, se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 (0,01% v/v en PBS 1X) durante 7 min y se lavaron 3 veces con PBS 0,02% v/v Tween-20 (PBS-T). Posteriormente, se incubaron con suero de cabra 2,5% v/v (Sigma-Aldrich) en PBS-T, y luego con gelatina de piel de pescado 0,4% p/v en PBS-T, durante 15 min a TA en cada incubación. Los anticuerpos primarios se centrifugaron a 12000 rpm 10 min y se diluyeron en gelatina de piel de pescado (Sigma-Aldrich) 0,4% p/v. Se utilizó una dilución 1/50 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Drp1 (sc-271583, Santa Cruz Biotechnology). Se incubaron durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS-T (5 min/vez) y se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón o de conejo (Alexa Fluor 488 o 594, Molecular Probes) en suero de cabra 2,5% en PBS-T con una dilución final de los anticuerpos en 1/720, durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron 5 veces, (5 min/vez) con PBS-T. Finalmente, se agregó PBS 1X y las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de su análisis. Para las otras inmunofluorescencias, las células se plaquearon sobre cubreobjetos, que se levantaron al día siguiente y se fijaron con metanol frío 10 min a 4°C. Luego se procedió de igual manera utilizando una dilución 1/50 del anticuerpo anti-StarD7 o 1/50 del anticuerpo anti-miogenina (556368, BD Pharmingen) y se montaron en un portaobjetos con Mowiol 4-88 (**Tabla IV**). Las imágenes de inmunofluorescencia se visualizaron en el microscopio de epifluorescencia a 40X (Leica DMI8), en microscopio confocal a 40x (Zeiss LSM780) o a 60X (Olympus FLuoview FV1200).

Análisis de proliferación celular

Se evaluó la proliferación celular mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) al ADN de células en división (en la fase S). Las células HTR-8/SVneo Ct y D7.I se cultivaron sobre cubreobjetos y se expusieron a 20 μ M de BrdU (Molecular probes) por 8 h. Finalizado ese tiempo, se lavaron tres veces con PBS 1X, se fijaron 10 min en 3% de PFA, y se lavaron tres veces con PBS 1X. Las células se permeabilizaron durante 10 min con Tritón X-100 0,1% en PBS, se lavaron con PBS-T, se trataron con HCl 2 N a 37°C durante 30 min para desnaturalizar el ADN, se lavaron dos veces (5 minutos/vez) con NaB_4O_7 0,1 M (pH 8,5) para neutralizar, y luego tres veces con PBS-T. Posteriormente se trataron con PBS-T conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) 2% y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Sigma) a una dilución 1:100 en PBS-T con BSA 1%, durante 1 h a 37°C. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS-T y se incubaron 1 h a 37°C con anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 1:720 en PBS-T con BSA 1%, posteriormente se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258. Las células se lavaron tres veces (5 minutos/vez) con PBS-T y los cubreobjetos se montaron en porta objetos en medio acuoso de montar (MOWIOL). Finalmente se tomaron fotos al azar a 200X, por condición, en el microscopio de epifluorescencia (Leica DMI8) y se cuantificó el porcentaje de núcleos en proliferación (en rojo) respecto al número de núcleos totales (en azul).

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para el análisis de los experimentos los datos se analizaron mediante tests paramétricos y no paramétricos. Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para identificar la distribución que presentaban los datos.

Los datos no paramétricos se representan como la mediana y el rango intercuartilo. Los datos que presentaron distribución Gaussiana se graficaron como la media \pm SEM.

Para los datos con distribución paramétrica las diferencias significativas entre la condición del control y la del ensayo se analizaron mediante la prueba *one-way* ANOVA, *t-test* o *One-sample t test*, asignando en este último a la condición control el valor de 1 o

100 dependiendo el caso. En cuanto a los datos con distribución no paramétrica se utilizó el test de Mann Whitney o Wilcoxon. Se tomó como valor de significancia $p \leq 0,05$. Todos los gráficos se realizaron empleando el software GraphPad Prism 7.

ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla I. Secuencia y concentración de los cebadores empleados en los ensayos de qRT-PCR

Transcripto/Proteína	Secuencia 5`-3`	Concentración (nM)
<i>StarD7/StarD7</i>	F: GGTAATCAAGCTGGAGGTGATTG	100
	R: GAGTACATTGGATAAGGAAAATGGGT	100
<i>PPIA/Ciclofilina</i>	F: GTCAACCCACCGTGTCTT	200
	R: CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT	200
<i>MFN2/Mitofusina 2</i>	F: AATCTGAGGCGACTGGTGAC	150
	R: CTCCACCAGTCCTGACTTCAC	150
<i>MFN1/Mitofusina 1</i>	F: AGTTGGAGCGGAGACTTAGC	200
	R: ATCGCCTTCTTAGCCAGCAC	200
<i>DRP1/Dynamain Related Protein 1</i>	F: ACCCGGAGACCTCTCATTCT	200
	R: TCTGCTTCCACCCATTTTCT	200

Tabla II. Características generales de los anticuerpos primarios empleados en los ensayos de *Western blot* y detalles experimentales

