

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio metabólico de *Drosophila melanogaster*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLOGICAS**

Lic. Lautaro Gándara

Director de tesis: **Dr. Pablo Wappner**
Consejero de estudios: **Dr. Pablo Cerdán**

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir.
Instituto de Inv. Bioquímicas de Buenos Aires, CONICET.

Buenos Aires, 2019

Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio metabólico de *Drosophila melanogaster*

Resumen

La biología del desarrollo ha comenzado a describir diversas maneras a través de las cuales el perfil metabólico de las células que componen los diferentes tejidos interactúa con mecanismos ontogenéticos. Sin embargo, hasta el momento las estrategias utilizadas no estuvieron basadas en la detección de cambios metabólicos a nivel de célula única. En este trabajo hemos desarrollado herramientas moleculares en la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster,* que permitirán estudiar, mediante técnicas de microscopía, el perfil bioenergético de células individuales *in vivo*, en distintos tejidos durante el desarrollo. Estas herramientas consisten en una serie de líneas transgénicas de *Drosophila* que expresan biosensores basados en el fenómeno de FRET, capaces de monitorear niveles de metabolitos o co-factores del metabolismo energético a nivel de célula única. Estos son: LACONIC, sensor de lactato, PYRONIC, sensor de piruvato y OGSOR, sensor de 2-oxoglutarato citosólico. También se generó un reportero transcripcional de la enzima *piruvato deshidrogenasa kinasa* (PDHK), el cual permite identificar células que podrían estar dependiendo de un metabolismo esencialmente glucolítico. Con estas herramientas intentaremos identificar reprogramaciones del metabolismo energético durante el desarrollo de *Drosophila*.

PALABRAS CLAVE

Metabolismo, Desarrollo, Efecto Warburg, Bioenergética, *Drosophila*

Development of molecular tools for single-cell analysis of *Drosophila* metabolism

Abstract

Developmental biology has started to describe several ways by which the metabolic profile of the cells from different tissues interacts with ontogenetic mechanisms. Nevertheless, the strategies employed so far have not been based on the single-cell detection of metabolic switches. In this work we have developed molecular tools in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, which allow us to study through fluorescence microscopy the metabolic profile of individual cells *in vivo*, and in several tissues during development. These tools are basically isogenic fly lines that express FRET-based biosensors capable of monitoring the intracellular levels of metabolites or co-factors from energetic metabolism at single-cell level. These sensors are: LACONIC, a lactate sensor, PYRONIC, a pyruvate sensor and OGSOR, a sensor of cytosolic 2-oxoglutarate. A transcriptional reporter of the key enzyme pyruvate dehydrogenase kinase (PDHK) has also been built in flies, which allows us to identify cells that might depend on a highly glycolytic metabolism. With all these tools, detailed studies of the metabolic facets of *Drosophila* development can now be carried out.

KEYWORDS

Metabolism, Development, Warburg effect, Bioenergetics, *Drosophila*

Agradecimientos

El desarrollo de una tesis doctoral es, intrínsecamente, una actividad colaborativa. El indispensable esfuerzo individual solo germina en un entorno estimulante de discusión, en contacto con experiencias previas pacientemente acumuladas en el área de estudio e impregnado con perspectivas diferentes que complementen la visión del trabajo. Durante mi doctorado tuve la fortuna de contar con estas condiciones, por lo que deseo emplear esta sección para expresar mi agradecimiento a las personas responsables de ello.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, Pablo Wappner, quien me dio la oportunidad de formar parte de su laboratorio, ofreciéndome su apoyo y orientación y brindándome numerosas oportunidades para desarrollarme profesional y académicamente.

No me cabe la menor duda de que todos los miembros de nuestro grupo, presentes o pasados, contribuyeron de una manera u otra a que este trabajo de tesis adquiera su forma actual. Por ello, así como por haber generado un ambiente de trabajo difícilmente superable, quiero agradecer a Ana Laura de Lella Ezcurra, Ayelén Valko, Camila Behrensen, Dalmiro Blanco Obregón, Eleonora Sorianello, Emilio Santillán, Felipe Rodríguez, Lucía Durrieu, Mariana Melani, Maximiliano Katz, Rocío Carrasco, Sebastián Pérez Pandolfo, Sofía Suarez y Tali Kiperman. En particular quiero destacar el trabajo cotidiano con Lucía y Camila, cuya colaboración en este proyecto resultó verdaderamente indispensable en distintos momentos del desarrollo de la tesis.

Agradezco también a los miembros de mi comité de seguimiento de tesis Nicolás Frankel, Cecilia D'Alessio y Jorge Casal, por sus comentarios alentadores y relevantes aportes a lo largo de nuestros encuentros anuales.

Andrés Garelli, Bang Ce Ye, Julieta Acevedo, Luis Felipe Barros, Raul Mostoslavsky y Stefan Luschnig compartieron desinteresadamente con nosotros sus herramientas de trabajo, por lo que también deseo reconocer su aporte a este trabajo.

Por otro lado, debo agradecer al CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por su contribución financiera, vital para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Aprovecho también esta sección para reconocer a Alexandra Elbakyan y sus esfuerzos ligados a evitar la mercantilización de la actividad científica.

En un plano personal deseo destacar el entendimiento y apoyo brindado durante estos años por parte de una gran cantidad de familiares y amigos. En ciertos momentos el trabajo de mesada puede resultar enormemente frustrante. Contar con ellos fue esencial para lograr mantener la calma y sobreponerme a cada traspié. Es por ello que quiero agradecer, en orden alfabético, a Adriana Casas, Alba Lidón, Alejandra Echegaray, Alejandro Valko, Ayelén Valko, Gabriel Piro, Germán Gándara, Magdalena Fernández-Acosta, Marcelo Valko, Maribel Gándara, Martín Danze, Mihaly Karl, Olivia Valko y Salvador Gándara. Debo reconocer especialmente a Maribel, con quien he discutido en diversas oportunidades aspectos de este trabajo y siempre ha aportado ideas y preguntas con su entusiasmo característico.

Por último, deseo agradecer especialmente a mi compañera, Ayelén Valko, la comprensión, el sostén y el afecto incondicional ofrecidos durante todo este tiempo. Agradezco también que haya compartido su increíble talento conmigo, dibujando en tinta la mayor parte de las ilustraciones de este trabajo.

Esta tesis está dedicada a Ayelén Valko
mi Aleph y mi Zahir

Abreviaturas

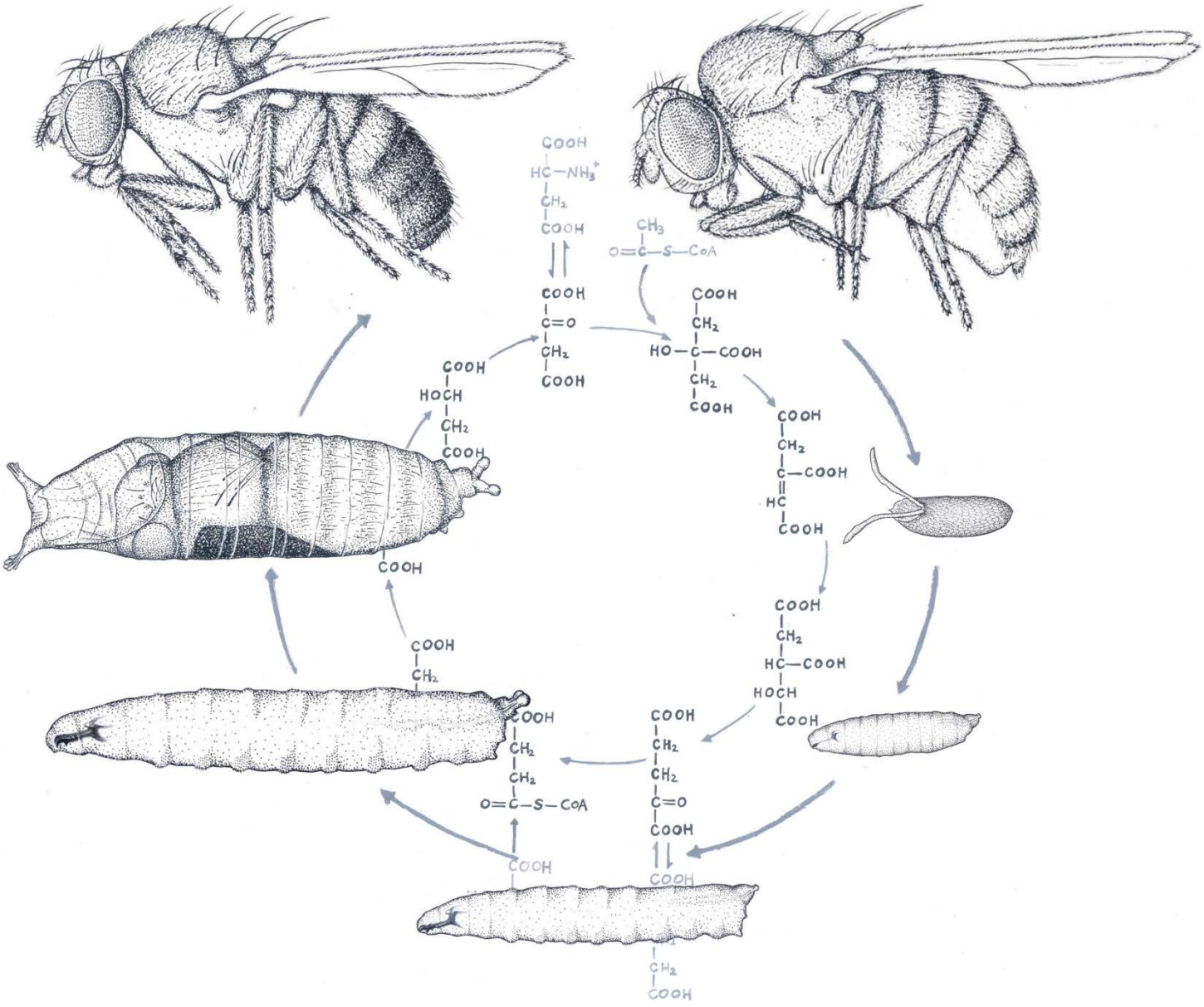
2HG: 2-hidroxiglutarato
2-OG: 2-oxoglutarato
3mdA: N-6-metildesoxiadenosina
5mC: 5-metilcitosina
AGZ: activación del genoma cigótico
Aldo A: aldolasa A
ARNi: ARN de interferencia
CCBCs: células columnares de la base de la cripta
CGR: células ganglionales retinales
CMPi: células madre pluripotentes inducidas
CN: Cresta Neural
dERR: receptor vinculado a estrógeno de Drosophila
Dl: Delta
DM-2-OG: dimetil-2-oxoglutarato
DMOG: dimetiloxalilglicina
En: Engrailed
ERRγ: estrogen related-receptor γ
Ex: Expanded
GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
HATs: acetil-transferasas de histonas
HDACs: histonas deacetilasas
HDMs: demetilasas de histonas
HK2: hexoquinasa
HMTs: Metil transferasas de histonas
HPZ: Zona de Proliferación del Intestino Posterior
LDH: Lactato Deshidrogenasa
MAT: S-adenosilmetionina transferasa
MCT: Transportador de Monocarboxilato
MPC: transportador mitocondrial de piruvato
MPV: mesodermo presomítico de vertebrados
NBs: Neuroblastos
NICD: Dominio Intracelular de Notch
ODD: Dominio de respuesta a oxígeno
OXPHOS: Fosforilación Oxidativa
PDH: Piruvato Deshidrogenasa
PDHK: Piruvato Deshidrogenasa Quinasa
PDP: Piruvato Deshidrogenasa Fosfata
PFK: Fosfofructoquinasa
PFKFB: 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa
PGC-1α: peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1α
PGK: fosfoglicerato quinasa
PHD: Dominio Prolil-4-hisroxilasa
PK: Piruvato Quinasa
PSCs: células madre pluripotentes
RC: ramificación corio-alantoica
rCMMs: células madre mesenquimáticas de ratón
SAM: S-adenosilmetionina
SVD: descomposición en valores singulares
TCA: Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
TPI: Triosa Fosfato Isomerasa
Yki: Yorkie

Índice

RESUMEN 2
ABSTRACT 3
AGRADECIMIENTOS 4
ABREVIATURAS 7
ÍNDICE 8
INTRODUCCIÓN 10
Plasticidad del metabolismo energético 12
1. Respuesta metabólica a hipoxia 12
2. Heterogeneidad inter- e intracelular del metabolismo energético 15
Metabo-Devo: la perspectiva metabólica de la ontogenia 16
Bioenergética del desarrollo: el efecto Warburg fisiológico 19
1. Metabolismo tumoral 19
2. El efecto Warburg y la diferenciación celular 23
3. Reportes "disonantes" sobre la bioenergética del desarrollo 28
El metabolismo y la transducción de señales en el desarrollo: epigenética 31
1. El metabolismo y la regulación epigenética 31
2. La diferenciación celular y el desarrollo requieren alteraciones epigenéticas controladas por el metabolismo 33
El metabolismo y la transducción de señales en el desarrollo: control directo 36
Drosophila melanogaster como organismo modelo para Metabo-Devo 39
Biosensores FRET para el análisis metabólico de *Drosophila* 44
Reportero transcripcional del efecto Warburg 46
OBJETIVOS 49
Objetivos generales 50
Objetivos específicos 51
RESULTADOS 52
Señales FRET libres de artificios 53
Controles necesarios para validar la señal FRET 56
Caracterización del rango de respuesta de los sensores 60
Análisis de la respuesta metabólica en ambientes hipóxicos 65
Análisis de la respuesta metabólica a la restricción nutricional 70
La dioxigenasa *Fatiga* como sensor del estado nutricional de la célula 72

Manipulaciones genéticas del metabolismo 76
Análisis del metabolismo tumoral 81
Búsqueda de alteraciones metabólicas en células individuales 85
Reportero transcripcional del efecto Warburg 88
DISCUSIÓN 94
Validación y caracterización de las herramientas generadas 95
Reprogramaciones metabólicas en la respuesta integrada a estrés 96
Manipulación genética del metabolismo 100
El efecto Warburg y la identidad del tumor 101
Heterogeneidades intercelulares en los niveles de lactato 103
Experimentos pendientes y perspectivas a futuro 105
MATERIALES Y MÉTODOS 108
Trabajo con *Drosophila* 108
1. Mantenimiento de líneas de Drosophila 109
2. Genética de moscas y selección de larvas 109
3. Sistema de expresión génica controlada Gal4/UAS 111
4. Líneas obtenidas de repositorios o de laboratorios colaboradores 112
5. Generación de nuevas líneas – transgénesis 113
6. Generación de nuevas líneas – recombinación 115
Clonado de las herramientas 116
Tratamiento de hipoxia 118
1. Incubación en hipoxia 118
2. Determinación bioquímica de los niveles de lactato 118
Tratamiento de ayuno 120
Preparación de las muestras 120
1. Disección 120
2. Inmunotinción 120
Microscopía de fluorescencia 121
Análisis estadístico 121
ANEXO 123
BIBLIOGRAFÍA 127

Introducción



Nota del tesista

El presente trabajo no constituye una tesis tradicional, donde se proponen una o varias hipótesis de trabajo, se realizan experimentos para evaluarla y finalmente se sugiere un modelo que explique el fenómeno estudiado a la luz de los resultados experimentales. Por el contrario, en esta tesis se han desarrollado biosensores que, esperamos, permitirán abordar en trabajos futuros un interrogante acuciante de la biología del desarrollo actual: el vínculo entre el metabolismo celular y los programas de desarrollo del organismo.

Al analizar la historia de las distintas disciplinas científicas se torna evidente que en una gran cantidad de casos (quizás en la mayoría) la principal limitación para el avance y desarrollo de cada campo está dada por las restricciones técnicas de la época en cuestión. Recíprocamente, el desarrollo de tecnologías constituye, en muchas oportunidades, la fuerza motriz que impulsa el avance científico. De esta manera, el diseño de herramientas que posibilitan abarcar de forma novedosa viejas cuestiones constituye *per se* una contribución al desarrollo científico, comparable según mi punto de vista al testeo sistemático de hipótesis o a la recolección de datos.

De esta manera, el lector encontrará en esta tesis una descripción detallada del método de trabajo que permite emplear estos sensores produciendo resultados fidedignos, sin introducir artificios. No por ello, no obstante, se ha omitido describir con claridad los interrogantes y problemas teóricos que inspiraron el desarrollo de estas herramientas. Una correcta descripción del marco conceptual en el cual se trabajó permitirá ponderar con precisión la relevancia de la contribución realizada.

Plasticidad del metabolismo energético

1. Respuesta metabólica a hipoxia

Los seres vivos requieren de un flujo constante de energía para persistir como sistemas altamente ordenados en un universo que tiende a maximizar el desorden. En particular, la mayoría de las células dependen del catabolismo de carbohidratos como principal fuente de energía en condiciones fisiológicas normales. Esta rama del metabolismo consta de varios procesos finamente acoplados, los cuales se describen en la figura 1. En primer lugar, la glucosa (o cadenas carbonadas equivalentes) es oxidada parcialmente hasta piruvato a través de las reacciones citosólicas de la glucólisis (*2*). Esta oxidación parcial produce 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa catabolizada. El piruvato así generado puede entrar a la mitocondria, donde se convierte en acetil-CoA e ingresa al ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), en el cual se oxida totalmente generando CO_2 (*2*). Varios de los pasos de oxidación que constituyen estas rutas metabólicas involucran la reducción de co-factores, como el NAD o el FAD, los cuales luego pueden ceder estos electrones a una serie de complejos proteicos presentes en la membrana interna de la mitocondria. Estos complejos forman la denominada *cadena de transporte de electrones* y canalizan el flujo electrónico desde los equivalentes de reducción hacia el O_2, el cual actúa como aceptor final de electrones. A su vez, la actividad de estos complejos está asociada a la generación de un gradiente electroquímico de H^+ a ambos lados de la membrana mitocondrial, cuya disipación mediada por ATPasas provee de la fuerza motriz necesaria para la síntesis de ATP (*2*). La generación de ATP en la mitocondria, producida como consecuencia de la actividad de la cadena de transporte de electrones, se denomina fosforilación oxidativa (OXPHOS). Así, este proceso produce 32 moléculas de ATP por molécula de glucosa totalmente oxidada a CO_2.

A partir de la descripción anterior, resulta evidente que para lograr oxidar totalmente a la glucosa de forma acoplada a la biosíntesis de ATP debe haber O_2 disponible. Sin embargo, algunos tipos celulares, como por ejemplo las células musculares, pueden reprogramar su metabolismo energético en un ambiente donde la disponibilidad de O_2

se encuentra restringida (hipoxia) y producir ATP incluso en ausencia del aceptor final de electrones.

Este fenómeno radica en desacoplar la bioquímica mitocondrial del metabolismo energético, lo cual se logra impidiendo la entrada del piruvato a la mitocondria (*2*). De esta manera, el piruvato puede reducirse a lactato (Fig 1), reconstituyendo en el proceso el poder oxidante de la célula sin necesidad de la cadena de transporte de electrones. Así, el flujo metabólico a través de la vía glucolítica puede continuar indefinidamente en hipoxia, mientras no se agote el suministro de glucosa, y la célula puede depender íntegramente de la producción de ATP que ocurre en la glucólisis (*2*). Esta reprogramación del metabolismo energético en ambientes hipóxicos, denominada *fermentación láctica*, se encuentra entre los primeros casos reportados de cambios en el metabolismo celular inducidos en respuesta a alteraciones en las condiciones ambientales.

Hoy en día, el mecanismo molecular que regula esta reprogramación metabólica ha sido ampliamente estudiado. El factor de transcripción HIF es el elemento central de la respuesta transcripcional a hipoxia, ya que frente a la falta de O_2 activa la expresión de diversos genes que permiten a la célula lidiar con el entorno hipóxico. Entre los genes activados por HIF, se encuentran la lactato deshidrogenasa (LDH), enzima que convierte el piruvato a lactato de forma acoplada a la oxidación de NADH, la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK), encargada de fosforilar e inhibir al complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) que convierte al piruvato mitocondrial en acetil-CoA, y otras proteínas centrales en la glucólisis como la hexoquinasa y Glut1/3, transportadores de glucosa en la membrana plasmática (*3*). La alteración concertada en los niveles de estas enzimas y transportadores posibilita a la célula desviar el flujo metabólico hacia la producción de lactato, permitiéndole prescindir del O_2 como aceptor final de electrones en la mitocondria.

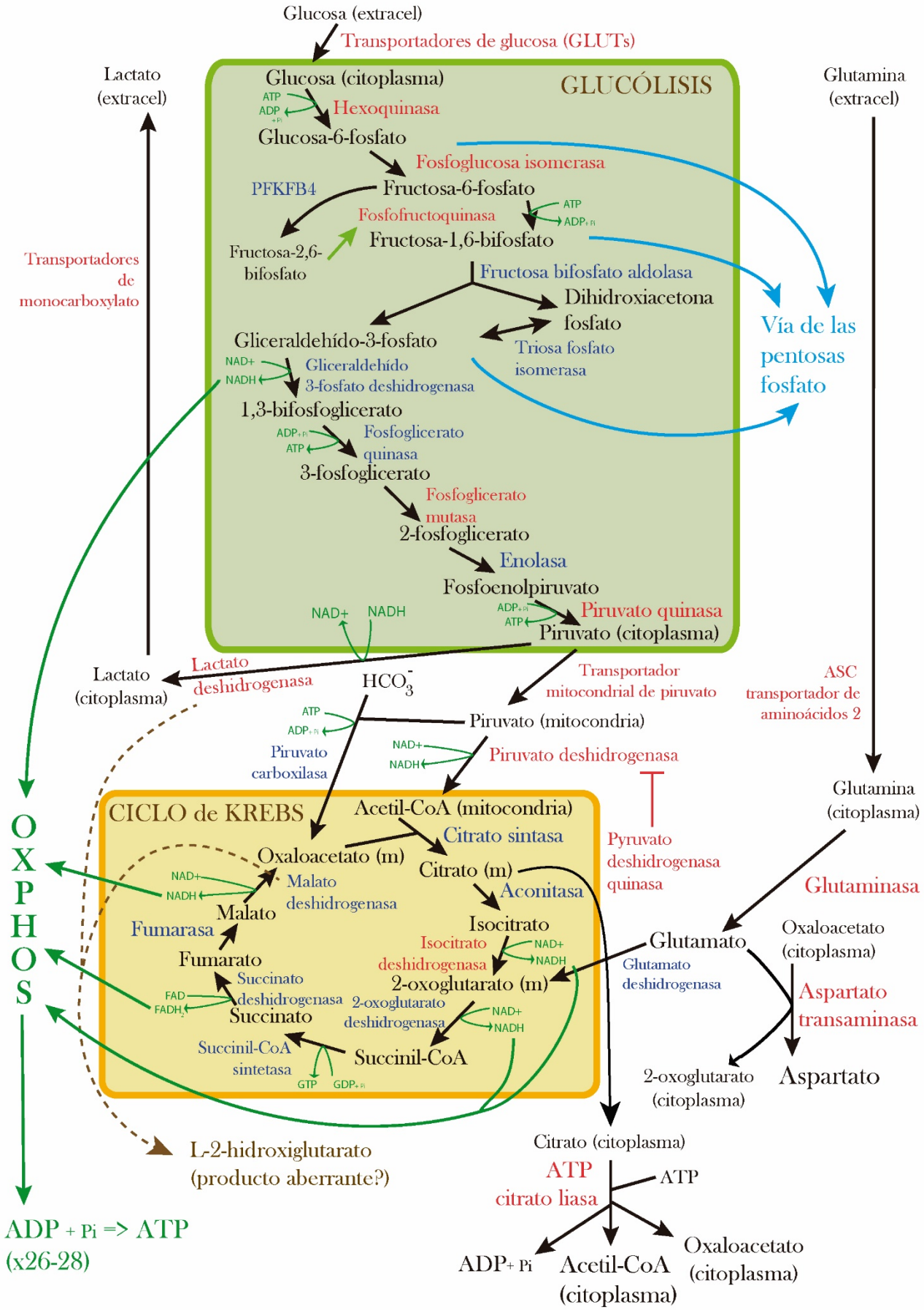

Glucosa (extracel)
Transportadores de glucosa (GLUTs)
Lactato (extracel)
Glutamina (extracel)
Glucosa (citoplasma)
GLUCÓLISIS
ATP
ADP
Hexoquinasa
Glucosa-6-fosfato
Fosfoglucosa isomerasa
PFKFB4
Fructosa-6-fosfato
ATP
ADP Pi
Fosfofructoquinasa
Fructosa-2,6-bifosfato
Fructosa-1,6-bifosfato
Transportadores de monocarboxylato
Fructosa bifosfato aldolasa
Dihidroxiacetona fosfato
Vía de las pentosas fosfato
Gliceraldehído-3-fosfato
Triosa fosfato isomerasa
NAD+
NADH
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
1,3-bifosfoglicerato
ADP Pi
ATP
Fosfoglicerato quinasa
3-fosfoglicerato
Fosfoglicerato mutasa
2-fosfoglicerato
Enolasa
Fosfoenolpiruvato
NAD+
NADH
ADP Pi
ATP
Piruvato quinasa
Piruvato (citoplasma)
Lactato (citoplasma)
Lactato deshidrogenasa
HCO3-
Transportador mitocondrial de piruvato
ASC transportador de aminoácidos 2
ATP
ADP Pi
Piruvato (mitocondria)
Piruvato carboxilasa
NAD+
NADH
Piruvato deshidrogenasa
Pyruvato deshidrogenasa quinasa
Glutamina (citoplasma)
CICLO de KREBS
Acetil-CoA (mitocondria)
Citrato sintasa
Oxaloacetato (m)
Citrato (m)
NAD+
NADH
Malato deshidrogenasa
Aconitasa
Glutaminasa
Malato
Isocitrato
Fumarasa
Isocitrato deshidrogenasa
NAD+
NADH
Glutamato
Oxaloacetato (citoplasma)
Fumarato
2-oxoglutarato (m)
Glutamato deshidrogenasa
FAD
FADH2
Succinato deshidrogenasa
Succinato
2-oxoglutarato deshidrogenasa
NAD+
NADH
Aspartato transaminasa
2-oxoglutarato (citoplasma)
Aspartato
Succinil-CoA sintetasa
Succinil-CoA
GTP
GDP Pi
OXPHOS
L-2-hidroxiglutarato (producto aberrante?)
Citrato (citoplasma)
ATP
citrato liasa
ATP
ADP Pi
Acetil-CoA (citoplasma)
Oxaloacetato (citoplasma)
ADP + Pi => ATP (x26-28)

Figura 1: Mapa metabólico de las rutas discutidas en esta tesis. Las enzimas y los transportadores en rojo son aquellos para los cuales se han reportado desregulaciones en células tumorales (ver adelante; Tabla 1); el resto de ellos se muestran en azul. Las moléculas directamente vinculadas a la bioenergética se muestran en verde. La (m) que acompaña a ciertos metabolitos del ciclo de Krebs indican su localización sub-celular mitocondrial. Adaptado de Gándara y Wappner, 2019 (*1*)

2. Heterogeneidad inter- e intracelular del metabolismo energético

Si bien tradicionalmente se asumía que dentro de un órgano determinado el perfil metabólico de las células individuales que lo componen es esencialmente homogéneo de manera tanto *inter-* como *intracelular*, existe una creciente cantidad de trabajos que demuestran lo contrario: lejos de ser homogéneo, el metabolismo energético se encuentra fuertemente controlado espacial y temporalmente (*4*).

El ejemplo clásico de regulación bioenergética intercelular se encuentra en el tejido nervioso de vertebrados, donde el catabolismo de la glucosa está espacialmente compartimentalizado entre neuronas y células gliales. En neuronas la actividad glucolítica está inhibida debido a una degradación constante de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB), enzima que produce un potente activador alostérico de la fosfofructoquinasa (PFK) glucolítica (*5*). Dado que en astrocitos el flujo glucolítico es considerablemente mayor al observado en neuronas, existe una diferencia en la concentración intracelular de lactato entre ambos tipos celulares (*6*). El lactato difunde a través de transportadores de monocarboxilatos (MCTs) presentes en la membrana plasmática (*7*), de forma que las neuronas incorporan al lactato producido por los astrocitos y lo oxidan totalmente hasta CO_2 empleando las reacciones del ciclo TCA (*8*). Esta *lanzadera de lactato* permite a las neuronas mantener el balance redox necesario para su fisiología característica (*5*).

Otro ejemplo notable de heterogeneidades intercelulares en el metabolismo energético lo constituye la activación de las células T en el sistema inmunológico de vertebrados. La división asimétrica de los linfocitos T luego de ser activados por células presentadoras de antígenos involucra la partición asimétrica de Myc, un activador de la glucólisis y glutaminólisis, entre las células hijas (*9*). Así, la célula que herede una

mayor cantidad de Myc estará caracterizada por un mayor flujo glucolítico, vinculado a su vez a la respuesta efectora de estos linfocitos, mientras que la célula que herede menor cantidad de Myc terminará conformando el cuerpo de células T de memoria (*9*).

En lo que respecta a la regulación intracelular del metabolismo, las neuronas también constituyen un ejemplo notable. En cierto tipo de neuronas sumamente ramificadas las enzimas glucolíticas gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y fosfoglicerato quinasa (PGK) se encuentran ancladas a vesículas intracelulares, lo cual resulta vital para la producción localizada de ATP. Este aumento local en la concentración de ATP es indispensable para el tráfico vesicular a través de los axones (*10*). Además, se ha descripto que las enzimas glucolíticas están agrupadas cerca de las membranas neuronales presinápticas y que su actividad localizada en dichas regiones es indispensable para la exocitosis y el reciclado de las vesículas sinápticas (*11*).

Por otro lado, existen varios trabajos que describen una regulación bioenergética temporal asociada a diversos procesos fisiológicos (*4*). Un ejemplo estudiado en profundidad lo constituye la coordinación del metabolismo energético con la progresión del ciclo celular. En la transición G1/S, la exacerbación de la glucólisis se combina con la fusión mitocondrial para permitir a la célula alcanzar las tasas de ATP más elevadas de todo el ciclo celular (*12, 13*). A una escala diferente el metabolismo también parece estar bajo control circadiano, habiéndose reportado ritmos metabólicos periódicos vinculados a la actividad del reloj circadiano en una enorme diversidad de organismos(*14, 15*).

Metabo-Devo: la perspectiva metabólica de la ontogenia

Recientemente, la biología del desarrollo se ha volcado vigorosamente a estudiar los vínculos entre los diferentes procesos ontogenéticos y el estado metabólico de las células involucradas en ellos (*1, 4*). Es cierto que el interés por la bioquímica del desarrollo no es novedoso. Dejando de lado los trabajos pioneros de Charles Manning Child (*16*), los reportes de Joseph Needham publicados entre la década del 20’ y del 40’

del siglo XX pueden considerarse como el primer intento serio y sistemático de acercarse experimentalmente a estos problemas (*17*). En ellos, Needham buscó identificar las fuentes de energía de los diversos procesos que constituyen la embriogénesis, los cambios en el pH y en el potencial redox vinculados a los procesos morfogenéticos y el establecimiento del cociente respiratorio para diversos estadíos de la ontogenia. Sin embargo, al intentar avanzar en el estudio metabólico de los tejidos en desarrollo, Needham notó rápidamente que la disponibilidad técnica de la época limitaría seriamente el alcance de sus estudios. Si bien intentó desarrollar tecnologías que le permitieran llevar a cabo los experimentos planeados, las técnicas generadas resultaban tan complejas que pocos grupos podían reproducirlas (*17, 18*). Debería transcurrir más de medio siglo para que la biología del desarrollo se sumerja de lleno en el estudio metabólico de la ontogenia.

Una condición necesaria para que el metabolismo pueda cumplir roles en el desarrollo de estructuras complejas consiste en que sea posible regularlo finamente tanto espacial como temporalmente. Los ejemplos descriptos en la sección anterior demuestran que el perfil metabólico celular presenta la plasticidad suficiente para constituir *per se* una instancia capaz de controlar intrincados procesos de coordinación celular como lo son los programas ontogenéticos. Durante la última década, los estudios metabólicos del desarrollo han permitido vislumbrar la complejidad de los mecanismos a través de los cuales se vinculan el metabolismo energético y la ontogenia. Existen dos tipos de funciones claramente distinguibles que puede cumplir el estado metabólico de la célula en el control de los programas de diferenciación y desarrollo (Fig 2): funciones estrictamente **bioenergéticas**, por un lado, y funciones en la regulación de la **transducción de señales** por el otro (*1, 4*). Las funciones bioenergéticas son aquéllas típicamente asociadas al metabolismo central, como la provisión de energía o de bloques de construcción para la síntesis de biomoléculas. En estos casos, los requerimientos energéticos o anabólicos del tejido en desarrollo imponen a la célula un estado metabólico particular, capaz de satisfacer estos requerimientos. De manera recíproca, la adquisición de este perfil metabólico es una condición necesaria para que continúe el programa de desarrollo. La segunda categoría, funciones vinculadas a la transducción de señales, comprende a diversos

mecanismos a través de los cuales las rutas metabólicas ejercen roles instructivos o regulatorios en los programas de diferenciación celular. En la mayoría de los casos estudiados, este control metabólico actúa a través de modificaciones post-traduccionales de histonas o metilación del ADN, regulando la transcripción de forma epigenética. Sin embargo, algunos trabajos indican que el perfil metabólico celular podría modular de forma directa ciertas vías de transducción de señales mediante metabolitos que actúan como moléculas de señalización o a través de enzimas con actividad *moonlighting*. Las secciones siguientes describen detalladamente ambos tipos de funciones.

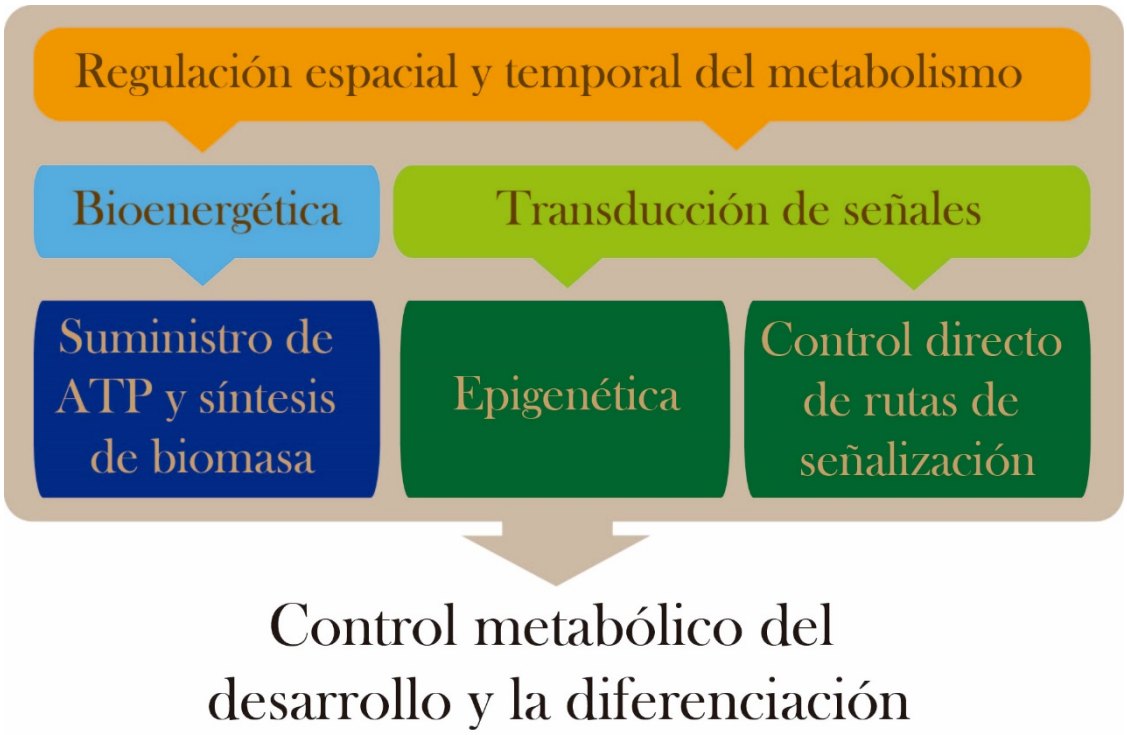


Figura 2: Esquema de los distintos roles que puede cumplir el metabolismo energético en la regulación de procesos ontogenéticos. Para que el metabolismo pueda cumplir funciones regulatorias de procesos fisiológicos complejos, éste debe regularse espacial y temporalmente. El control metabólico del desarrollo puede ejercerse a través del clásico rol bioenergético; es decir, a través de la modulación en la disponibilidad de ATP y precursores anabólicos para la síntesis de biomasa. Por otro lado, el estado metabólico puede impactar en vías de transducción de señales, regulando epigenéticamente el perfil transcripcional de la célula o modulando *per se* la actividad de ciertas rutas de señalización.

Bioenergética del desarrollo: el efecto Warburg fisiológico

1. Metabolismo tumoral

Otto Warburg fue el primero en estudiar, en los años 20 del siglo pasado, el metabolismo tumoral. Warburg encontró que las células tumorales sufren una reprogramación metabólica que las torna incapaces de oxidar completamente cadenas carbonadas a través del catabolismo mitocondrial, forzando a estas células a depender de la glucólisis como su principal fuente de ATP (*19*). Este hallazgo condujo a Warburg a desarrollar una teoría de la tumorigénesis metabólico-céntrica. Él propuso que la capacidad respiratoria comprometida de las células cancerígenas como consecuencia de la disfunción mitocondrial, constituía el motor de la transformación maligna (*19*).