Proteína	Anticuerpo	Dilución
	Especie/Compañía	
StarD7	Policlonal de conejo (0,5 µg/ml)/ nuestro laboratorio	1/500
α-tubulina	Monoclonal (Clone B-5-1-2) de ratón/Sigma Co.	1/2000
Mfn2	Monoclonal de ratón (XX-1) / Santa Cruz Biotech.	1/300
Mfn1	Monoclonal de ratón (D-10) /Santa Cruz Biotech.	1/300
DRP1	Monoclonal de ratón (C-5)/Santa Cruz Biotech.	1/300
PGC1- α	Policlonal de ratón (H-300) /Santa Cruz Biotech.	1/300

Tabla III. Características generales de los anticuerpos secundarios empleados en los ensayos de *Western blot* y detalles experimentales

Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía
Anti Ig de conejo IRDye 800CW	1/15000	LiCor Biosciences
Anti Ig de ratón IRDye 680CW	1/15000	LiCor Biosciences

TablaIV. Características generales de los anticuerpos empleados en los ensayos de inmunofluorescencia y detalles experimentales

Proteína	Anticuerpo (Especie/Compañía)	Dilución
StarD7	Primario. Policlonal de conejo (0,5 µg/ml)/ nuestro laboratorio.	1/50
DRP1	Primario. Monoclonal de ratón (C-5)/Santa Cruz Biotech.	1/50
Miogenina	Primario. Monoclonal de ratón. 556358. BD Pharmingen.	1/50
BrDU	Primario. Monoclonal de Ratón. B2531. Sigma.	1/100
	Secundario de Conejo. Alexa Fluor 488. Molecular Probes.	1/720
	Secundario de Ratón. Alexa Fluor 488. Molecular Probes.	1/720
	Secundario de Ratón. Alexa Fluor 594. Molecular Probes.	1/720

Tabla V. Características generales de los plásmidos empleados

Plásmido	Vector	Origen
pLenti-CMV-TO	Vector viral para la expresión y depleción de proteínas en células de mamíferos.	Addgene
pLenti StarD7.I	pLenti-CMV-TO conteniendo la secuencia del gen que codifica a StarD7.I	Construido en este trabajo
pLenti StarD7.II	pLenti-CMV-TO conteniendo la secuencia del gen que codifica a StarD7.II	Construido en este trabajo
pCR2.1-TOPO	Vector de clonado para productos de PCR.	Promega
pcDNA3.1-StarD7.I	pcDNA3.1 conteniendo la secuencia que codifica al gen StarD7.I	(Horibata and Sugimoto, 2010)
pLPCX-Cx43-IRES-EGFP	Vector pLPCX para transfección o infección retroviral de células de mamíferos conteniendo los genes que expresan Cx43 y EGFP separadamente.	(Salat-Canela et al., 2014)
pLenti-StarD7.I-IRES-EGFP	pLenti-CMV-TO para transfección o infección viral de células de mamíferos conteniendo los genes que expresan StarD7.I y EGFP separadamente.	Construido en este trabajo
pLenti-StarD7.II-IRES-EGFP	pLenti-CMV-TO para transfección o infección viral de células de mamíferos conteniendo el gen que expresan StarD7.II y EGFP separadamente	Construido en este trabajo
pLenti-IRES-EGFP	pLenti-CMV-TO para transfección o infección viral de células de mamíferos conteniendo el gen que expresa EGFP	Construido en este trabajo
pLKO.1 Empty	Vector lentiviral para clonar y expresar secuencias shRNA de mamíferos	Sigma Mission shRNA Library. IRB.
pLKO.1 shC002	Vector lentiviral cuya secuencia no está dirigida contra genes conocidos de mamíferos	Sigma Mission shRNA Library. IRB.
pLKO.1 shD7- Ratón	pLKO.1 shRNA dirigido contra la región codificante de StarD7 de Ratón	Sigma Mission shRNA Library. IRB.
pLKO.1 shD7-Humano	pLKO.1 shRNA dirigido contra la región codificante de StarD7 de Humano	Sigma Mission shRNA Library. IRB.

pSPAX2	Plásmido de empaquetamiento lentiviral de 2da. Generación.	Addgene
pMD2.G	Plásmido que expresa la proteína de cubierta VSV-G.	Addgene
Drp1K38A	Plásmido conteniendo la secuencia que codifica al gen DRP1 que posee una mutación en el sitio de hidrólisis de GTP	Addgene
pEGFP-Drp1-S637D	Plásmido conteniendo la secuencia que codifica al gen DRP1 que posee una mutación en el sitio de fosforilación en la serina 637 que le otorga actividad foto mimética.	(Chou et al., 2012)
pEGFP-Drp1-S637A	Plásmido conteniendo la secuencia que codifica al gen DRP1, que posee una mutación en el sitio de fosforilación en la serina 637 impidiendo la fosforilación de ese sitio.	(Chou et al., 2012)
mito-PA-EGFP	Plásmido dirigido a la matriz mitocondrial que expresa una versión fotoactivable de proteína GFP.	Dr. Alex Saka
DsRed-Mito	Plásmido dirigido a la matriz mitocondrial que expresa DsRed.	Dr. Alex Saka