Al mismo tiempo, Herbert Crabtree descubrió la alta dependencia que presentan las células tumorales por el suministro de glucosa y en base a esta observación sugirió que la captación de glucosa ejerce un efecto depresor sobre el consumo de oxígeno (*20*). La hipótesis de Warburg no convenció a la comunidad científica, y en la década del 50' Sidney Weinhouse encontró que algunas células tumorales son perfectamente capaces de oxidar totalmente lípidos y carbohidratos hasta CO_2, reteniendo en simultáneo sus características oncogénicas (*21*). Así, Weinhouse propuso que la actividad mitocondrial comprometida de las células tumorales reflejan el efecto Crabtree: es en verdad una consecuencia y no una causa del incremento en el flujo glucolítico. En la actualidad, el hecho de que la mayoría de las células tumorales usan esta vía metabólica estrictamente glucolítica para la síntesis de ATP, incluso en condiciones de disponibilidad de oxígeno (*22*), se encuentra ampliamente aceptado.

La pérdida de plasticidad metabólica de las células tumorales tiene diferentes bases genéticas en distintos modelos tumorales estudiados. Las enzimas metabólicas cuya desregulación, en forma individual o combinada, conduce a la adquisición de un perfil metabólico glucolítico por parte de las células tumorales, están indicadas en rojo en la figura 1 y descriptas en la tabla 1.

Gen	Función metabólica	Desregulación en células transformadas	Referencias
Transportadores GLUTs	Transportadores de glucosa en la membrana plasmática	Aumento en los niveles de las isoformas 1 y 3	(*23, 24*)
Hexoquinasa (HK)	Fosforila a la glucosa en glucólisis	La isoforma II se torna más abundante	(*25*)
Fosfoglucosa Isomerasa (PGI)	En la glucólisis, la enzima interconvierte la glucosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato	Ciertos tumores secretan FGI a la circulación sanguínea, donde actúa como citoquina	(*26, 27*)
6-Fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB)	Punto de ramificación en la glucólisis hacia la vía de las pentosas fosfato	La isoforma 3 se torna más abundante, desviando el flujo hacia la glucólisis	(*28, 29*)
Fosfoglicerato mutasa	Conversión del 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato en la glucólisis	Aumento en los niveles de la isoforma 1	(*30*)
Piruvato quinasa (PK)	Conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato	La isoforma PKM2 se torna más abundante, enlenteciendo el flujo glucolítico (cuello de botella al final de la vía)	(*31, 32*)
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Reducción del piruvato a lactato	Aumento en los niveles de la isoforma LDHA	(*33-35*)
Transportadores de monocarboxilato (MCT)	Transportadores de lactato en membrana plasmática	Expresión elevada de TMC4	(*36*)
Transportadores mitocondriales de piruvato (MPC)	Transportadores de piruvato en las membanas mitocondriales	Inhibición de las isoformas MPC1 y MPC2	(*37, 38*)
Piruvato deshidrogenasa (PDH)	Síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato	Inhibición a través de fosforilación mediada por una actividad incrementada de la piruvato deshidrogenasa quinasa	(*39, 40*)

Piruvato deshidrogenasa quinasa (PDHK)	Inhibición de PDH	Sobrexpresión de la isoforma PDHK 1	(*39-41*)
Glutaminasa	Genera glutamato a partir de glutamina	Expresión aumentada mediada por Myc	(*42*)
ASC transportador de aminoácidos 2	Transportador de glutamina	Expresión aumentada mediada por Myc	(*42*)
Isocitrato deshidrogenasa	Decarboxilación del isocitrato produciendo 2-oxoglutarato	Ciertas mutaciones conducen a una actividad enzimática alterada: síntesis de 2-hydroxiglutarato	(*43, 44*)

Tabla 1: Lista de genes vinculados al efecto Warburg. La tabla describe los roles fisiológicos de las proteínas, así como la clase de desregulación observada en células tumorales.

El hecho de que las células tumorales en proliferación activa adopten un perfil bioenergético de bajo rendimiento (2 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada parcialmente vs 32 moléculas de ATP por molécula de glucosa totalmente oxidada en la OXPHOS; ver arriba) podría parecer paradójico a primera vista. Sin embargo, se deben considerar aspectos adicionales al estudiar el metabolismo a nivel celular. En base a evidencias empíricas provenientes de la biología del cáncer, se han desarrollados dos interpretaciones no excluyentes del efecto Warburg (*45, 46*):

1) La *interpretación cinética* contempla el hecho de que la velocidad de producción de ATP por molécula de glucosa es considerablemente mayor en la glucólisis respecto a la determinada en el catabolismo mitocondrial (ciclo TCA acoplado a la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa) (*2, 47*). Así, considerando una situación en la cual la disponibilidad de glucosa no es limitante, el perfil metabólico del efecto Warburg conduciría a una tasa mayor de síntesis de ATP, posibilitando el crecimiento descontrolado y la proliferación exacerbada de las células tumorales. Esta interpretación también permitiría explicar la gran dependencia de glucosa que muestran la mayoría de los tumores.

2) La *interpretación anabólica*, por otro lado, destaca el hecho de que muchos intermediarios de la glucólisis y del ciclo TCA se emplean también como precursores metabólicos en diversas rutas biosintéticas.

   El corazón del estado metabólico alterado en el efecto Warburg yace en la inhibición de la conversión del piruvato mitocondrial en acetil-CoA (Fig 1). Este bloqueo se alcanza en muchos casos disminuyendo la actividad de PDH (*39, 40*), pero también mediante la represión transcripcional de transportadores mitocondriales de piruvato (MPC1 y MPC2) (*37, 38*), así como a través de un cambio de isoformas de la piruvato quinasa (PK), aumentando la proporción de aquélla con menor afinidad por el sustrato (Fig 1) (*31, 32*).

   La inhibición de la conversión del piruvato en acetil-CoA cumple un doble efecto. En primer lugar, el bloqueo del flujo glucolítico conduce a un incremento en las concentraciones en el estado estacionario de ciertos intermediarios glucolíticos que pueden ser desviados hacia procesos anabólicos (*46, 48*): el gliceraldehído-3-fosfato puede ser empleado en la síntesis de glicerol, la fructosa-1,6-bifosfato se requiere para la producción de ribosa en la ruta de síntesis de nucleótidos, y los niveles elevados de glucosa-6-fosfato son necesarios para producir, a través de la vía de las pentosas fosfato, cantidades suficientes de NADPH para sostener la acumulación de biomasa durante la progresión tumoral (Fig 1).

   En segundo lugar, al bloquear el ingreso del piruvato a la mitocondria la glucólisis queda desacoplada del ciclo de Krebs. De esta manera, la principal fuente de carbono del ciclo de Krebs termina siendo el 2-oxoglutarato (2-OG), derivado del glutamato, el cual se encuentra ampliamente disponible en ciertos modelos tumorales debido en gran parte a una elevada actividad glutaminasa (Fig 1) (*42, 49*). Una vez que las reacciones del ciclo TCA se desacoplan de la bioenergética celular, los metabolitos intermediarios del ciclo pueden emplearse como precursores anabólicos: el oxalacetato puede utilizarse para sintetizar aminoácidos, el succinil-CoA se requiere en la síntesis de porfirinas, y el citrato generado por carboxilación reductiva del 2-OG (*50*) como precursor en la síntesis de lípidos.

2. El efecto Warburg y la diferenciación celular

En base a estas interpretaciones, por lo tanto, el perfil metabólico alterado de las células tumorales sería una condición necesaria para alcanzar las elevadas tasas de crecimiento y proliferación que las caracterizan. Surge, entonces, la idea de que esta reprogramación metabólica podría ser una característica fisiológica de la proliferación celular (Fig 3) que permita satisfacer los requerimientos energéticos y anabólicos de estas células, en lugar de tratarse de una característica maligna de las células tumorales.

Esta idea fue, de hecho, considerada fugazmente en los años 50' del siglo XX. Mientras estudiaba los requisitos para la división celular durante el desarrollo, R. J. O'Connor encontró una fuerte correlación entre la proliferación celular y la glucólisis en el cerebro medio de embriones de pollo (*51*). En particular, O'Connor describió que en cierto punto del desarrollo de este tejido la tasa de proliferación celular disminuye de forma concomitante con una reducción en la actividad glucolítica del órgano en desarrollo, mientras que la actividad respiratoria permanece esencialmente inalterada (*51*). Una vez más, las limitaciones técnicas de la época impidieron a O'Connor profundizar en esta observación y describir el fenómeno con un grado mayor de detalle.

Ya en el siglo XXI, el grupo de William Harris reportó que las células progenitoras en activa proliferación de la retina de *Xenopus* requieren un perfil metabólico glucolítico, alimentado principalmente por glucógeno, mientras que las neuronas retinales ya diferenciadas experimentan un cambio metabólico hacia la fosforilación oxidativa (*52*). Aunque en trabajos previos se ha reportado que linfocitos en proliferación (*53*) o timocitos (*54*) dependen de un metabolismo energético glucolítico, este trabajo fue el primero en identificar la reprogramación metabólica asociada a la diferenciación celular en un modelo *in vivo*, superando una de las principales limitaciones de los trabajos previos: que el metabolismo en células en cultivo puede depender de condiciones nutricionales o de disponibilidad de O_2, definidas experimentalmente. Notablemente, estos autores no solo caracterizaron las diferencias entre los estados metabólicos de progenitores en proliferación versus neuronas diferenciadas, no proliferantes, sino que también demostraron que luego de un bloqueo glucolítico

completo, los progenitores pueden mantener sus niveles de ATP, mientras que tanto la proliferación como la diferenciación se comprometen seriamente. Estos resultados indican que la glucólisis y la fosforilación oxidativa se encuentran desacopladas en progenitores proliferantes, tal como predice la interpretación anabólica del efecto Warburg.

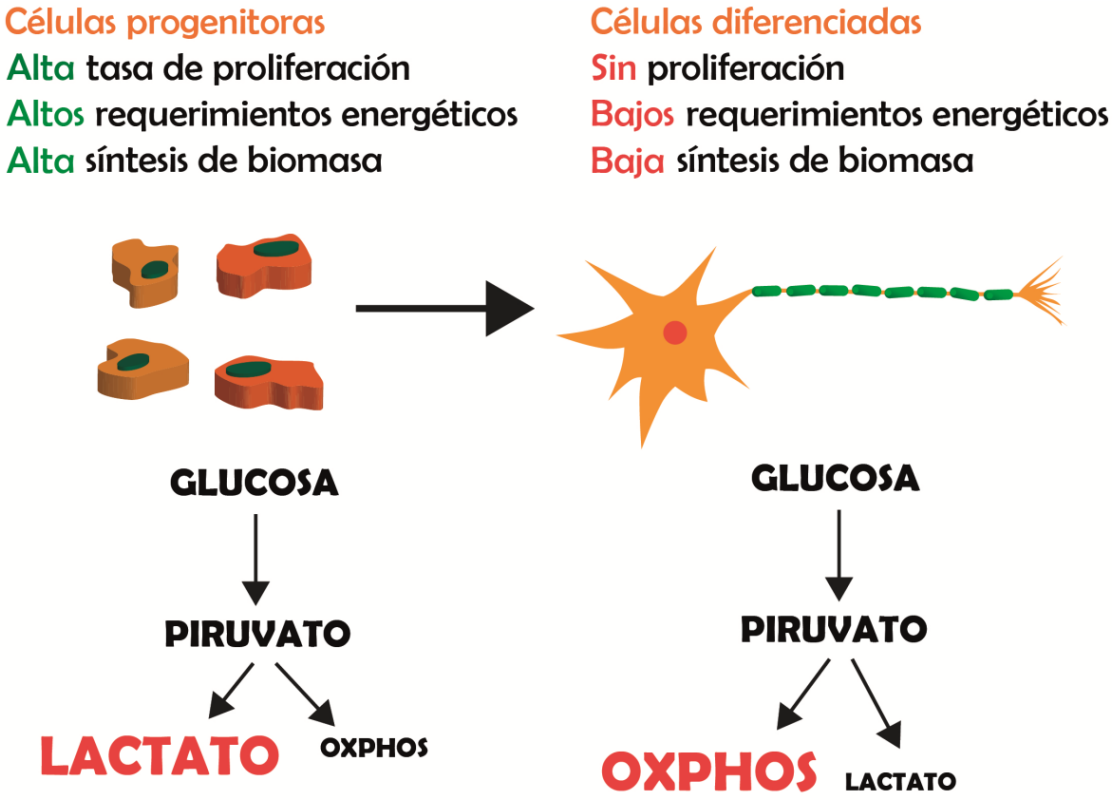


Figura 3: Mientras que las células diferenciadas emplean la fosforilación oxidativa (OXPHOS) catabolizando eficientemente las cadenas de carbono, células que experimentan un rápido crecimiento y proliferación deben adoptar un perfil glucolítico aeróbico, menos eficiente, para proveer al anabolismo tanto de cadenas de carbono como de ATP a alta velocidad. Adaptado de Gándara y Wappner, 2019 (*1*).

Un reporte más reciente indica que la glucólisis aeróbica también es necesaria para la proliferación celular en hematopoyesis de mamíferos (*55*). En este trabajo los autores observaron que los progenitores hematopoyéticos normales de médula ósea murina expresan PKM2 y LDHA, isoformas vinculadas al cáncer de PK y LDH respectivamente (Fig 1). PKM2 presenta una menor afinidad por su sustrato, el fosfoenolpiruvato, por lo que su alta prevalencia en tumores, así como en la hematopoyesis normal, es

interpretada como una manera de bloquear la glucólisis (*31*). El bloqueo del flujo glucolítico en este punto de la vía provoca un aumento en las concentraciones en el estado estacionario de metabolitos glucolíticos requeridos para el anabolismo. La LDHA se considera, habitualmente, como la isoforma de LDH con mayor eficiencia en la catálisis de la conversión de piruvato a lactato, lo cual explica por qué se necesita en condiciones altamente glucolíticas (*35*). Notablemente, al forzar la fosforilación oxidativa a través de la ablación de PKM2 o LDHA se compromete la capacidad de los progenitores hematopoyéticos de proliferar y fallan en repoblar de hemocitos a ratones que han sufrido un trasplante de médula ósea.

Una descripción mecanística más profunda de la reprogramación metabólica puede hallarse en Zheng et al (*56*). En este trabajo, los autores demostraron en un modelo de diferenciación neuronal en cultivo que las células madre pluripotentes requieren reprogramar su metabolismo energético desde la glucólisis aeróbica hacia la fosforilación oxidativa para diferenciarse en neuronas maduras. Ellos emplearon células madre pluripotentes inducidas (CMPi), las cuales derivan de células diferenciadas que fueron sometidas a reprogramación genética para alcanzar un estado similar al de células madre embrionarias. Así, es posible inducir la diferenciación neuronal de estas células reprogramadas modificando las condiciones de cultivo (factores de crecimiento, matriz extracelular, etc) (*57*). Aunque estas células cumplen diversos criterios para ser definidas como células madres pluripotentes, no es claro hasta qué punto la fisiología celular de las CMPi's y de las células madre embrionarias son efectivamente comparables. Sin embargo, este diseño experimental provee un modelo adecuado para llevar a cabo intervenciones genéticas o farmacológicas con el fin de evaluar el rol del metabolismo en la diferenciación celular. De acuerdo a los autores, la base molecular de la reprogramación metabólica hacia la fosforilación oxidativa involucra varios eventos clave: la inhibición de LDHA, el cambio de isotipo desde PKM2 hacia PKM1, la inhibición de los transportadores de glucosa GLUT1/3, la inhibición de la hexoquinasa 2 (HK2) y un aumento de la actividad PDH mediada por una disminuida actividad de PDHK. Resulta notable que todos estos genes han sido previamente identificados como genes vinculados al metabolismo tumoral (Tabla 1). Sorprendentemente, la sobrexpresión en estas células de LDHA y HK2 (Fig 1)

resultó suficiente para prevenir la reprogramación metabólica, provocando un bloqueo total de la diferenciación neuronal (Fig 3). Independientemente de la inhibición glucolítica, un incremento en la biogénesis mitocondrial también ocurre durante la diferenciación y fue atribuido principalmente a la activación de dos factores de transcripción: peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1α (PGC-1α) y el estrogen related-receptor γ (ERRγ).

Otro trabajo publicado el mismo año describe una caracterización temporal del metabolismo energético asociado a la diferenciación neuronal de células en cultivo obtenidas a partir del hipocampo embrionario de rata (*58*). Este reporte muestra que la glucólisis cumple un rol predominante en fases tempranas de la diferenciación, mientras que la bioenergética mitocondrial y la glutamina se requieren en fases más tardías, incluyendo la ramificación dendrítica y la maduración (Fig 3). Los autores del trabajo llegan a esta conclusión no solo a través de una descripción del perfil metabólico a lo largo de las sucesivas etapas del desarrollo neuronal, sino también a través de la modulación farmacológica del metabolismo. Al bloquear la glucólisis por adición del inhibidor competitivo 2-deoxy-D-glucosa, la diferenciación se detuvo en una etapa temprana, mientras que al comprometer al ciclo TCA alimentado por glutamina inhibiendo farmacológicamente y de manera selectiva a la glutaminasa, la diferenciación se detuvo en estadíos más tardíos. A nivel molecular, entre los mecanismos identificados en este trabajo que promueven el metabolismo glucolítico se encuentran la inducción del transportador de glucosa GLUT3 y la activación de la fosfofructoquinasa (Fig 1); ambos previamente identificados como genes vinculados al efecto Warburg (tabla 1). Al igual que en el reporte de Zheng y colaboradores (*56*), PGC-1α también fue caracterizado en este trabajo como el inductor de la biogénesis mitocondrial.

De acuerdo a la interpretación anabólica del efecto Warburg, el flujo glucolítico exacerbado que se observa en células en proliferación no precisa estar acompañado de una actividad mitocondrial inhibida; la glucólisis y el metabolismo oxidativo mitocondrial simplemente necesitan estar *desacoplados*. De hecho, un trabajo reciente (*59*) sugiere que la respiración mitocondrial cumple un rol central en células en proliferación al proveer de aceptores de electrones requeridos para la síntesis de

aspartato. Este trabajo muestra, empleando células de mamífero en cultivo, que la inhibición de la cadena de transporte de electrones compromete el crecimiento y la proliferación. Sin embargo, la proliferación celular se recupera suplementando a las células con α-cetobutirato, el cual actúa como un aceptor de electrones exógeno que no contribuye ni a la producción de ATP ni a las síntesis de metabolitos. En la mayoría de la células en cultivo estudiadas metabólicamente, el esqueleto de carbono usado para la síntesis *de novo* de aspartato proviene de la glutamina anaplerótica (Fig 1). La desaminación de la glutamina produce glutamato, el cual a su vez puede convertirse en 2-OG mediante transaminación (*49*). Luego, el 2-OG puede ser convertido en oxalacetato, el cual es el α-cetoácido requerido para la biosíntesis de aspartato. La síntesis de oxalacetato a partir de 2-OG se puede lograr usando a las enzimas del ciclo TCA ya sea a través de una ruta metabólica oxidativa (2-OG→succinato→fumarato→malato→oxaloacetato) o a través de una vía reductiva (2-OG→isocitrato→citrato→oxaloacetato). Ambas rutas requieren elevados niveles de aceptores de electrones, de forma que la falta de estos aceptores en células cuya respiración se encuentra inhibida permiten explicar la deficiencia de aspartato que estas células poseen y los consecuentes defectos en su capacidad proliferativa. Notablemente, el suministro de aspartato resultó ser suficiente para restaurar la capacidad proliferativa en células tratadas con inhibidores de la cadena de transporte de electrones, confirmando que el rol principal del metabolismo mitocondrial en estas células consiste, precisamente, en proveer de aceptores de electrones a la bioquímica celular.