BIBLIOGRAFÍA

- Aghamaleki, F.S., Mollashahi, B., Nosrati, M., Moradi, A., Sheikhpour, M., Movafagh, A., 2019. Application of an artificial neural network in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cureus* 11.
- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B., Kumar, M., Micheal, A., Mabalirajan, U., Ghosh, B., 2013. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell death & disease* 4, e461-e461.
- Alpy, F., Tomasetto, C., 2005. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *Journal of cell science* 118, 2791-2801.
- Alpy, F., Tomasetto, C., 2014. START ships lipids across interorganelle space. *Biochimie* 96, 85-95.
- Amaral, L.M., Cunningham Jr, M.W., Cornelius, D.C., LaMarca, B., 2015. Preeclampsia: long-term consequences for vascular health. *Vascular health and risk management* 11, 403.
- Ana, Y., Marquez, J.R., Fozzatti, L., Baigorri, R., Marin, C., Maletto, B., Cerbán, F., Radi, R., Piacenza, L., Stempin, C., 2021. An exacerbated metabolism and mitochondrial reactive oxygen species contribute to mitochondrial alterations and apoptosis in CD4 T cells during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. *Free Radical Biology and Medicine* 163, 268-280.
- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., Langer, T., 2014. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *Journal of Cell Biology* 204, 919-929.
- Andzelm, M.M., Cherry, T.J., Harmin, D.A., Boeke, A.C., Lee, C., Hemberg, M., Pawlyk, B., Malik, A.N., Flavell, S.W., Sandberg, M.A., 2015. MEF2D drives photoreceptor development through a genome-wide competition for tissue-specific enhancers. *Neuron* 86, 247-263.
- Angeletti, S., Maggio, B., Genti-Raimondi, S., 2004. Surface activity and interaction of StarD7 with phospholipid monolayers. *Biochemical and biophysical research communications* 314, 181-185.
- Angeletti, S., Rena, V., Nores, R., Fretes, R., Panzetta-Dutari, G., Genti-Raimondi, S., 2008. Expression and localization of StarD7 in trophoblast cells. *Placenta* 29, 396-404.
- Angeletti, S., Sanchez, J.M., Chamley, L.W., Genti-Raimondi, S., Perillo, M.A., 2012. StarD7 behaves as a fusogenic protein in model and cell membrane bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1818, 425-433.
- Aon, M.A., Bhatt, N., Cortassa, S.C., 2014. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Frontiers in physiology* 5, 282.
- Ardail, D., Lerme, F., Louisot, P., 1991. Involvement of contact sites in phosphatidylserine import into liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 266, 7978-7981.
- Asif, K., Memeo, L., Palazzolo, S., Frión-Herrera, Y., Parisi, S., Caligiuri, I., Canzonieri, V., Granchi, C., Tuccinardi, T., Rizzolio, F., 2021. STARD3: A Prospective Target for Cancer Therapy. *Cancers* 13, 4693.
- Ausman, J., Abbade, J., Ermini, L., Farrell, A., Tagliaferro, A., Post, M., Caniggia, I., 2018. Ceramide-induced BOK promotes mitochondrial fission in preeclampsia. *Cell death & disease* 9, 1-18.
- Ba, X., Gupta, S., Davidson, M., Garg, N.J., 2010. *Trypanosoma cruzi* induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 285, 11596-11606.
- Ball, W.B., Neff, J.K., Gohil, V.M., 2018. The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS letters* 592, 1273-1290.
- Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K., Ishihara, N., 2017. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nature cell biology* 19, 856-863.
- Barth, P., Scholte, H., Berden, J., Van der Klei-Van Moorsel, J., Luyt-Houwen, I., Veer-Korthof, E.T.V.T., Van der Harten, J., Sobotka-Plojhar, M., 1983. An X-linked mitochondrial disease

- affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *Journal of the neurological sciences* 62, 327-355.
- Becker, T., Horvath, S.E., Böttinger, L., Gebert, N., Daum, G., Pfanner, N., 2013. Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* 288, 16451-16459.
- Benghezal, M., Roubaty, C., Veepuri, V., Knudsen, J., Conzelmann, A., 2007. SLC1 and SLC4 encode partially redundant acyl-coenzyme A 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases of budding yeast. *Journal of Biological Chemistry* 282, 30845-30855.
- Bione, S., D'Adamo, P., Maestrini, E., Gedeon, A.K., Bolhuis, P.A., Toniolo, D., 1996. A novel X-linked gene, G4. 5. is responsible for Barth syndrome. *Nature genetics* 12, 385-389.
- Bockelmann, S., Mina, J.M., Korneev, S., Hassan, D.G., Müller, D., Hilderink, A., Vlieg, H.C., Raijmakers, R., Heck, A.R., Haberkant, P., 2018. A search for ceramide binding proteins using bifunctional lipid analogs yields CERT-related protein StarD7. *Journal of lipid research* 59, 515-530.
- Boland, M.L., Chourasia, A.H., Macleod, K.F., 2013. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Frontiers in oncology* 3, 292.
- Bosc, C., Broin, N., Fanjul, M., Saland, E., Farge, T., Courdy, C., Batut, A., Masoud, R., Larrue, C., Skuli, S., 2020. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nature communications* 11, 1-14.
- Böttinger, L., Horvath, S.E., Kleinschroth, T., Hunte, C., Daum, G., Pfanner, N., Becker, T., 2012. Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *Journal of molecular biology* 423, 677-686.
- Brillo, V., Chieriegato, L., Leanza, L., Muccioli, S., Costa, R., 2021. Mitochondrial Dynamics, ROS, and Cell Signaling: A Blended Overview. *Life* 11, 332.
- Brown, D.A., Perry, J.B., Allen, M.E., Sabbah, H.N., Stauffer, B.L., Shaikh, S.R., Cleland, J.G., Colucci, W.S., Butler, J., Voors, A.A., 2017. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nature Reviews Cardiology* 14, 238-250.
- Bulthuis, E.P., Adjobo-Hermans, M.J., Willems, P.H., Koopman, W.J., 2019. Mitochondrial morphofunction in mammalian cells. *Antioxidants & redox signaling* 30, 2066-2109.
- Carman, G.M., Henry, S.A., 2007. Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 37293-37297.
- Claypool, S.M., McCaffery, J.M., Koehler, C.M., 2006. Mitochondrial mislocalization and altered assembly of a cluster of Barth syndrome mutant tafazzins. *The Journal of cell biology* 174, 379-390.
- Clutton, G., Mollan, K., Hudgens, M., Goonetilleke, N., 2019. A Reproducible, Objective Method Using MitoTracker® Fluorescent Dyes to Assess Mitochondrial Mass in T Cells by Flow Cytometry. *Cytometry Part A* 95, 450-456.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., 2013. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155, 160-171.
- Cummings, C.M., Bentley, C.A., Perdue, S.A., Baas, P.W., Singer, J.D., 2009. The Cul3/Klhdc5 E3 ligase regulates p60/katanin and is required for normal mitosis in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 284, 11663-11675.
- Chakrabarty, S., Kabekkodu, S.P., Singh, R.P., Thangaraj, K., Singh, K.K., Satyamoorthy, K., 2018. Mitochondria in health and disease. *Mitochondrion* 43, 25-29.
- Chal, J., Pourquié, O., 2017. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* 144, 2104-2122.
- Chang, C.-R., Blackstone, C., 2010. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201, 34.

- Chang, C.R., Blackstone, C., 2007. Drp1 phosphorylation and mitochondrial regulation. *EMBO reports* 8, 1088-1089.
- Chou, C.-H., Lin, C.-C., Yang, M.-C., Wei, C.-C., Liao, H.-D., Lin, R.-C., Tu, W.-Y., Kao, T.-C., Hsu, C.-M., Cheng, J.-T., 2012. GSK3beta-mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS one* 7, e49112.
- de Brito Monteiro, L., Davanzo, G.G., de Aguiar, C.F., Moraes-Vieira, P.M., 2020. Using flow cytometry for mitochondrial assays. *MethodsX* 7, 100938.
- de Melo, T.G., Maria de Nazareth, S., Pereira, M.C.S., 2008. Trypanosoma cruzi alters adherens junctions in cardiomyocytes. *Microbes and infection* 10, 1405-1410.
- Durand, S., Abadie, P., Angeletti, S., Genti-Raimondi, S., 2003. Identification of multiple differentially expressed messenger RNAs in normal and pathological trophoblast. *Placenta* 24, 209-218.
- Durand, S., Angeletti, S., Genti-Raimondi, S., 2004. Gtt1/stard7, a novel phosphatidylcholine transfer protein-like highly expressed in gestational trophoblastic tumour:: cloning and characterization. *Placenta* 25, 37-44.
- Duric, M., Sivanesan, S., Bakovic, M., 2012. Phosphatidylcholine functional foods and nutraceuticals: A potential approach to prevent non-alcoholic fatty liver disease. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114, 389-398.
- Eaton, S., 2002. Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Progress in lipid research* 41, 197-239.
- Endo, T., Tamura, Y., 2018. Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. *The EMBO journal* 37, e98993.
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G.N., Radi, E., 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of the neurological sciences* 322, 254-262.
- Filadi, R., Greotti, E., Pizzo, P., 2018. Highlighting the endoplasmic reticulum-mitochondria connection: Focus on Mitofusin 2. *Pharmacological research* 128, 42-51.
- Finsterer, J., 2020. Update Review about Metabolic Myopathies. *Life* 10, 43.
- Fisher, J.J., Bartho, L.A., Perkins, A.V., Holland, O.J., 2020. Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 47, 176-184.
- Flores-Martin, J., 2015. Tesis: " Caracterización funcional de la proteína StarD7. Aspectos celulares y moleculares".
- Flores-Martin, J., Rena, V., Angeletti, S., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2013. The lipid transfer protein StarD7: structure, function, and regulation. *International journal of molecular sciences* 14, 6170-6186.
- Flores-Martín, J., Rena, V., Marquez, S., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2012. StarD7 knockdown modulates ABCG2 expression, cell migration, proliferation, and differentiation of human choriocarcinoma JEG-3 cells.
- Flores-Martín, J., Reyna, L., Del Puerto, M.C., Rojas, M.L., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2018. Hexosamine pathway regulates StarD7 expression in JEG-3 cells. *Molecular biology reports* 45, 2593-2600.
- Flores-Martín, J., Reyna, L., Ridano, M.E., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2016. Suppression of StarD7 promotes endoplasmic reticulum stress and induces ROS production. *Free Radical Biology and Medicine* 99, 286-295.
- Fu, S., Yang, L., Li, P., Hofmann, O., Dicker, L., Hide, W., Lin, X., Watkins, S.M., Ivanov, A.R., Hotamisligil, G.S., 2011. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 473, 528-531.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G., 2012. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 780-788.
- Garg, N., 2005. Mitochondrial disorders in chagasic cardiomyopathy. *Front Biosci* 10, 1341-1354.