Los estudios de Miyazawa et al. sobre los cambios metabólicos experimentados por el embrión de ratón luego de la ramificación corio-alantoica (RC) aportan una visión más compleja de la bioenergética del desarrollo (*60*). La RC es un proceso requerido para el intercambio materno-fetal de gases y nutrientes que ocurre luego de la implantación del embrión. Experimentos clásicos de la década del 70' (*61, 62*) parecían indicar que embriones tempranos inhiben la glucólisis y activan el ciclo TCA luego de la RC, un período de la embriogénesis caracterizado por un rápido crecimiento embrionario. Esta observación, en principio, resultaría contradictoria con un modelo del desarrollo basado en el efecto Warburg, ya que muestra una inhibición glucolítica en células

sometidas a un rápido crecimiento y alta proliferación. Debido a las limitaciones técnicas de la época, las únicas mediciones empleadas para caracterizar el estado metabólico de estos embriones consistieron en determinar los niveles de lactato extracelular y la liberación de CO_2. Por lo tanto, el estado metabólico real de los embriones no había sido caracterizado correctamente. Las técnicas más modernas empleadas por Miyazawa, sin embargo, hicieron posible un análisis más profundo de este proceso. Este trabajo (*60*) muestra que en lugar de simplemente inhibir la glucólisis, los embriones que están atravesando la RC desvían el flujo glucolítico hacia la vía de las pentosas fosfato a través de la inhibición de las enzimas glucolíticas PFK-1 y aldolasa (Fig 1), sosteniendo así la síntesis de biomasa. La síntesis de lactato no se encuentra inhibida, sino que por el contrario se encuentra incrementada, aunque el lactato no es secretado inmediatamente al medio externo como se creía anteriormente. De hecho, la distribución de lactato intracelular aparenta ser heterogénea en el embrión, aunque la relevancia biológica de esta interesante observación no ha sido explorada. De cualquier manera, los cambios metabólicos observados durante la RC pueden ahora ser entendidos de acuerdo a la interpretación anabólica del efecto Warburg.

3. Reportes "disonantes" sobre la bioenergética del desarrollo

Hasta aquí hemos resumido algunos de los trabajos más relevantes que apoyan la noción de que la proliferación activa requiere un metabolismo glucolítico aeróbico para sustentar la acumulación de biomasa (Fig 3). Sin embargo, existen estudios que aparentemente contradirían esta idea, ya que reportan que ciertas células experimentan un cambio metabólico hacia la glucólisis durante la diferenciación terminal (*63, 64*). Asimismo, otro trabajo describe que ciertas células madre dependen de un metabolismo mitocondrial muy activo (*65*).

Esteban-Martinez y sus colaboradores (*63*) llevaron a cabo una caracterización metabólica del desarrollo de la retina murina empleando un diseño experimental combinado *ex vivo*/*in vivo*. Las células ganglionales retinales (CGRs) son un tipo de neuronas típicas de la retina que transmiten información visual de distinto tipo al

cerebro. Este trabajo muestra que la diferenciación de CGRs depende de una reprogramación bioenergética hacia el metabolismo glucolítico definido por un incremento en la producción de lactato y una elevada expresión de genes glucolíticos. Sorprendentemente, el cambio metabólico se alcanza no solo por regulación de enzimas centrales para el control del flujo metabólico, sino a través de la eliminación de mitocondrias mediante mitofagia. De esta manera, la diferenciación de CGRs se bloquea al inhibir la mitofagia farmacológicamente, lo cual implica que la reducción neta de la masa mitocondrial es un requisito indispensable para una correcta diferenciación. Sin embargo, los autores demostraron también que la retina embrionaria de ratón experimenta hipoxia del desarrollo, condición que sin duda compromete la fosforilación oxidativa mitocondrial. Esto explicaría el hecho de que las mitocondrias sean dispensables en la diferenciación de CGRs, permitiendo que la biomasa mitocondrial se emplee como combustible para alimentar otros procesos de la fisiología celular. La estabilización farmacológica de HIF-1α, el principal activador de la respuesta transcripcional a hipoxia, indujo la diferenciación de CGRs, en base a lo cual los autores especularon que la reprogramación metabólica que ocurre durante la diferenciación de CGRs es disparada principalmente a través de esta vía.

Otro estudio reciente, realizado *in vitro* en células madre mesenquimáticas de ratón (rCMMs), también reporta la adquisición de un perfil metabólico glucolítico por parte de células terminalmente diferenciadas (*64*). En este estudio, los autores aislaron rCMMs, para luego inducir su diferenciación hacia osteocitos, condrocitos o adipocitos. Mientras que el compromiso de diferenciación hacia adipocitos u osteocitos involucra un incremento relativo de la respiración mitocondrial, el metabolismo mitocondrial se inhibe durante la condrogénesis. En línea con el trabajo de Esteban-Martinez et al (*63*), el perfil glucolítico en este caso también se alcanza controlando la cantidad de mitocondrias a través de la mitofagia dependiente de LC3. Notablemente, como ocurre en CGRs, la diferenciación de condrocitos también depende de un microentorno hipóxico (*66*). Así, la diferenciación de células retinales y la diferenciación de rCMMs en condrocitos comparten características metabólicas remarcables.

Alternativamente, Rodríguez-Colman et al plantean una alternativa diferente a la hipótesis de que un metabolismo glucolítico aeróbico se requiere para sustentar el

crecimiento y la proliferación celular (*65*). Las células columnares de la base de la cripta (CCBCs) son células madre del intestino de mamíferos que se disponen en la base de las criptas intestinales, rodeadas por células terminalmente diferenciadas llamadas células de Paneth. Los autores observaron que células de Paneth aisladas y cultivadas *in vitro* exhiben un metabolismo predominantemente glucolítico con altas tasas de síntesis de lactato, mientras que las CCBCs en cultivo muestran una actividad mitocondrial notablemente incrementada. Usando un modelo de desarrollo de organoides intestinales, los autores reportan que la inhibición de la glucólisis en las células de Paneth, así como la inhibición de la cadena de transporte de electrones en las CCBCs, compromete la fisiología de las células madre y el desarrollo de los organoides. Llamativamente, las células de Paneth tratadas con inhibidores de transportadores de lactato fueron incapaces de sustentar la formación de organoides. Esto sugiere que las células de Paneth contribuyen a la actividad de las células madre proveyendo a éstas de lactato, el cual emplean como combustible del metabolismo mitocondrial propio de las CCBCs. El análisis tradicional del metabolismo de células madre se ha centrado en la importancia de inhibir la actividad mitocondrial para prevenir la biogénesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el consecuente daño oxidativo del ADN, evitando así mutaciones en las células hijas (*67*). Trabajos futuros deberán explorar posibles funciones de las ROS como mediadores fisiológicos de la transducción de señales en células madre, antes de poder integrar estos resultados aparentemente paradójicos en nuestra concepción actual del metabolismo de células madre.

Los resultados experimentales descriptos en esta última sección ilustran el hecho de que cada linaje celular particular tiene sus propios requerimientos energéticos y metabólicos, por lo que debemos ser cautos a la hora de generalizar sobre los aspectos metabólicos del desarrollo. Además, estas observaciones resaltan la importancia de contar con herramientas que permitan discriminar el estado bioenergético de sub-poblaciones celulares formando parte de un órgano o tejido complejo, de forma mínimamente invasiva.

El metabolismo y la transducción de señales en el desarrollo: epigenética

1. El metabolismo y la regulación epigenética

No es posible alcanzar una regulación precisa de la transcripción sin recurrir al control epigenético. Este, a su vez, se logra a través de diversos mecanismos que incluyen la metilación del ADN y la modificación post-traduccional de histonas. Durante la última década, el hecho de que el estado metabólico impacta en el perfil epigenético de la célula ha sido firmemente establecido a través de distintas líneas de evidencia (Fig 4 (*68, 69*)).

La acetilación de histonas está mediada por acetil-transferasas específicas (HATs), que catalizan la conjugación de un grupo acetilo proveniente de acetil-CoA a un residuo de lisina en una histona. Esta modificación altera la arquitectura de la cromatina, y es considerada habitualmente como una marca epigenética que favorece la transcripción (*70*). El acetil-CoA es producido por el complejo PDH en la mitocondria, empleando piruvato como sustrato (Fig 1). Sin embargo, el acetil-CoA que utilizan las HATs pertenece a un reservorio nuclear-citoplasmático de este metabolito, aislado topológicamente del reservorio mitocondrial. El acetil-CoA nuclear es producido por la ATP-citrato liasa, que emplea citrato mitocondrial como precursor (*71*). El citrato sí puede difundir libremente desde la mitocondria al citosol y luego al núcleo, de manera que sus niveles afectan directamente la actividad de las HATs (*71*). El proceso inverso, la deacetilación de histonas, es catalizado por deacetilasas (HDACs) y sirtuínas. La deacetilación de histonas también se encuentra bajo control metabólico, ya que las sirtuínas actúan como sensores del cociente NAD^+/NADH. Estas enzimas utilizan NAD^+ como cofactor, de forma que una disminución en el cociente NAD^+/NADH, como la observada en células con alto flujo glucolítico, inhibe su actividad (*69, 72*).

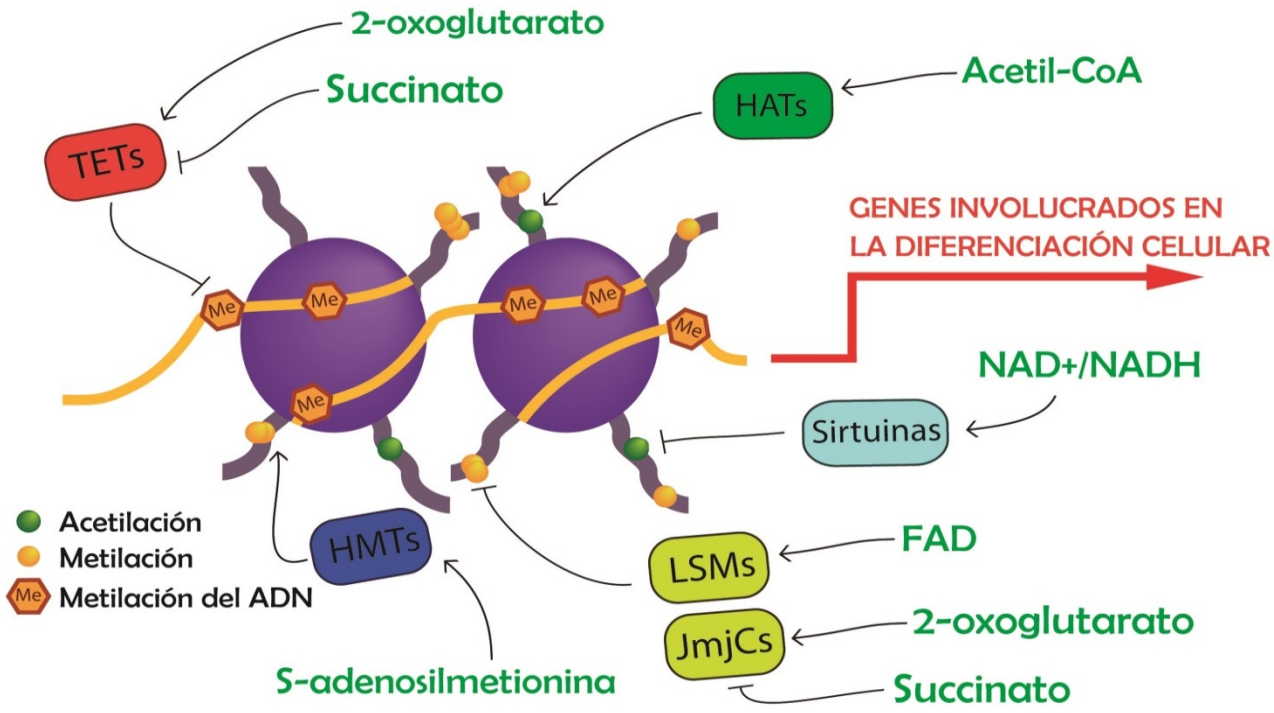


Figura 4: El metabolismo puede afectar el perfil epigenético de la célula de distintas maneras. El acetil-CoA es requerido para la acetilación de histonas. SAM, FAD y el cociente 2-OG/succinato controlan la metilación y demetilación de histonas. El cociente 2-OG/succinato también puede alterar el estado de metilación del ADN. Adaptado de Gándara y Wappner, 2019 (*1*).

Las histonas también pueden mono-, di- o trimetilarse en diferentes lisinas o argininas. A diferencia de lo que ocurre con la acetilación, la metilación de histonas puede favorecer o inhibir la transcripción dependiendo del contexto (*73*). La metilación es catalizada por metiltransferasas de histonas (HMTs) que emplean S-adenosilmetionina (SAM) para transferir un grupo metilo hacia el residuo apropiado en la cola de la histona blanco. La SAM es producida, a su vez, por la S-adenosilmetionina transferasa (MAT) en una reacción que requiere metionina y ATP como sustratos (*73*). Así, los niveles de SAM dependen directamente del estado del metabolismo energético de la célula (*74*). La reacción inversa está catalizada por demetilasas de histonas (HDMs), que pueden pertenecer a dos grupos de proteínas diferentes: la familia LSD, o la familia de dioxigenasas JmjC (*75*). Mientras que las enzimas de la familia LSD utilizan FAD^+ como co-factor, las que pertenecen a la familia JmjC emplean 2-OG y O_2 como co-sustratos (*76*). El 2-OG es un metabolito intermediario del ciclo TCA sintetizado y consumido por enzimas que funcionan lejos del equilibrio: la isocitrato deshidrogenasa

y la 2-OG deshidrogenasa respectivamente (Fig 1 (*2*)). Debido a ello, se asume habitualmente que los niveles estacionarios de 2-OG reflejan el flujo metabólico en el ciclo TCA. Se ha reportado que cambios en la dieta que repercuten en los niveles de SAM, FAD o 2-OG tanto en la mitocondria como en el citoplasma afectan el patrón de metilación de histonas a través de la modulación de la actividad de las enzimas LSD o JmjC (*73*). Notablemente, la actividad de muchas de las enzimas JmjC no solo depende de la concentración de 2-OG, sino que además es inhibida por succinato, el cual se produce por oxidación del 2-OG en el ciclo TCA (*76*). De esta forma, el cociente 2-OG/succinato es en verdad el que controla metabólicamente la actividad de estas enzimas.

El 2-OG puede, además, regular la metilación del DNA. La familia TET de 5-metilcitosina (5mC) hidroxilasas está involucrada en la demetilación del DNA. Estas enzimas comparten ciertas características con las dioxigenasas JmjC, que actúan como demetilasas de histonas (*76*). En particular, las hidroxilasas TET también requieren 2-OG como co-sustrato, por lo que están sujetas a la misma clase de regulación metabólica que las enzimas JmjC. Tal como se mencionó anteriormente, el 2-OG es producido en el ciclo TCA por la isocitrato deshidrogenasa (Fig 1). Varias mutaciones de esta enzima vinculadas al cáncer conducen a la síntesis de un producto alternativo, el D-2-hidroxiglutarato (D-2HG), el cual es frecuentemente considerado como un oncometabolito y muy raramente se lo encuentra en células normales. El D-2HG es, de hecho, un inhibidor competitivo de las dioxigenasas dependientes de 2-OG, grupo de enzimas que incluye a las JmjC y a las TETs. De hecho se ha reportado que un aumento en la concentración de este oncometabolito conduce de forma directa a la alteración del perfil de metilación de histonas, lo cual contribuye a la tumorigénesis (*77*).

2. La diferenciación celular y el desarrollo requieren alteraciones epigenéticas controladas por el metabolismo

La sección anterior describe distintas maneras a través de las cuales el estado metabólico de la célula impacta sobre su perfil epigenético (Fig 4). Estudios recientes

han comenzado a evaluar hasta qué punto los cambios epigenéticos requeridos para la progresión de la ontogenia se encuentran bajo control metabólico.

Las células madre pluripotentes (PSCs) cultivadas *in vitro* se caracterizan por un metabolismo glucolítico (*78*). El desacople del catabolismo mitocondrial respecto de la bioenergética celular que caracteriza a este perfil metabólico puede explicar los niveles elevados de acetil-CoA detectados en estas células. Aunque trabajos previos habían demostrado que la acetilación de histonas cumple un rol central en el mantenimiento de la estructura abierta de la cromatina típica de las PSCs (*79*), la idea de que la diferenciación celular puede depender directamente de los niveles de acetil-CoA recién fue evaluada por Moussaieff y colaboradores recientemente (*80*). Este trabajo muestra que una reducción en la concentración de acetil-CoA y la reducción concomitante de la acetilación de histonas son requeridas durante la diferenciación en cultivo de células madre embrionarias humanas y murinas. La disminución de la expresión de marcadores de pluripotencia fue observada luego de la inhibición farmacológica de la ATP-citrato liasa, la enzima que sintetiza al acetil-CoA citosólico (Fig 1). De forma consistente, la provisión externa de acetato retrasó la diferenciación de manera dosis dependiente. De hecho, la adición de acetato en dosis elevadas previno la pérdida de la acetilación de histonas característica de la diferenciación, conduciendo a un perfil de hiperacetilación de histonas. El efecto del acetato exógeno fue antagonizado por el ácido anacárdico, un conocido inhibidor de la actividad de las HATs. Resulta claro, por lo tanto, que la correcta diferenciación de las PSCs requiere reprogramar el metabolismo energético de manera tal que la concentración de acetil-CoA en el citosol se encuentre reducida, provocando una inhibición consecuente en la acetilación de histonas.

Un reporte más reciente aporta información adicional sobre el metabolismo de las PSCs, y describe la manera en la cual el 2-OG controla la metilación tanto de histonas como del ADN durante la diferenciación de estas células (*81*). En este trabajo, los autores manipulan los niveles citosólicos de 2-OG y succinato empleando dimetil-2-OG y dimetilsuccinato, análogos que difunden a través de la membrana hacia el interior celular. Mientras que un cociente 2-OG/succinato elevado aceleró la diferenciación celular, el incremento en los niveles de succinato la bloqueó por completo. De forma

consistente con este resultado, la inhibición de la succinato deshidrogenasa A, la enzima que convierte succinato en fumarato en el ciclo TCA, retrasó la diferenciación de estas PSCs. Aún más, la inhibición farmacológica de las enzimas JmjC y TETs mediada por dimetiloxalilglicina (DMOG) provocó también un bloqueo en la diferenciación celular. Así, estos resultados resaltan la función central de las enzimas JmjCs y TETs en la diferenciación de PSCs, estando ambas familias de enzimas controladas por el cociente 2-OG/succinato.