- Garg, N., Gerstner, A., Bhatia, V., DeFORD, J., Papaconstantinou, J., 2004. Gene expression analysis in mitochondria from chagasic mice: alterations in specific metabolic pathways. *Biochemical Journal* 381, 743-752.
- Gomasasca, M., Banfi, G., Lombardi, G., 2020. Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone. *Advances in clinical chemistry* 94, 155-218.
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G., Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology* 13, 589-598.
- Gu, Z., Valianpour, F., Chen, S., Vaz, F.M., Hakkaart, G.A., Wanders, R.J., Greenberg, M.L., 2004. Aberrant cardiolipin metabolism in the yeast *taz1* mutant: a model for Barth syndrome. *Molecular microbiology* 51, 149-158.
- Gupta, S., Bhatia, V., Wen, J.-j., Wu, Y., Huang, M.-H., Garg, N.J., 2009. Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 1414-1421.
- Haberkant, P., Raijmakers, R., Wildwater, M., Sachsenheimer, T., Brügger, B., Maeda, K., Houweling, M., Gavin, A.C., Schultz, C., Van Meer, G., 2013. In vivo profiling and visualization of cellular protein–lipid interactions using bifunctional fatty acids. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 4033-4038.
- Harayama, T., Riezman, H., 2018. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nature reviews Molecular cell biology* 19, 281-296.
- Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., Neupert, W., 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *The EMBO journal* 30, 4356-4370.
- Hernández-Alvarez, M.I., Sebastián, D., Vives, S., Ivanova, S., Bartoccioni, P., Kakimoto, P., Plana, N., Veiga, S.R., Hernández, V., Vasconcelos, N., 2019. Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease. *Cell* 177, 881-895. e817.
- Holland, O., Nitert, M.D., Gallo, L.A., Vejzovic, M., Fisher, J.J., Perkins, A.V., 2017. Placental mitochondrial function and structure in gestational disorders. *Placenta* 54, 2-9.
- Hoppins, S., Collins, S.R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., DeVay, R.M., Lackner, L.L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J.S., Nunnari, J., 2011. A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *Journal of Cell Biology* 195, 323-340.
- Horibata, Y., Ando, H., Satou, M., Shimizu, H., Mitsushashi, S., Shimizu, Y., Itoh, M., Sugimoto, H., 2017. Identification of the N-terminal transmembrane domain of StarD7 and its importance for mitochondrial outer membrane localization and phosphatidylcholine transfer. *Scientific reports* 7, 1-15.
- Horibata, Y., Ando, H., Zhang, P., Vergnes, L., Aoyama, C., Itoh, M., Reue, K., Sugimoto, H., 2016. StarD7 protein deficiency adversely affects the phosphatidylcholine composition, respiratory activity, and cristae structure of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 291, 24880-24891.
- Horibata, Y., Mitsushashi, S., Shimizu, H., Maejima, S., Sakamoto, H., Aoyama, C., Ando, H., Sugimoto, H., 2020. The phosphatidylcholine transfer protein StarD7 is important for myogenic differentiation in mouse myoblast C2C12 cells and human primary skeletal myoblasts. *Scientific reports* 10, 1-14.
- Horibata, Y., Sugimoto, H., 2010. StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 285, 7358-7365.
- Hornbeck, P.V., Kornhauser, J.M., Tkachev, S., Zhang, B., Skrzypek, E., Murray, B., Latham, V., Sullivan, M., 2012. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic acids research* 40, D261-D270.
- Horvath, S.E., Daum, G., 2013. Lipids of mitochondria. *Progress in lipid research* 52, 590-614.