Mientras que los trabajos anteriores describen mecanismos de control metabólico que contribuyen a la diferenciación celular, Nagaraj et al reportan que este fenómeno está también vinculado a la activación del genoma cigótico (AGZ) en embriones de dos células en ratones (*82*). La AGZ comprende la degradación de los transcriptos maternos presentes en el embrión temprano, junto con el encendido de la transcripción cigótica. Trabajos previos habían demostrado que la transcripción cigótica depende de cambios en la arquitectura de la cromatina y alteraciones en el perfil epigenético (*83*); sin embargo el rol del metabolismo en estos procesos no había sido estudiado con anterioridad. Nagaraj y colaboradores reportaron que, durante la AGZ, la PDHK se localiza transitoriamente en el núcleo junto con las primeras enzimas del ciclo TCA (citrato sintasa, aconitasa 2 e isocitrato deshidrogenasa 3; Fig 1). Allí, estas enzimas median la síntesis de acetil-CoA y 2-OG de forma local. En ausencia de toda la maquinaria enzimática necesaria para completar el ciclo TCA, una cuarta enzima no considerada como parte de este ciclo, la piruvato carboxilasa, es requerida para mediar la conversión del piruvato en oxaloacetato, de forma que también se recluta en el núcleo junto con las demás enzimas metabólicas. Esta reorganización espacial de las cinco enzimas que median la síntesis de acetil-CoA y 2-OG a partir de piruvato conduce a un incremento de la concentración nuclear de estos metabolitos. En el núcleo, el acetil-CoA y el 2-OG modulan al patrón de acetilación y metilación de histonas. La inhibición de esta reprogramación metabólica subcelular comprometió a la AGZ y bloqueó el desarrollo embrionario en el estadío de dos células. Resulta evidente, por lo tanto, que el control metabólico del desarrollo ocurre incluso en los estadíos más tempranos de la ontogenia.

El metabolismo y la transducción de señales en el desarrollo: control directo

La sección anterior describe procesos en los cuales ciertos eventos de reprogramación metabólica observados durante el desarrollo se encuentran acoplados a la regulación epigenética requerida en diversos momentos de la embriogénesis. Sin embargo, existen trabajos que aportan evidencias de mecanismos no del todo elucidados, a través de los cuales el metabolismo regula programas de desarrollo alterando de manera directa la actividad de ciertas rutas de transducción de señales.

El estudio de Pegoraro y colaboradores (*84*) muestra que la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa-4 (PFKFB4), que clásicamente ha sido caracterizada como una enzima inductora de la glucólisis (*85*), actúa promoviendo la fosforilación de AKT en el ectodermo dorsal de embriones de *Xenopus* durante la gastrulación. PFKFB4 es una quinasa/fosfatasa bifuncional, que cataliza la conversión reversible de fructosa-6-fosfato, un metabolito glucolítico, en fructosa-2,6-bifosfato (Fig 1; (*85*)). Este metabolito no pertenece a la ruta glucolítica, sino que actúa como un activador alostérico de la fosfofructoquinasa 1, enzima central de la glucólisis. Esta activación de la vía AKT dependiente de PFKFB4 constituye un hito necesario para la diferenciación de los progenitores en el ectodermo dorsal de *Xenopus*, independientemente del destino de linaje que éstos adopten. Así, la alteración de esta activación de AKT provoca un arresto local del desarrollo, seguido de apoptosis. Llamativamente, la inhibición farmacológica de la glucólisis no afecta a la activación de AKT mediada por PFKFB4, lo cual indica que el proceso es independiente de la función que esta enzima cumple promoviendo la glucólisis. De hecho, el mecanismo molecular por el cual la actividad de la PFKFB4 conduce a la activación de AKT no ha sido aún elucidado.

De todas formas, los autores continuaron explorando las funciones de PFKFB4 en el ectodermo dorsal de *Xenopus*, y encontraron que esta enzima ejerce funciones adicionales en el desarrollo de la cresta neural (CN) (*86*). El silenciamiento de PFKFB4 de forma temporalmente controlada permitió discriminar dos funciones diferentes de la enzima en el desarrollo de esta estructura. En el estadío de néurula, el silenciamiento de PFKFB4 impacta sobre la expresión del gen twist, requerido para la especificación de la CN. Más tarde, en el estadío de *tailbud*, PFKFB4 es requerida nuevamente en la migración de la CN de forma autónoma de célula, regulando la

expresión de n-cadherina. Ambas funciones dependen de la fosforilación de AKT mediada por PFKFB4 que estos autores caracterizaron en su trabajo anterior (*84*). Sin embargo, en este caso la inhibición farmacológica de la glucólisis sí comprometió la migración de la CN, de forma que no es posible descartar que la actividad pro-glucolítica de PFKFB4 cumpla un rol en este proceso ontogenético. Los niveles de PFKFB4 se incrementan durante el desarrollo de la CN de manera dependiente de las vías canónicas de especificación de CN, como FGF8, Wnt y BMP, aunque se precisa un estudio más profundo para entender con detalle el mecanismo molecular subyacente.

El mesodermo presomítico de vertebrados (MPV) también ha sido objeto de estudios recientes que amplían la concepción actual de las maneras en las cuales el metabolismo y el desarrollo se interrelacionan. Bulusu y colaboradores (*87*) analizaron el perfil metabólico del MPV en embriones de ratón y descubrieron un gradiente de actividad glucolítica en esta región: mientras que las células mesenquimales indiferenciadas de la región posterior del MPV son altamente glucolíticas, las células comprometidas con programas de diferenciación de la porción anterior presentan una actividad elevada del catabolismo mitocondrial y la fosforilación oxidativa. Esta reprogramación metabólica que se observa durante la diferenciación celular en el MPV es producto de la inhibición transcripcional de la mayoría de los genes glucolíticos, siendo la aldolasa A (AldoA), la triosa fosfato isomerasa (TPI) y GAPDH las enzimas más agudamente afectadas (Fig 1). Según los autores, implantes de MPV cultivados *ex-vivo* en medio con piruvato como única fuente de carbono (lo cual impide la glucólisis) muestran severas anormalidades en el desarrollo, incluyendo defectos en la formación de somitos.

Aunque puede parecer que los resultados anteriores apoyan la hipótesis bioenergética según la cual el crecimiento rápido y la proliferación requieren un metabolismo glucolítico, la tasa de proliferación celular en ambas regiones del MPV fue determinada con anterioridad de forma rigurosa, empleando una variedad de estrategias experimentales distintas, y no se observaron cambios asociados a la diferenciación (*88, 89*). Es decir, la reprogramación metabólica vinculada a la diferenciación no responde a tasas de proliferación diferenciales entre progenitores indiferenciados y células comprometidas con linajes de diferenciación. Un reporte complementario publicado

casi en simultáneo (*90*) provee una comprensión más profunda de este fenómeno. Este trabajo, llevado a cabo en embriones de pollo, muestra que el gradiente glucolítico en el MPV es generado por la vía FGF, ya que su inhibición farmacológica disipa el gradiente de lactato y reduce los niveles de la mayoría de las enzimas glucolíticas en la región posterior del MPV. La inhibición farmacológica de la glucólisis no alteró la proliferación ni la tasa de muerte celular en este tejido, pero sí comprometió a la motilidad celular estocástica, un proceso requerido en los movimientos de elongación posterior del embrión de pollo. En microambientes tumorales, la motilidad de las células malignas depende directamente de su metabolismo glucolítico. La secreción de lactato que caracteriza al metabolismo glucolitico acidifica el entorno extracelular, lo cual a su vez activa a las metaloproteinasas requeridas para remodelar la matriz extracelular durante la metástasis (*91*). Para testear si este mismo mecanismo rige el desarrollo del MPV, Oginuma y colaboradores (*90*) interfirieron la acidificación extracelular cultivando a los embriones en un medio alcalino, lo cual produjo una reducción en la motilidad celular similar a la observada en el experimento anterior. De esta manera, el metabolismo glucolítico sería requerido para modificar el pH externo y alterar la matriz extracelular, posibilitando los movimientos morfogenéticos que dirigen el desarrollo del MPV (*90*).

Curiosamente, este trabajo (*90*) describe otro rol inesperado de la glucólisis en las células indiferenciadas del MPV: la inhibición farmacológica de la glucólisis compromete en estas células a la actividad de la vía Wnt, bloqueando la translocación de b-catenina al núcleo junto con la transcripción de dos genes blanco de esta vía, Axin y Brachyury. Así, la glucólisis inducida por la vía FGF promueve la actividad de la vía Wnt en el MPV de pollo. Al igual que en los casos anteriores, el mecanismo preciso por el cual el estado metabólico de la célula altera la vía Wnt no ha sido elucidado. Globalmente, estos resultados destacan un proceso adicional a través del cual el perfil metabólico afecta la diferenciación y la fisiología celular: la modulación de la actividad de vías de transducción de señales (Fig 5).

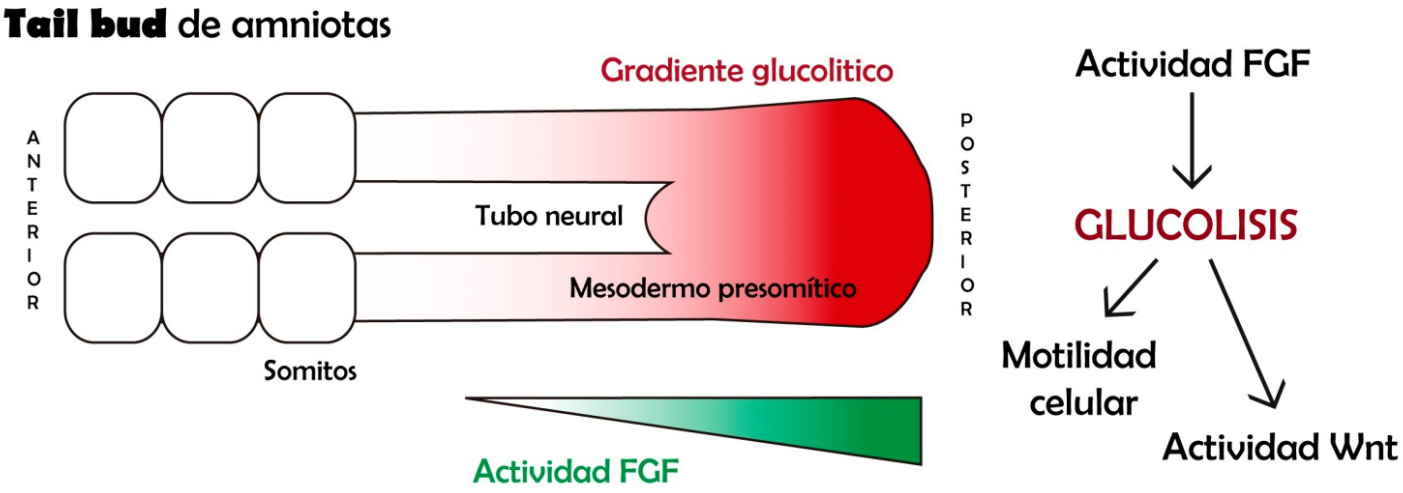


Figura 5: Las rutas metabólicas como transductores de señales. El perfil glucolítico de las células indiferenciadas en el mesodermo presomítico no es producto de los requerimientos bioenergéticos de estas células, sino que actúa vinculando la señal de FGF a la vía Wnt. Adaptado de Gándara y Wapner, 2019 (*1*).

Drosophila melanogaster como organismo modelo para Metabo-Devo

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, es un insecto holometábolo que pertenece al orden Díptera. Esta especie ha sido utilizada como organismo modelo en biología desde hace más de cien años. A comienzos del siglo XX, *Drosophila* fue empleada en los trabajos seminales de la genética moderna, permitiéndole a Thomas Hunt Morgan elucidar el rol de los cromosomas en la herencia mediante la combinación de experimentos citológicos y genéticos. Estos estudios pioneros condujeron al descubrimiento de la herencia ligada al sexo y al establecimiento de los conceptos de mapeo cromosómico, epistasis, etc (*92*). Rápidamente, otros campos de la biología aprovecharon el conjunto de herramientas genéticas desarrolladas en *Drosophila*, adaptando este modelo para sus propios intereses. Estudios llevados a cabo en *Drosophila* contribuyeron críticamente a la concepción actual de la biología del desarrollo (*93*), de las vías de señalización (*94*), la progresión del ciclo celular(*95*), la fisiología del sistema nervioso y la etología (*96*) e incluso se ha empleado como modelo de enfermedades humanas (*97*).

Dado que se trata de un insecto holometábolo, el individuo adulto de *D. melanogaster* se forma a través de una metamorfosis completa. Su ciclo de vida (Fig 6) consta de una breve embriogénesis sucedida por tres fases larvales (1er, 2do y 3er estadío). El 3er estadío larval se da por concluido con la formación de una pupa, la cual se transforma en el adulto sexualmente maduro. Al tratarse de un organismo ectotermo, el tiempo en el cual transcurren las diferentes etapas del ciclo de vida depende de la temperatura. A 25ºC la embriogénesis dura alrededor de 21 horas, luego de las cuales eclosiona la larva de 1er estadío. Estas larvas se entierran en el alimento y aumentan significativamente su tamaño hasta mudar al 2do estadío 24 horas después. Luego de alimentarse durante 24 horas adicionales, las larvas mudan nuevamente alcanzando el 3er estadío. Estas larvas alcanzan su tamaño definitivo, 200 veces mayor al de una larva del 1er estadío recién eclosionada, después de alimentarse durante 48 horas. Este notable aumento en el tamaño no es producto de un incremento en la cantidad de células del organismo, sino que refleja principalmente un aumento en el tamaño celular de ciertos tejidos (*98*). A su vez, el crecimiento celular se genera como consecuencia del incremento en la cantidad de ADN de cada célula, produciendo tejidos politénicos (*99*). Alcanzado este punto, la larva abandona el alimento en busca de un lugar donde pupar. En un estadío pre-pupal ocurre la histólisis de gran parte de los tejidos larvales, permitiendo que estos sean empleados como fuente de nutrientes y energía para el crecimiento y la proliferación de los tejidos no politénicos que darán origen al individuo adulto. Así, durante la metamorfosis el animal experimenta una reorganización completa de su plan corporal, luego de la cual emerge el individuo adulto sexualmente activo (*100*). Los adultos tienen una expectativa de vida de aproximadamente 60 días a 25ºC.

A pesar de que *D. melanogaster* es actualmente uno de los organismos modelo más ampliamente utilizado en biología del desarrollo, muy pocos trabajos han encarado el estudio de los aspectos metabólicos de la ontogenia en esta especie. Uno de estos trabajos (*101*) muestra cómo, 12 horas antes de la eclosión, el embrión de *Drosophila* activa transcripcionalmente la mayoría de los genes que codifican enzimas glucolíticas, incluyendo al ortólogo de la LDH, denominado también ImpL3. El receptor vinculado a estrógeno de *Drosophila* (dERR) coordina esta transición metabólica, la cual permite a

las larvas recién eclosionadas convertir los carbohidratos provenientes de la ingesta en biomasa. Este perfil metabólico es esencial para lograr el colosal incremento de tamaño corporal que se observa durante los 4 días de desarrollo larval. La inhibición de la glucólisis que ocurre en los mutantes de dERR o de la PFK genera una disminución en la concentración de ATP concomitante con un incremento en los niveles de azúcares en la hemolinfa. Si bien estas larvas mueren en el 2do estadío, hasta el momento no

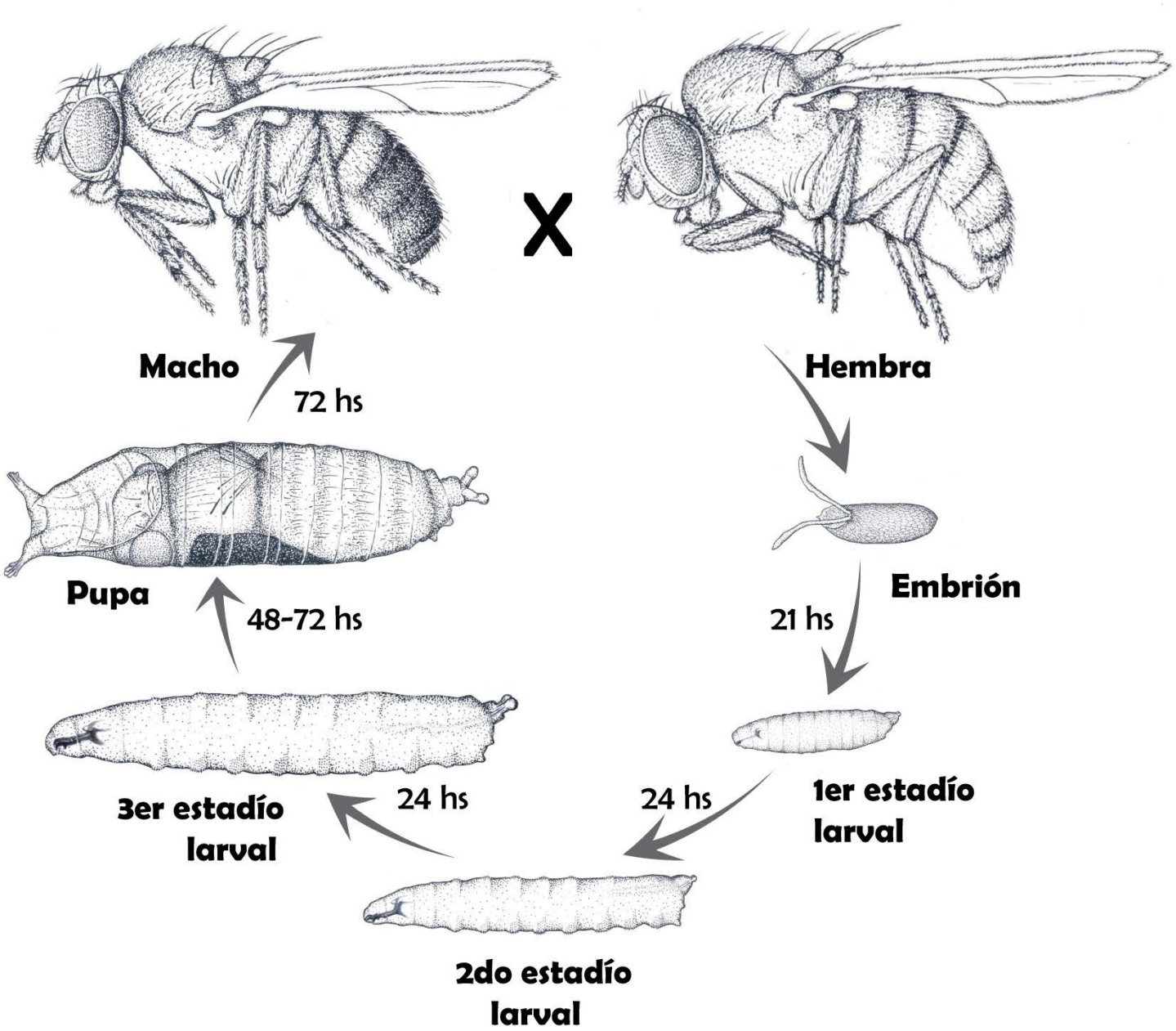


Figura 6: Ciclo de vida de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, utilizada como organismo modelo en esta tesis. En el texto se describen los detalles del proceso. Los tiempos indicados entre cada estadío refieren al desarrollo a 25ºC. Ilustraciones en tinta realizadas por Ayelén Valko.

hay evidencia de que la letalidad se deba a un compromiso en la proliferación celular generado por la inhibición glucolítica. No es posible descartar un efecto general causado sobre la fisiología del animal por el bloqueo metabólico.