- Ikedo, Y., Tanji, E., Makino, N., Kawata, S., Furukawa, T., 2012. MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. *Molecular Cancer Research* 10, 259-269.
- Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., Sesaki, H., 2013. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology* 23, 64-71.
- Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., Youle, R.J., 2010. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *Journal of Cell Biology* 191, 933-942.
- Kamerkar, S.C., Kraus, F., Sharpe, A.J., Pucadyil, T.J., Ryan, M.T., 2018. Dynamin-related protein 1 has membrane constricting and severing abilities sufficient for mitochondrial and peroxisomal fission. *Nature communications* 9, 1-15.
- Kang, H.W., Ribich, S., Kim, B.W., Hagen, S.J., Bianco, A.C., Cohen, D.E., 2009. Mice lacking Pctp/StarD2 exhibit increased adaptive thermogenesis and enlarged mitochondria in brown adipose tissue [S]. *Journal of lipid research* 50, 2212-2221.
- Kartsoli, S., Kostara, C.E., Tsimihodimos, V., Bairaktari, E.T., Christodoulou, D.K., 2020. Lipidomics in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology* 12, 436.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., Lemasters, J.J., 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of biochemistry and biophysics* 462, 245-253.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular cell* 44, 325-340.
- Koshihara, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Lane, N., Martin, W., 2010. The energetics of genome complexity. *Nature* 467, 929-934.
- Leman, E.S., Magheli, A., Yong, K.M.A., Netto, G., Hinz, S., Getzenberg, R.H., 2009. Identification of nuclear structural protein alterations associated with seminomas. *Journal of cellular biochemistry* 108, 1274-1279.
- Leme, A.M.B.P., Salemi, V.M.C., Parga, J.R., Ianni, B.M., Mady, C., Weiss, R.G., Kalil-Filho, R., 2010. Evaluation of the metabolism of high energy phosphates in patients with Chagas' disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 95, 264-273.
- Leung, D.W., 2001. The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci* 6, D944-953.
- Lev, S., 2012. Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a013300.
- Liesa, M., Palacín, M., Zorzano, A., 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews* 89, 799-845.
- Liu, J., Dai, Q., Chen, J., Durrant, D., Freeman, A., Liu, T., Grossman, D., Lee, R.M., 2003. Phospholipid Scramblase 3 Controls Mitochondrial Structure, Function, and Apoptotic Response. NIH grants K08CA795093 (RML) and K08AR48618 (DG); Huntsman Cancer Foundation. *Molecular cancer research* 1, 892-902.
- Lu, Y.-W., Claypool, S.M., 2015. Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Frontiers in genetics* 6, 3.
- Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G., 2011. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 441-464.
- MacVicar, T., Langer, T., 2016. OPA1 processing in cell death and disease—the long and short of it. *Journal of cell science* 129, 2297-2306.
- MacVicar, T., Ohba, Y., Nolte, H., Mayer, F.C., Tatsuta, T., Sprenger, H.-G., Lindner, B., Zhao, Y., Li, J., Bruns, C., 2019. Lipid signalling drives proteolytic rewiring of mitochondria by YME1L. *Nature* 575, 361-365.
- Mårtensson, C.U., Doan, K.N., Becker, T., 2017. Effects of lipids on mitochondrial functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 102-113.

- McMaster, C.R., 2018. From yeast to humans—roles of the Kennedy pathway for phosphatidylcholine synthesis. *FEBS letters* 592, 1256-1272.
- Minton, D.R., Nam, M., McLaughlin, D.J., Shin, J., Bayraktar, E.C., Alvarez, S.W., Sviderskiy, V.O., Papagiannakopoulos, T., Sabatini, D.M., Birsoy, K., 2018. Serine catabolism by SHMT2 is required for proper mitochondrial translation initiation and maintenance of formylmethionyl-tRNAs. *Molecular cell* 69, 610-621. e615.
- Misrani, A., Tabassum, S., Yang, L., 2021. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Frontiers in aging neuroscience* 13, 57.
- Mitsuhashi, S., Nishino, I., 2011. Phospholipid synthetic defect and mitophagy in muscle disease. *Autophagy* 7, 1559-1561.
- Moessinger, C., Klizaite, K., Steinhagen, A., Philippou-Massier, J., Shevchenko, A., Hoch, M., Ejsing, C.S., Thiele, C., 2014. Two different pathways of phosphatidylcholine synthesis, the Kennedy Pathway and the Lands Cycle, differentially regulate cellular triacylglycerol storage. *BMC cell biology* 15, 1-17.
- Mukherjee, S., Belbin, T.J., Spray, D.C., Iacobas, D.A., Weiss, L.M., Kitsis, R.N., Wittner, M., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., Ding, A., 2003. Microarray analysis of changes in gene expression in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology research* 91, 187-196.
- Muñoz-Gómez, S.A., Slamovits, C.H., Dacks, J.B., Wideman, J.G., 2015. The evolution of MICOS: Ancestral and derived functions and interactions. *Communicative & integrative biology* 8, e1094593.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., Youle, R.J., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *Journal of cell biology* 183, 795-803.
- Nielson, J.R., Rutter, J.P., 2018. Lipid-mediated signals that regulate mitochondrial biology. *Journal of Biological Chemistry* 293, 7517-7521.
- Nunnari, J., Suomalainen, A., 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.
- Oliveira, J., Negrão, L., Fineza, I., Taipa, R., Melo-Pires, M., Fortuna, A.M., Gonçalves, A.R., Froufe, H., Egas, C., Santos, R., 2015. New splicing mutation in the choline kinase beta (CHKB) gene causing a muscular dystrophy detected by whole-exome sequencing. *Journal of human genetics* 60, 305-312.
- Orlicka-Płocka, M., Gurda-Wozna, D., Fedoruk-Wyszomirska, A., Wyszko, E., 2020. Circumventing the Crabtree effect: forcing oxidative phosphorylation (OXPHOS) via galactose medium increases sensitivity of HepG2 cells to the purine derivative kinetin riboside. *Apoptosis* 25, 835-852.
- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchon, M.R., 2012. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 26, 711-723.
- Pagac, M., Vazquez, H.M., Bochud, A., Roubaty, C., Knöpfli, C., Vionnet, C., Conzelmann, A., 2012. Topology of the microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase Gpt2p/Gat1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 86, 1156-1166.
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., Petrosillo, G., 2014. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1837, 408-417.
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F., Martinou, J.-C., 2008. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PloS one* 3, e3257.
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. *The Lancet* 391, 82-94.
- Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M., Saxton, W.M., 2006. Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Molecular biology of the cell* 17, 2057-2068.
- Potting, C., Tatsuta, T., König, T., Haag, M., Wai, T., Aaltonen, M.J., Langer, T., 2013. TRIAP1/PRELI complexes prevent apoptosis by mediating intramitochondrial transport of phosphatidic acid. *Cell metabolism* 18, 287-295.

- Rambold, A.S., Kostecky, B., Elia, N., Lippincott-Schwartz, J., 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 10190-10195.
- Raturi, A., Simmen, T., 2013. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1833, 213-224.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* 24, 981-990.
- Reddy, P.H., Reddy, T.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Shirendeb, U., Mao, P., 2011. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* 67, 103-118.
- Rehman, J., Zhang, H.J., Toth, P.T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A.N., Wietholt, C., Archer, S.L., 2012. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *The FASEB Journal* 26, 2175-2186.
- Rena, V., Flores-Martín, J., Angeletti, S., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2011. StarD7 Gene Expression in Trophoblast Cells: Contribution of SF-1 and Wnt- β -Catenin Signaling. *Molecular Endocrinology* 25, 1364-1375.
- Riekhof, W.R., Wu, J., Jones, J.L., Voelker, D.R., 2007. Identification and characterization of the major lysophosphatidylethanolamine acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 28344-28352.
- Rodriguez, M., Li, S.S.-C., Harper, J.W., Songyang, Z., 2004. An oriented peptide array library (OPAL) strategy to study protein-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* 279, 8802-8807.
- Rojas, M.L., Del Puerto, M.M.C., Flores-Martín, J., Racca, A.C., Kourdova, L.T., Miranda, A.L., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S., 2021. Role of the lipid transport protein StarD7 in mitochondrial dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1866, 159029.
- Rojas, M.L.F.-M.J.P.-D.G.B.E.G.-R.S., 2016. "Identification of KLHDC5 as an interacting protein of StarD7". *BIOCELL VOL. 40- Suppl. 1*.
- Saben, J.L., Boudoures, A.L., Asghar, Z., Thompson, A., Drury, A., Zhang, W., Chi, M., Cusumano, A., Scheaffer, S., Moley, K.H., 2016. Maternal metabolic syndrome programs mitochondrial dysfunction via germline changes across three generations. *Cell reports* 16, 1-8.
- Saita, S., Nolte, H., Fiedler, K.U., Kashkar, H., Venne, A.S., Zahedi, R.P., Krüger, M., Langer, T., 2017. PARL mediates Smac proteolytic maturation in mitochondria to promote apoptosis. *Nature cell biology* 19, 318-328.
- Saita, S., Tatsuta, T., Lampe, P.A., König, T., Ohba, Y., Langer, T., 2018. PARL partitions the lipid transfer protein STARD7 between the cytosol and mitochondria. *The EMBO journal* 37, e97909.
- Salat-Canela, C., Sesé, M., Peula, C., y Cajal, S.R., Aasen, T., 2014. Internal translation of the connexin 43 transcript. *Cell communication and signaling* 12, 1-6.
- Scaglia, N., Tyekucheva, S., Zadra, G., Photopoulos, C., Loda, M., 2014. De novo fatty acid synthesis at the mitotic exit is required to complete cellular division. *Cell Cycle* 13, 859-868.
- Schiller, J., Zschörnig, O., Petkovic, M., Müller, M., Arnhold, J., Arnold, K., 2001. Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and ³¹P-NMR. *Journal of lipid research* 42, 1501-1508.
- Schmidt, O., Pfanner, N., Meisinger, C., 2010. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 655-667.
- Schrepfer, E., Scorrano, L., 2016. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Molecular cell* 61, 683-694.
- Schuler, M.-H., Di Bartolomeo, F., Böttinger, L., Horvath, S.E., Wenz, L.-S., Daum, G., Becker, T., 2015. Phosphatidylcholine affects the role of the sorting and assembly machinery in the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. *Journal of Biological Chemistry* 290, 26523-26532.

- Sebastián, D., Palacín, M., Zorzano, A., 2017. Mitochondrial dynamics: coupling mitochondrial fitness with healthy aging. *Trends in molecular medicine* 23, 201-215.
- Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, M., Maruyama, J., Uchiyama, Y., Ishihara, N., 2012. Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. *Journal of Biological Chemistry* 287, 34635-34645.
- Shah, S.I., Paine, J.G., Perez, C., Ullah, G., 2019. Mitochondrial fragmentation and network architecture in degenerative diseases. *PLoS one* 14, e0223014.
- Shutt, T.E., McBride, H.M., 2013. Staying cool in difficult times: mitochondrial dynamics, quality control and the stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1833, 417-424.
- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F., Daum, G., 1991. Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 266, 10047-10049.
- Song, M., Franco, A., Fleischer, J.A., Zhang, L., Dorn II, G.W., 2017. Abrogating mitochondrial dynamics in mouse hearts accelerates mitochondrial senescence. *Cell metabolism* 26, 872-883. e875.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., Chan, D.C., 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *Journal of Cell Biology* 178, 749-755.
- Spinazzi, M., Radaelli, E., Horr , K., Arranz, A.M., Gounko, N.V., Agostinis, P., Maia, T.M., Impens, F., Morais, V.A., Lopez-Lluch, G., 2019. PARL deficiency in mouse causes Complex III defects, coenzyme Q depletion, and Leigh-like syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 277-286.
- Steenbergen, R., Nanowski, T.S., Beigneux, A., Kulinski, A., Young, S.G., Vance, J.E., 2005. Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects. *Journal of Biological Chemistry* 280, 40032-40040.
- Su, L., Chen, S., Zheng, C., Wei, H., Song, X., 2019. Meta-analysis of gene expression and identification of biological regulatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroscience* 13, 633.
- Tatsuta, T., Model, K., Langer, T., 2005. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Molecular biology of the cell* 16, 248-259.
- Tatsuta, T., Scharwey, M., Langer, T., 2014. Mitochondrial lipid trafficking. *Trends in cell biology* 24, 44-52.
- Teixeira, P.C., Santos, R.H.B., Fiorelli, A.I., Bilate, A.M.B., Benvenuti, L.A., Stolf, N.A., Kalil, J., Cunha-Neto, E., 2011. Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy. *PLoS neglected tropical diseases* 5, e1205.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., 2009. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *The EMBO journal* 28, 1589-1600.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A.T., Norberg, E., 2017. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and biophysical research communications* 482, 426-431.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *science* 304, 1158-1160.
- Van der Bliek, A.M., Shen, Q., Kawajiri, S., 2013. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a011072.
- van der Laan, M., Horvath, S.E., Pfanner, N., 2016. Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Current opinion in cell biology* 41, 33-42.