Otro reporte (*102*) aprovecha la disponibilidad de bases de datos que organizan la información obtenida en experimentos a gran escala en *Drosophila*. El proyecto modENCODE incluye perfiles transcripcionales exhaustivos de embriones de *Drosophila* en distintos estadíos obtenidos mediante RNA-seq. Los autores usan una herramienta matemática, denominada *descomposición en valores singulares* (SVD), para buscar en esta base de datos patrones de expresión génica en diferentes puntos de la embriogénesis. Así, identificaron que junto con la transición metabólica del embrión descripta en su trabajo anterior (*101*), se activan alrededor de 500 genes incluidos en la categoría "*Generación de precursores metabólicos y energía*". Sorprendentemente, los genes activados que pertenecen a esta categoría comprenden no solamente aquéllos que codifican enzimas glucolíticas sino también genes involucrados en el metabolismo mitocondrial, como una subunidad del complejo PDH, elementos de la cadena de transporte de electrones y enzimas del ciclo TCA (Fig 1). Sin embargo, en el mismo trabajo los autores reportan un análisis metabolómico de los diferentes estadíos embrionarios, el cual indica que la fosforilación oxidativa estaría atenuada durante la embriogénesis, ya que los embriones experimentan un bloqueo en el ciclo TCA que conduce a niveles elevados de citrato, isocitrato y 2-OG (Fig 1). Nuevamente, este perfil metabólico de los embriones de *Drosophila* recuerda al efecto Warburg en las células tumorales, donde el metabolismo glucolítico se requiere para sustentar tasas anabólicas elevadas. Sin embargo, la contribución precisa de la fosforilación oxidativa a la bioenergética de la embriogénesis en *Drosophila* permanece aún inexplorada.

El desarrollo neural de *Drosophila* también ha sido sometido a estudios metabólicos (*103*). Los neuroblastos larvales (NBs) son células progenitoras similares a células madre, cuya diferenciación involucra un proceso de división celular asimétrica. Esta división da lugar a una célula grande que mantiene la identidad de progenitora y a otra más pequeña comprometida con la diferenciación a neuronas o glía (*104*). La célula hija que mantiene la identidad NB conserva también la tasa anabólica elevada que le permite recuperar su tamaño original. De esta manera, los NBs mantienen un volumen

constante a través de todo el desarrollo larval. Durante el estadío de pupa, los NBs reducen su tamaño progresivamente, hasta que finalmente se comprometen con la diferenciación terminal, lo cual provoca que la proliferación celular en el cerebro del adulto sea marginal o nula (*105*). Homem y colaboradores (*103*) describen que tanto el receptor de ecdisona como el complejo Mediator de *Drosophila* son requeridos para disparar una reprogramación metabólica hacia la fosforilación oxidativa, vinculada al encogimiento de los NBs en pupas. Curiosamente, en NBs donde se han silenciado elementos centrales del ciclo TCA (como la 2-OG deshidrogenasa) o de la cadena de transporte de electrones (como la citocromo c oxidasa) observaron un mayor tamaño celular y un tiempo de vida aumentado. Así, los autores especulan que la reducción en el tamaño de los NBs es producto de la incapacidad del metabolismo oxidativo mitocondrial de sustentar la tasa biosintética elevada de los NBs tempranos. La ecdisona es una hormona esteroidea de los insectos que dispara la muda y la pupariación (*106*), por lo que la transición metabólica regulada por el receptor de ecdisona resulta notable, ya que constituye un ejemplo claro de una reprogramación del metabolismo energético controlada por un regulador ontogenético clásico.

También se han identificado en *Drosophila* regulaciones metabólicas del perfil epigenético vinculadas al desarrollo (*107*). En este trabajo, los autores describen que las larvas de esta especie sintetizan un metabolito inusual, el L-2-hidroxiglutarato (L-2HG), el cual afecta el patrón de metilación del ADN en células que formarán parte de los tejidos del adulto. El L-2HG es el enantiómero del D-2HG, oncometabolito descrito en una sección anterior (ver *El metabolismo y la regulación epigenética*). Este metabolito suele ser considerado como un producto aberrante sintetizado por la malato deshidrogenasa o las LDHs A y C (LDHA y LDHC; Fig 1). Sin embargo, en *Drosophila* el L-2HG pareciera estar sintetizado exclusivamente por LDH, tal como se infiere a partir de resultados genéticos y bioquímicos (*107*). Luego de la pupariación, la concentración de L-2HG disminuye drásticamente debido a la actividad de la L-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa, lo cual constituye una inesperada regulación fisiológica de este metabolito. Como ocurre con su enantiómero dextrógiro, el L-2HG afecta la actividad de las dioxigenasas dependientes de 2-OG, incluyendo a las demetilasas del ADN pertenecientes a la familia TET. Aunque los niveles larvales de N-6-metildesoxiadenosina (6mdA) no se ven alterados en mutantes de LDH incapaces de

sintetizar L-2HG, la abundancia de esta modificación en el ADN genómico del adulto sí se reduce bruscamente frente a la falta de actividad LDH. Por lo tanto, este hallazgo sugiere que la producción de L-2HG durante el desarrollo larval sí impacta en la metilación del ADN, aunque solo lo hace en tejidos que estarán representados en la mosca adulta. En células tumorales de mamífero, la acumulación de 2-HG altera las marcas epigenéticas y a la arquitectura de la cromatina (*108*), pero ningún estudio ha reportado, hasta el momento, roles fisiológicos de este metabolito en el desarrollo de vertebrados. Debe aún investigarse si esta función del L-2HG que ha comenzado a explorarse en *Drosophila* se encuentra conservada en vertebrados.

Biosensores FRET para el análisis metabólico de *Drosophila*

Todos los análisis metabólicos discutidos en las secciones anteriores se enfrentan al problema experimental de definir espacial y temporalmente el perfil metabólico de las poblaciones celulares bajo estudio. Es decir, todos los trabajos anteriores buscan discernir el estado del metabolismo en una región particular de un tejido u órgano dado, en una sub-población celular específica, o analizar cómo cambia el metabolismo de cierta región en los distintos estadíos del desarrollo. Para ello, no obstante, emplean técnicas donde las muestras son manipuladas exhaustivamente, lo cual trae aparejada la pérdida de información espacial y temporal, indispensable en biología del desarrollo.

En este trabajo de tesis, por lo tanto, nos propusimos desarrollar herramientas que faciliten abordar este problema experimental. Para ello decidimos adaptar a *Drosophila* biosensores que permitirán identificar características metabólicas de células individuales mediante técnicas de microscopía de fluorescencia, sin perturbar la integridad del tejido. Con ellos, será posible en trabajos futuros profundizar en el conocimiento de aspectos metabólicos del desarrollo de esta especie, consolidando su rol como organismo modelo en el incipiente campo del Metabo-Devo.

En particular, generamos líneas transgénicas de *Drosophila* que poseen codificados en su genoma a los distintos sensores metabólicos. Estos biosensores son capaces de determinar cambios en los niveles citosólicos de metabolitos centrales para definir el estado bioenergético de la célula. Los sensores, desarrollados previamente en sistemas

más simples (bacterias o células en cultivo), son: LACONIC, sensor de lactato(*109*), PYRONIC, sensor de piruvato (*110*) y OGSOR, sensor de 2-oxoglutarato citosólico(*111*). Los tres biosensores emplean el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) para reportar alteraciones en la concentración del metabolito que sensan. El fenómeno de FRET consiste en la transferencia no radiativa de energía entre dos fluoróforos cuando la distancia entre ambos es pequeña, como consecuencia de un acoplamiento dipolo-dipolo (*112*). Así, la energía fluye de un fluoróforo excitado, definido como *dador*, hacia el fluoróforo *aceptor*, con una eficiencia dada por la ecuación 1, donde r es la distancia entre ambos y R_0 es la distancia a la cual se observa un 50% de energía transferida, la cual depende de las propiedades fotofísicas del par de fluoróforos utilizados (*113*).

$$E = \frac{1}{1+(r/R_0)^6} \qquad (1)$$

Para que ocurra FRET es importante que el espectro de emisión del dador se superponga sustancialmente con el espectro de absorción del aceptor, lo cual condiciona la elección de los pares de fluoróforos que actuarán como dador y aceptor. Los tres sensores funcionan esencialmente de la misma manera, empleando una configuración denominada heteroFRET (el dador y el aceptor son fluoróforos diferentes) intramolecular (el dador y el aceptor forman parte de la misma molécula). Todos ellos están construidos fusionando la proteína fluorescente cian (CFP), que actúa como dador, a la proteína fluorescente amarilla (YFP) que actúa como aceptor, a través de un dominio de unión al metabolito de interés (Fig 7.A). En el caso de Laconic, este dominio consiste en la región de unión a lactato del factor de transcripción LldR de *Escherichia coli* (*109*). En Pyronic el dominio de unión a piruvato se obtuvo del regulador transcripcional PdhR de *E. coli* (*110*). Por último, el dominio de unión a 2-OG de la proteína NifA proveniente de *Azotobacter vinelandii* fue empleado para construir OGSOR (*111*). En los tres casos, la unión del metabolito de interés produce un cambio conformacional en el sensor, que separa al par dador/aceptor e impide así la transferencia de energía entre ambos fluoróforos (Fig 7.B). De esta forma, aumentos en la señal FRET reflejan una disminución en las concentraciones citosólicas del metabolito monitoreado.

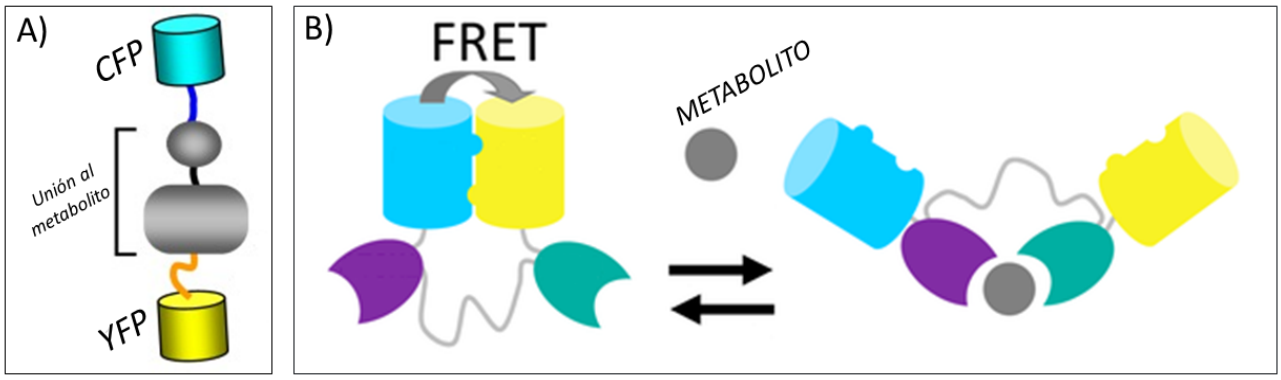


Figura 7: Esquema del funcionamiento de los biosensores FRET empleados en este trabajo. A) El par dador (CFP) / aceptor (YFP) se encuentra unido a través de un dominio de unión al metabolito de interés. B) En ausencia del metabolito, la distancia entre el dador y el aceptor es mínima, por lo que la transferencia de energía es máxima. La unión del metabolito al dominio específico separa al dador del aceptor, provocando una disminución en la transferencia de energía.

Reportero transcripcional del efecto Warburg

Paralelamente, adaptamos a *Drosophila* otro reportero, el cual permite identificar células individuales que podrían haber adquirido un estado metabólico glucolítico a través de un mecanismo regulatorio conservado en vertebrados. Este reportero se generó clonando la proteína fluorescente verde optimizada (eGFP) bajo el control del promotor de PDHK1 de mamíferos.

Tal como se observa en la figura 1, el punto de bifurcación del flujo metabólico que determina el perfil catabólico de la célula está determinado por el destino del piruvato. Mientras que en el metabolismo glucolítico el piruvato se reduce a lactato, reconstituyendo el poder oxidante de la célula, en el catabolismo dependiente de la fosforilación oxidativa este metabolito entra a la mitocondria, donde el complejo PDH lo convierte en acetil-CoA, permitiendo así su procesamiento a través de las reacciones del ciclo TCA (*2*). De esta manera, no resulta sorprendente que la actividad del complejo PDH se encuentre finamente controlada. La regulación de este complejo ocurre fundamentalmente a dos niveles. Por un lado, los productos de reacción acetil-CoA y NADH ejercen una inhibición directa sobre la actividad PDH (inhibición por producto) cuando sus niveles alcanzan valores relativamente altos en la matriz de la

mitocondria (*2, 114*). Pero el principal mecanismo regulatorio de PDH lo constituye la fosforilación de varias serinas en la subunidad 1 del complejo, modificación post-traduccional que inhibe la actividad del mismo (*114*). El estado de fosforilación de PDH es producto del balance de las actividades de distintas isoformas de PDHK, la quinasa que lo fosforila, y de diversas isoformas de la piruvato deshidrogenasa fosfata (PDP), enzima que remueve el fosfato de estos residuos. Estas isoformas (cuatro PDHK y dos PDP en mamíferos) están codificadas por genes distintos que se expresan diferencialmente en distintos tejidos y responden de manera distinta a diferentes vías de transducción de señales, contribuyendo a la especificidad de respuesta en la regulación de PDH (*114*). En *Drosophila* la actividad de PDHK y PDP se encuentra conservada, aunque no se han descripto diversas isoformas.

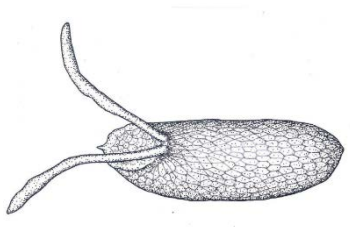
Considerando, entonces, la importancia del piruvato en los mecanismos de reprogramación del metabolismo energético celular, tampoco resulta sorprendente el hecho de que en varios contextos tumorales, el efecto Warburg se alcance como consecuencia de una sobre-activación transcripcional de la PDHK. En particular, la isoenzima PDHK1 se encuentra específicamente vinculada al fenotipo tumoral, habiéndose descripto niveles elevados de esta isoforma en células tumorales gástricas (*115*), linfomas (*116*), cáncer de pulmón (*117*) o diversos modelos de cáncer generados por mutación del gen supresor de tumores Sirt6 (*118*).

En base a esto, el grupo de Raul Mostoslavsky decidió clonar río arriba de mCherry una región de 1334 pb del genoma murino, la cual se encuentra inmediatamente río arriba del gen PDHK1. De acuerdo a la base de datos GeneHancer, en esta región existen 288 sitios de unión de factores de transcripción, entre los que se encuentran Myc, Sirt6, HDAC1 y Fos, por lo que seguramente constituye una fracción funcionalmente relevante del promotor de PDHK1. Analizando la expresión del reportero, Mostoslavsky y colaboradores notaron un incremento de la señal de mCherry asociado a la transformación tumoral en un modelo de cáncer de páncreas murino (datos no publicados).

Al adaptar este reportero a *Drosophila* hemos desarrollado una herramienta complementaria a los biosensores FRET, que permite identificar la presencia de elementos conservados en la reprogramación metabólica mediada por PDHK1. Esta adaptación consistió en generar líneas isogénicas que expresen eGFP bajo el control de

esta región promotora de 1334 pb (PDHK1->eGFP). La actividad del reportero, por lo tanto, no evidencia la activación transcripcional del gen PDHK de *Drosophila*, ya que la regulación podría no estar conservada, sino que reporta la actividad conservada de elementos de regulación transcripcional vinculados a la reprogramación metabólica y al efecto Warburg a través de PDHK1 en mamíferos.

Objetivos



Objetivos generales

El uso coordinado de técnicas transcriptómicas, proteómicas y metabolómicas genera datos que permiten analizar el triple vínculo entre niveles de mRNA, proteínas y metabolitos en cultivos celulares. De esta forma es posible comenzar a entender la regulación que cada enzima metabólica, cada transportador de metabolitos y cada intermediario de *signaling*, ejercen sobre el estado metabólico celular. No obstante, la posibilidad de realizar el mismo tipo de análisis en células no aisladas de su contexto biológico, es decir, en el contexto de un organismo pluricelular, se encuentra severamente limitada desde un punto de vista técnico. Mientras que la transcriptómica y la proteómica con resolución de célula-individual prometen un desarrollo exponencial en el futuro cercano, la metabolómica está aún lejos de alcanzar este grado de resolución (*119*).

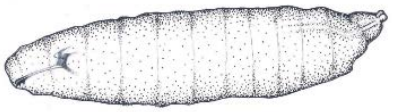
El **objetivo general** de esta tesis, por lo tanto, consiste en desarrollar herramientas que permitan analizar el metabolismo energético de un organismo pluricelular, *Drosophila melanogaster*, mediante microscopía de fluorescencia. Estas herramientas son líneas transgénicas que codifican a Laconic, biosensor FRET de lactato, Pyronic, biosensor FRET de piruvato, OGSOR, biosensor FRET de 2-OG citosólico y el reportero transcripcional del efecto Warburg PDHK1->eGFP.

Objetivos específicos

El desarrollo de estas herramientas involucra cumplir los siguientes objetivos específicos:

- Generar un protocolo de captura y procesamiento de imágenes que permita obtener señales de los sensores libres de artificios.
- Caracterizar la magnitud de la respuesta y el rango dinámico de los sensores al expresarlos en tejidos de *Drosophila.*
- Analizar la capacidad de estas herramientas de reportar reprogramaciones metabólicas descriptas previamente en la bibliografía.
- Evaluar la resolución de la información que generan estos sensores a través de la búsqueda de sub-poblaciones celulares dentro de órganos complejos con características metabólicas particulares.

Resultados



Señales FRET libres de artificios

Al comenzar a utilizar en órganos larvales los tres sensores FRET experimentamos ciertas dificultades técnicas. Estos biosensores fueron originalmente optimizados *in vitro*, y su actividad fue evaluada en modelos biológicos simples tal como células humanas en cultivo en el caso de Laconic y Pyronic (*109, 110*) o suspensiones de bacterias en el caso de OGSOR (*111*). Los trabajos de caracterización de los sensores describen un protocolo de obtención y procesamiento de imágenes para poder determinar la señal FRET en estos modelos sencillos; sin embargo, a la hora de aplicar este protocolo a tejidos larvales de *Drosophila* observamos comportamientos artefactuales.

Por ejemplo, en el caso de Laconic encontramos una correlación entre los niveles de expresión del sensor y la señal FRET (Fig 8), cuando lo esperable es que la señal FRET no dependa de dichos niveles. En estos experimentos alteramos cuantitativamente el nivel de expresión del sensor empleando el sistema Gal4/UAS (ver *Materiales y Métodos*), el cual responde a la temperatura a la que se someten las larvas durante su desarrollo. Así, permitiendo el desarrollo larval desde el 1er estadío a 18°C es posible disminuir los niveles de expresión respecto a los 25ºC que actúan como temperatura estándar. Por el contrario, el desarrollo de las larvas a 29°C incrementa los niveles de expresión respecto a la temperatura estándar (Fig 8). Para nuestra sorpresa, la señal FRET de Laconic parecía incrementarse al aumentar los niveles de expresión del biosensor (Fig 8).