- van der Veen, J.N., Kennelly, J.P., Wan, S., Vance, J.E., Vance, D.E., Jacobs, R.L., 2017. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1859, 1558-1572.
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 112-124.
- Vance, J.E., 2014. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841, 595-609.
- Vance, J.E., 2015. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic* 16, 1-18.
- Vance, J.E., 2018. Historical perspective: phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine from the 1800s to the present. *Journal of lipid research* 59, 923-944.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science* 324, 1029-1033.
- Verschueren, K.H., Blanchet, C., Felix, J., Dansercoer, A., De Vos, D., Bloch, Y., Van Beeumen, J., Svergun, D., Gutsche, I., Savvides, S.N., 2019. Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature* 568, 571-575.
- von der Malsburg, K., Müller, J.M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D., 2011. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Developmental cell* 21, 694-707.
- Vyatkin, G., Bhatia, V., Gerstner, A., Papaconstantinou, J., Garg, N., 2004. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1689, 162-173.
- Wagatsuma, A., Sakuma, K., 2013. Mitochondria as a potential regulator of myogenesis. *The Scientific World Journal* 2013.
- Wai, T., Langer, T., 2016. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 105-117.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359-407.
- Wen, J.J., Porter, C., Garg, N.J., 2017. Inhibition of NFE2L2-antioxidant response element pathway by mitochondrial reactive oxygen species contributes to development of cardiomyopathy and left ventricular dysfunction in Chagas disease. *Antioxidants & redox signaling* 27, 550-566.
- Willems, P.H., Rossignol, R., Dieteren, C.E., Murphy, M.P., Koopman, W.J., 2015. Redox homeostasis and mitochondrial dynamics. *Cell metabolism* 22, 207-218.
- Wong, C.Y., Al-Salami, H., Dass, C.R., 2020. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 72, 1667-1693.
- Wu, G., Sher, R.B., Cox, G.A., Vance, D.E., 2009. Understanding the muscular dystrophy caused by deletion of choline kinase beta in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 347-356.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Xu, K., Ji, M., Huang, X., Peng, Y., Wu, W., Zhang, J., 2020. Differential regulatory roles of MicroRNAs in porcine intramuscular and subcutaneous adipocytes. *Journal of agricultural and food chemistry* 68, 3954-3962.
- Yang, L., Lewkowich, I., Apsley, K., Fritz, J.M., Wills-Karp, M., Weaver, T.E., 2015. Haploinsufficiency for *Stard7* is associated with enhanced allergic responses in lung and skin. *The Journal of Immunology* 194, 5635-5643.
- Yang, L., Na, C.-L., Luo, S., Wu, D., Hogan, S., Huang, T., Weaver, T.E., 2017. The phosphatidylcholine transfer protein *Stard7* is required for mitochondrial and epithelial cell homeostasis. *Scientific reports* 7, 1-13.

- Youle, R.J., Van Der Blik, A.M., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062-1065.
- Zhang, J., Nie, J., Sun, H., Andersen, J.-P., Shi, Y., 2020. De Novo Lipid Labeling for Comprehensive Analysis of Subcellular Distribution and Trafficking in Live Cells. *bioRxiv*.
- Zhang, Q., Tamura, Y., Roy, M., Adachi, Y., Iijima, M., Sesaki, H., 2014. Biosynthesis and roles of phospholipids in mitochondrial fusion, division and mitophagy. *Cellular and molecular life sciences* 71, 3767-3778.
- Zheng, Z., Zou, J., 2001. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol 3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 41710-41716.
- Zhou, X., Han, T.-L., Chen, H., Baker, P.N., Qi, H., Zhang, H., 2017. Impaired mitochondrial fusion, autophagy, biogenesis and dysregulated lipid metabolism is associated with preeclampsia. *Experimental cell research* 359, 195-204.
- Zhu, P.-P., Patterson, A., Stadler, J., Seeburg, D.P., Sheng, M., Blackstone, C., 2004. Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 35967-35974.
- Zhu, X.-m., Han, T., Sargent, I.L., Yin, G.-w., Yao, Y.-q., 2009. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology* 200, 661. e661-661. e667.
- Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M., McBride, H.M., 2007. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *Journal of cell science* 120, 1178-1188.