El procesamiento de imágenes sugerido por los trabajos previos proponía restar en cada canal un valor promedio de autofluorescencia determinado en muestras que no expresan el sensor. Sin embargo, al analizar la autofluorescencia de los tejidos iluminados con la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de CFP (405 o 458 nm) observamos una señal inesperadamente heterogénea (Fig 9.A). Para intentar superar este problema, decidimos adaptar un protocolo de procesamiento de imágenes basado en el algoritmo de *linear unmixing*, que nos permitió estimar la contribución de la autofluorescencia en los canales evaluados con resolución de 5 píxeles (*120*).

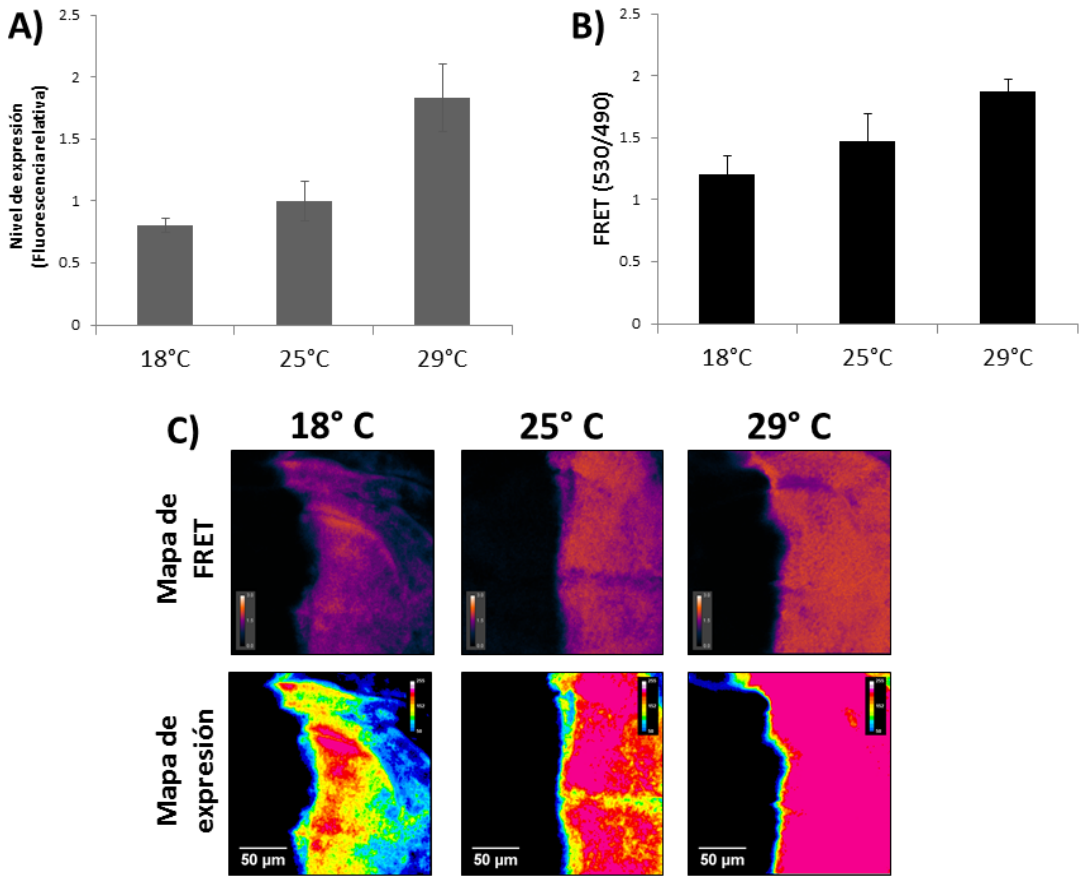


Figura 8: Dependencia de la señal FRET de Laconic de los niveles de expresión del sensor. A) Niveles de Laconic en discos imaginales de ala provenientes de larvas desarrolladas a distintas temperaturas (intensidad de emisión de YFP + CFP). B) Señal FRET de Laconic en discos imaginales de ala provenientes de larvas desarrolladas a distintas temperaturas. C) Mapas de FRET (arriba) y mapas de expresión (abajo) de Laconic expresado en el compartimento posterior (en-Gal4) de discos imaginales provenientes de larvas desarrolladas a distintas temperaturas.

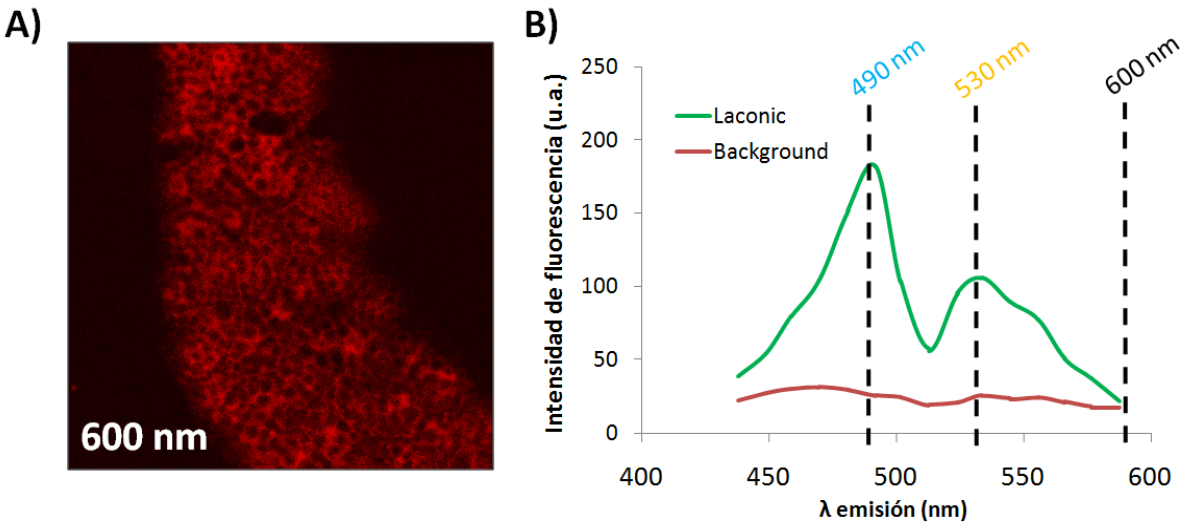


Figura 9: A) Autofluorescencia a 600 nm en el cuerpo graso de larvas salvajes (w^{1118}), que no expresan ningún sensor, al irradiar la muestra con λ_{exc} = 405 nm. B) Espectros de emisión de tejidos (discos imaginales de ala) que no expresan los sensores (curva roja) o que expresan Laconic (verde), iluminados a 405 nm. Se indican con líneas de punto los canales empleados para generar la señal FRET: canal de CFP -> 490 nm; canal de YFP -> 530 nm; canal para estimar la autofluorescencia -> 600 nm.

Para aplicar este algoritmo, no obstante, fue necesario utilizar una configuración particular de obtención de las imágenes. Se empleó un microscopio confocal LSM510 META de Zeiss, acoplado a un monocromador. El monocromador del equipo permite registrar la emisión de fluorescencia en intervalos discretos de 10 nm luego de excitar las muestras a 405 nm. Así, se obtuvieron imágenes con la luz emitida entre los 430 y 600 nm por tejidos que expresan los sensores, conformadas por 17 canales correspondientes cada uno de ellos a intervalos de 10 nm entre este rango de λ_{em}. De esta manera, se pudo reconstituir el espectro de emisión con resolución de 5 píxeles en tejidos que expresan (o no) los sensores (Fig 9.B). Quedan definidos así 3 canales de importancia para el procesamiento de las imágenes: 490 +/- 5 nm, correspondiente al canal de emisión de CFP, 530 +/- 5 nm, correspondiente a YFP, y 600 +/- 5 nm, correspondiente a una región del espectro donde la emisión de los sensores es despreciable y por lo tanto permite estimar la autofluorescencia de la muestra.

Conociendo la intensidad de autofluorescencia en estos tres canales mediante el análisis de órganos que no expresan ningún sensor, es posible determinar un factor de estimación *f* que expresa la relación entre la autofluorescencia de cada canal relevante para construir la señal FRET (490 y 530 nm), respecto al canal de 600 nm. Este factor queda definido en la ecuación 2 donde I_λ indica la intensidad de fluoresencia en el canal FRET de interés (490 o 530 nm) e I_{600} la intensidad de fluorescencia a 600 nm.

$$f_\lambda = \frac{I_\lambda}{I_{600}} \qquad (2)$$

Así, al trabajar con órganos que sí expresan los sensores FRET es posible estimar la contribución de la autofluorescencia en los canales de CFP y YFP multiplicando la intensidad de fluorescencia registrada a 600 nm por el factor *f* correspondiente a cada canal. Seguidamente se puede restar a la intensidad de fluorescencia de cada canal este valor estimado de autofluorescencia, en cada pixel de la imagen. Por último, luego de "limpiar" ambos canales mediante este procedimiento, es posible construir un

mapa de FRET realizando un cociente pixel a pixel de la señal remanente en el canal de YFP, sobre la señal remanente en el canal de CFP. De esta manera, para un pixel determinado la señal de FRET queda definida a través de la ecuación 3, donde F_{458} indica la señal FRET al excitar a 458 nm, I_{530} la intensidad de fluorescencia a 530 nm, I_{490} a 490 nm e I_{600} a 600 nm.

$$F_{458} = \frac{I_{530} - f_{530} \cdot I_{600}}{I_{490} - f_{490} \cdot I_{600}} \qquad (3)$$

Al emplear este procedimiento para generar y procesar las imágenes, la señal FRET de Laconic dejó de depender de los niveles de expresión del sensor, lo cual permite utilizarlo de manera confiable (Fig 10). Todos los mapas de FRET que se muestran a lo largo de esta tesis, por lo tanto, fueron generados empleando este protocolo. A su vez, la señal FRET de los distintos sensores fue cuantificada a partir de estos mapas, por lo que responde a la ecuación 3.

Controles necesarios para validar la señal FRET

A continuación buscamos corroborar que los dos máximos de intensidad en los espectros de emisión verdaderamente responden a la transferencia no radiativa de energía entre ambos fluorocromos. Para esto empleamos un ensayo de fotoinactivación del aceptor. Este ensayo consiste en irradiar una región de las muestras con elevada fluencia a una λ cercana a la λ_{exc} del aceptor (YFP), lo cual conduce a la foto-oxidación y consecuente inactivación del fluorocromo. Si efectivamente ocurre FRET, la fotoinactivación del aceptor debería acompañarse de un aumento en la emisión del dador (CFP), ya que la energía que no puede ser transferida mediante resonancia por falta de aceptor es ahora emitida radiativamente por parte del dador.

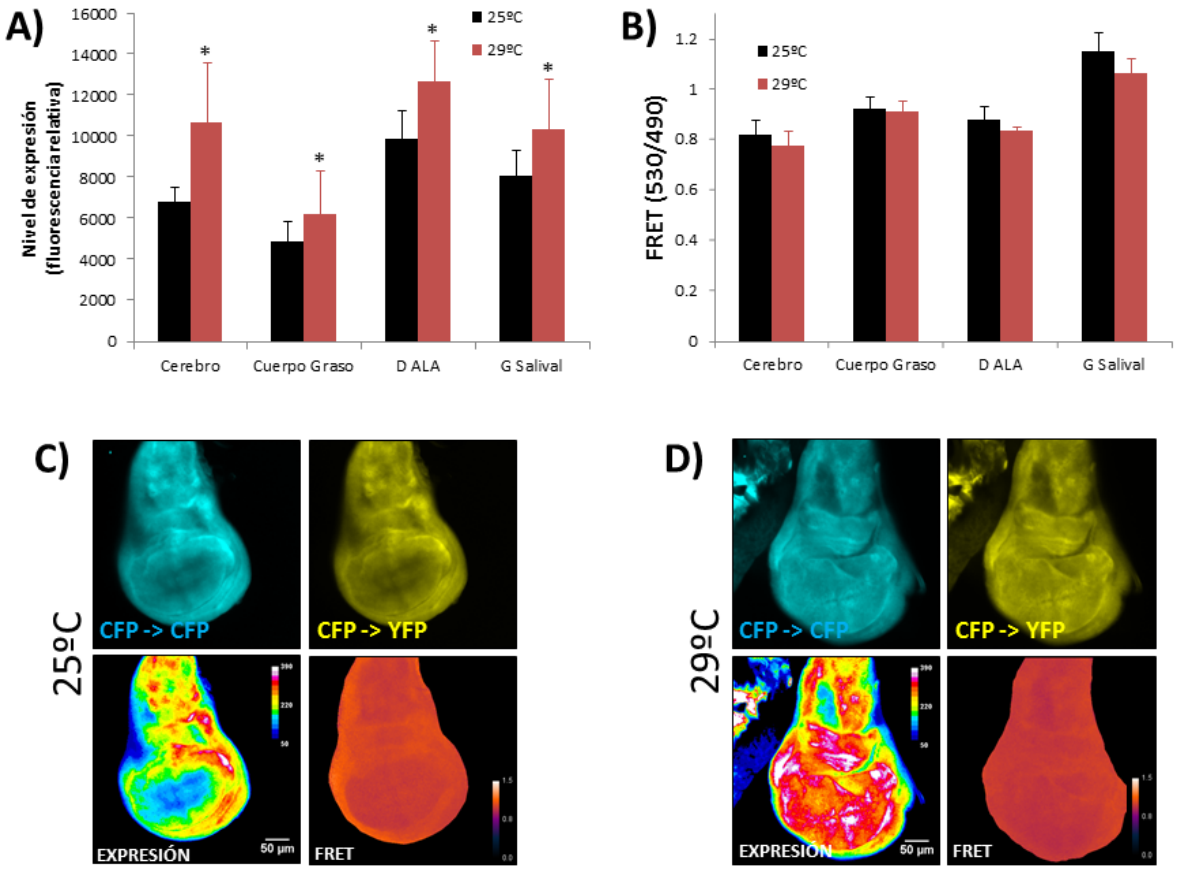


Figura 10: La señal FRET de Laconic generada mediante *linear unmixing* no depende de los niveles de expresión del sensor. A) Niveles de Laconic en distintos órganos provenientes de larvas desarrolladas a 25°C o 29°C (negro y rojo, respectivamente). B) Señal FRET de Laconic en distintos órganos provenientes de larvas desarrolladas a 25°C o 29°C (negro y rojo, respectivamente). C) Disco imaginal de ala proveniente de una larva desarrollada a 25°C. En sentido horario comenzando desde arriba a la izquierda: canal de CFP (490 nm), canal de YFP (530 nm), mapa de FRET, mapa de expresión de Laconic. D) Idem C proveniente de una larva desarrollada a 29°C. *p-valor < 0,05 respecto al mismo tejido a 25ºC (T-test de Student)

La figura 11.A muestra que, en efecto, esto es lo que ocurre en discos imaginales de ala que expresan Laconic. La fotoinactivación de YFP excitando a 488 nm en una región definida del tejido trae aparejado un aumento en la emisión de CFP, respecto a la registrada en partes del disco que no han sido fotoinactivadas, o en la misma región antes de la fotoinactivación. Un aumento similar en la emisión del dador luego de la inactivación del aceptor se observó en cerebros, cuerpo graso y glándulas salivales que expresan Laconic (Fig 11.B a 11.D).

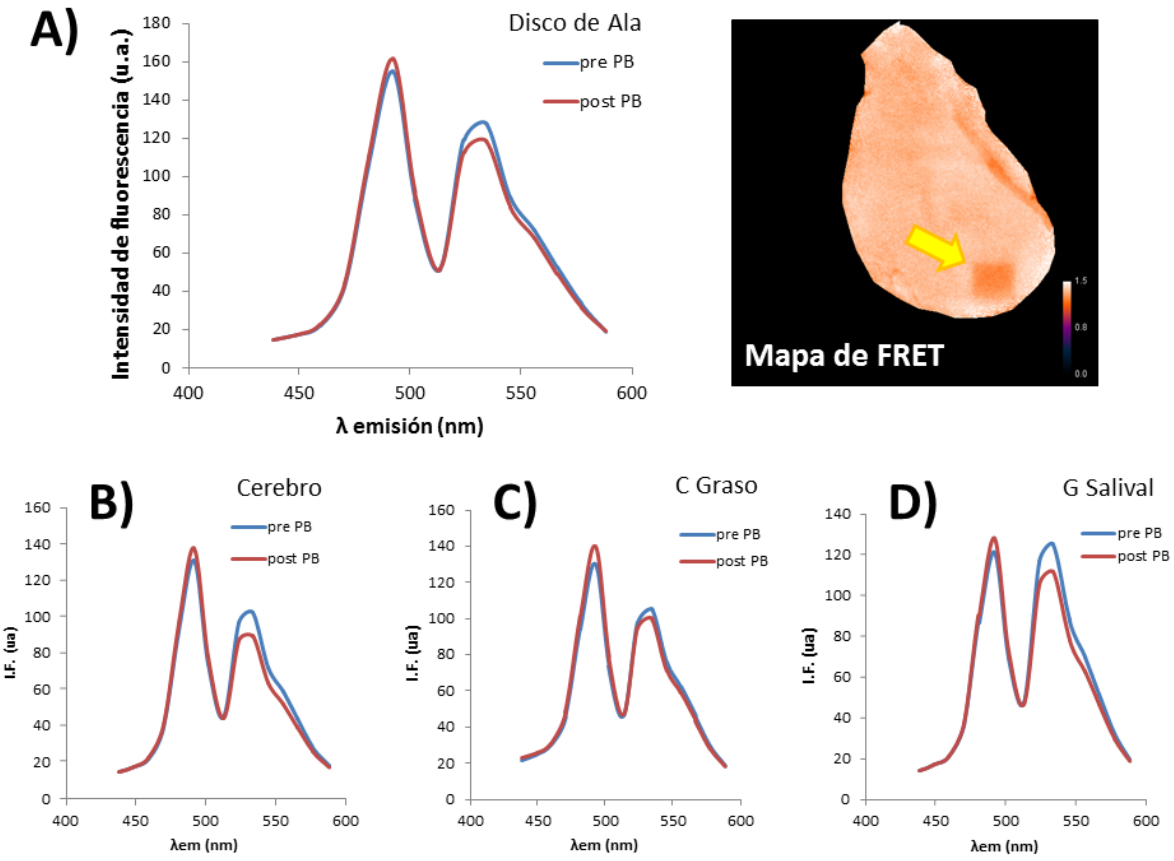


Figura 11: La fotoinactivación de YFP es acompañada por un aumento de la emisión de CFP en Laconic. A) Espectros de emisión de Laconic (λ_{exc} = 405 nm) en una región limitada de un disco imaginal de ala, antes (curva azul) y después (curva roja) de fotoinactivar YFP irradiando el área a λ_{exc} = 488 nm. El mapa de FRET del disco entero se muestra a la derecha del espectro (flecha amarilla: área fotoinactivada). Los espectros de emisión de Laconic pre- y post-fotoinactivación se muestran para cerebro (B), cuerpo graso (C) y glándula salival (D) de larvas del 3er estadío.

El mismo experimento realizado con Pyronic produjo un resultado más dudoso, ya que la irradiación a 488 nm provoca una perceptible inactivación de CFP *per se* (Fig 12.A). La falta de un láser de λ más adecuada para llevar a cabo este experimento en los microscopios confocales disponibles en nuestro instituto nos impidió buscar mejores condiciones experimentales para evaluar el fenómeno. Sin embargo, al irradiar la muestra durante una cantidad de tiempo mucho menor, en la cual la fotoinactivación de YFP resultó apenas perceptible, fue posible detectar un sutil aumento en la emisión de CFP (Fig 12.B). Esta ventana de fluencia en la cual YFP se fotoinactiva pero CFP no lo hace, o se inactiva imperceptiblemente, permitió validar la transferencia de energía entre el dador y el aceptor de Pyronic.

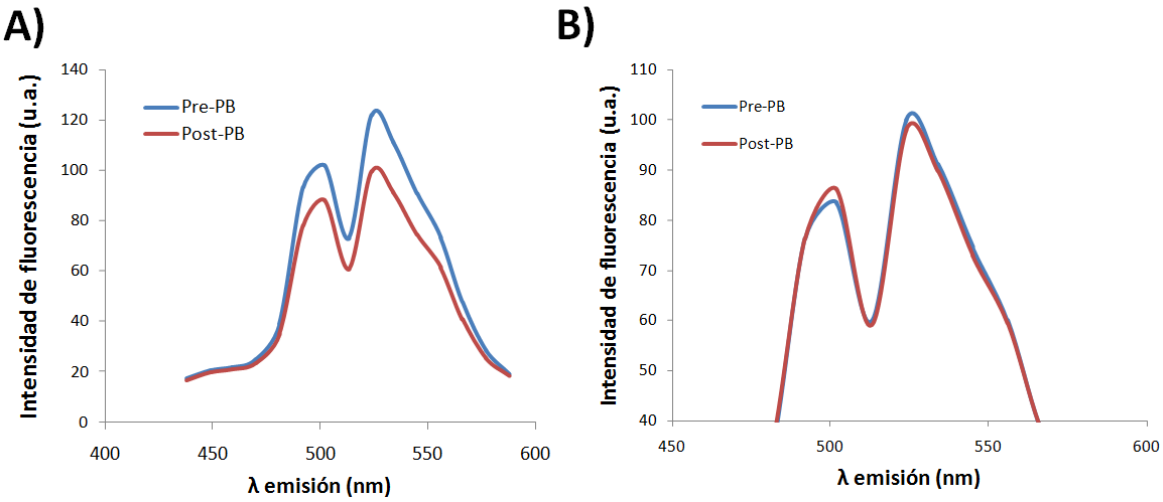
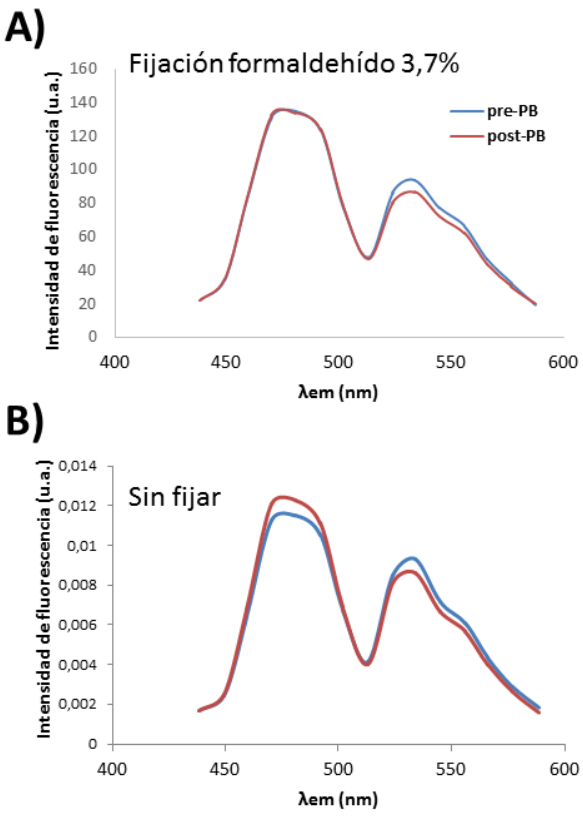


Figura 12: La fotoinactivación de YFP podría estar acompañada por un aumento de la emisión de CFP en Pyronic. A) Espectros de emisión de Pyronic (λ_{exc} = 405 nm) en una región limitada de un disco imaginal de ala, antes (curva azul) y después (curva roja) de fotoinactivar YFP irradiando el área a λ_{exc} = 488 nm. La irradiación a 488 nm conduce a la inactivación no solo de YFP, sino también de CFP. B) Idem A), pero en tejidos donde se sometió a los tejidos a una irradiación más breve. Nótese el cambio de escala en el eje y que permite visualizar el efecto sutil vinculado a esta condición.

En el caso de OGSOR, por otro lado, la fotoinactivación del aceptor no alteró sensiblemente la emisión de CFP en discos imaginales de ala (Fig 13). Evaluamos, entonces, la respuesta del biosensor en tejidos no fijados, y en este caso sí pudimos determinar un aumento en la emisión del dador comparable al observado con Laconic (Fig 13). Debido a esto, en el resto de esta tesis todos los experimentos donde se analiza la señal FRET de OGSOR están realizados en tejidos sin fijar.



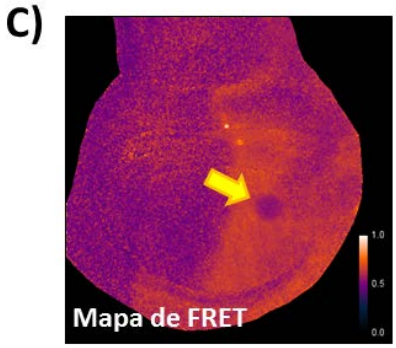


Figura 13: En el sensor OGSOR la fotoinactivación de YFP está acompañada por un aumento de la emisión de CFP. A) Espectros de emisión de OGSOR (λ_{exc} = 405 nm) en una región limitada de un disco imaginal de ala, antes (curva azul) y después (curva roja) de fotoinactivar YFP irradiando el área a λ_{exc} = 488 nm. B) Idem (A) pero en discos sin fijar, donde sí se observa el aumento de la emisión del dador luego de la fotoinactivación. C) Mapa de FRET del disco entero sin fijar (flecha amarilla: área fotoinactivada).

Un control adicional que permitió validar nuestro procedimiento para obtener la señal FRET consiste en analizar si existe excitación directa del aceptor (YFP) a la λ_{exc} que empleamos en el trabajo. De ser así, la contribución de este proceso a la intensidad de fluorescencia observada en el canal de YFP debería ser estimada, para poder sustraerla. Con este fin cuantificamos la emisión a 530 nm tras irradiar la muestra a 458 nm en discos imaginales que expresan solo YFP, y la comparamos con la observada en discos que expresan Laconic (Fig 14). La emisión de YFP a 530 nm al irradiar la muestra a 458 nm no resultó estadísticamente diferente al valor de autofluorescencia determinado a 600 nm (p-valor: 0,0602; T-test de Student), por lo que concluimos que la contribución de la excitación directa de YFP es despreciable en nuestro sistema experimental.

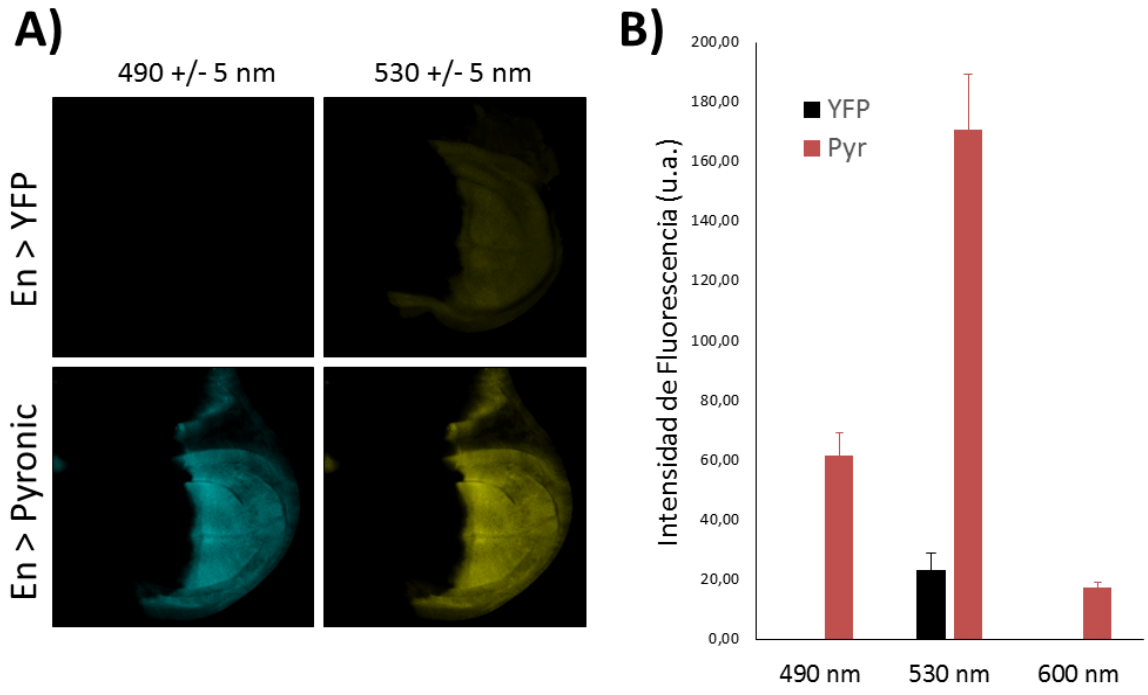


Figura 14: La irradiación a 458 nm no excita de manera directa a YFP de forma perceptible. A) Emisión a 490 y 530 nm tras excitar las muestras a 458 nm en discos imaginales de ala que expresan YFP o Pyronic en el compartimento posterior. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de YFP a 530 nm y de Pyronic en los tres canales relevantes para el procesamiento de las imágenes.

Caracterización del rango de respuesta de los sensores

Como siguiente paso, nos propusimos determinar la curva de respuesta *in vivo* que presentan los distintos sensores en tejidos de *Drosophila*. Para esto, discos imaginales

de ala que expresan Laconic o Pyronic fueron incubados durante 15 min en soluciones de concentraciones crecientes de lactato o piruvato. Debido a que ambos metabolitos atraviesan la membrana plasmática a través de MCTs (*7*) (Fig 1), la incubación de los tejidos en estas soluciones debería incrementar la concentración citosólica de ambas especies. Tal como se describió previamente (ver *Biosensores FRET para…*), en los tres sensores la unión del metabolito genera un cambio conformacional que separa al par dador/aceptor, aumentando la distancia entre ellos, por lo que la señal FRET debería disminuir al aumentar la concentración del metabolito en el citosol.

Tanto Laconic como Pyronic mostraron una disminución de la señal FRET proporcional a la concentración del metabolito relevante en cada caso (Figs 15-17), evidenciando que son capaces de reflejar cambios en las concentraciones citosólicas de estas especies. Asumiendo que en el tiempo de incubación utilizado las concentraciones extra- e intracelular de lactato llegan a equilibrarse, Laconic responde en discos imaginales de ala en un rango de concentraciones de lactato de entre 0 y 40 mM (Fig 15). El cambio del 50% en la señal FRET entre los extremos de la curva constituye una respuesta bastante notable para un sensor de estas características, donde en la mayoría de los casos la magnitud del cambio máximo de la señal ronda el 20-30%. Debido a que la solución 40 mM de lactato comienza a dañar la integridad estructural del tejido, no fue posible evaluar puntos de la curva a mayores concentraciones de este metabolito.

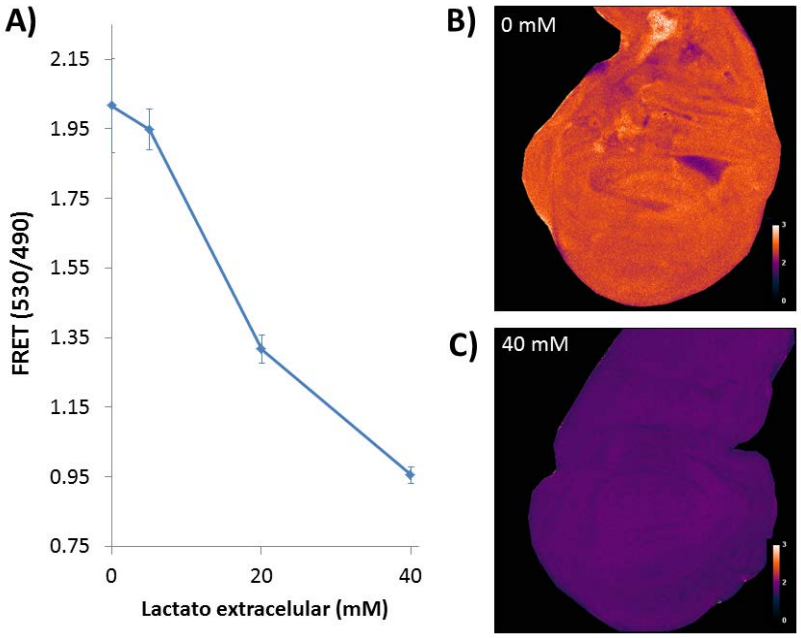


Figura 15: Dependencia de la señal FRET de Laconic con la concentración de lactato extracelular en discos imaginales de larvas del 3° estadío. A) La señal FRET disminuye al aumentar la concentración de lactato extracelular luego de 15 min de incubación, reflejando el aumento en los niveles citosólicos de este metabolito. En (B) y (C) se muestran los mapas de FRET de discos expresando Laconic incubados en soluciones de lactato 0 mM y 40 mM respectivamente.

Una respuesta cuantitativamente similar se observó al incubar en lactato 40 mM cerebros, cuerpo graso y glándulas salivales provenientes de larvas del 3er estadío (Fig 16). Resulta destacable que la señal FRET de Laconic en tejidos incubados en soluciones de lactato 40 mM converge al mismo valor independientemente del órgano del cual se trate. Aún más, en todos los órganos expuestos a lactato 40 mM se observa una menor variabilidad en la señal del sensor respecto a la observada en órganos control incubados en PBS (Fig 16.A). Este comportamiento estaría indicando que el sistema, en esta condición, está saturado, y que por lo tanto estamos observando la mayor magnitud de cambio en la señal FRET con la que Laconic es capaz de responder.

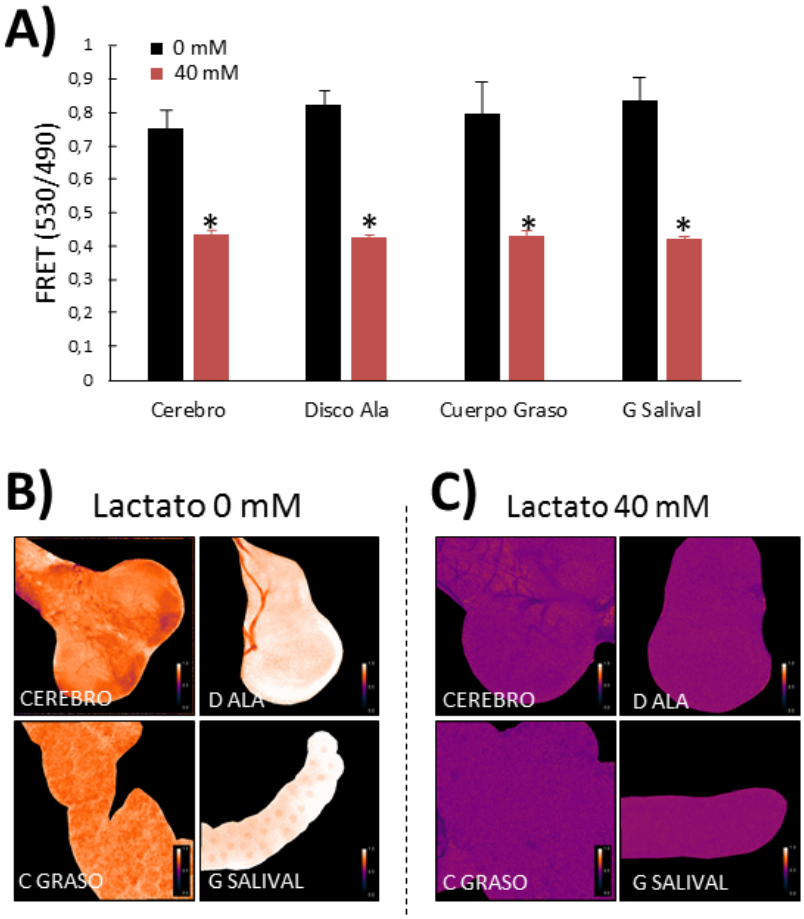


Figura 16: Dependencia de la señal FRET de Laconic con la concentración de lactato extracelular en diversos órganos de larvas del 3er estadío. A) Señal FRET de Laconic en diversos órganos luego de 15 min de incubación en soluciones de lactato 0 mM (columnas negras) o 40 mM (columnas rojas). En (B) y (C) se muestran los mapas de FRET de órganos expresando Laconic incubados en soluciones de lactato 0 mM y 40 mM respectivamente. *p-valor < 0,05 (T-test de Student, comparación con el valor del mismo órgano en la solución de lactato 0 mM)

Si bien los niveles citosólicos de lactato y piruvato no se han determinado con precisión en ningún tejido de *Drosophila*, es sensato suponer que no son radicalmente diferentes a los reportados en tejidos de mamíferos. Asumiendo, entonces, que en condiciones normales la concentración de lactato no es mayor a 10 mM (*121*), el rango fisiológico de este metabolito quedaría comprendido dentro del rango de respuesta de Laconic.

En el caso de Pyronic, por otro lado, se observó una magnitud de cambio en la señal FRET más limitada que la de Laconic (Fig 17.A). Al igual que con el lactato, concentraciones más altas de piruvato extracelular dañaron estructuralmente el tejido luego de 15 min de incubación. Sin embargo, dado que el rango fisiológico del piruvato debería estar incluido en el rango de concentraciones analizadas en el experimento, la magnitud de la respuesta de Pyronic en experimentos de relevancia biológica seguramente sea similar o menor a la respuesta máxima determinada en esta prueba de concepto. Una respuesta comparable en la señal de Pyronic a la determinada en discos imaginales de ala se observó en diferentes órganos al incubarlos en soluciones de hasta 50 mM (Fig 17.B-17.D).

Como próximo paso, buscamos caracterizar la respuesta del tercer biosensor FRET, OGSOR, expresado en diversos tejidos de *Drosophila.* En este caso no fue posible emplear el mismo enfoque experimental que en los experimentos anteriores, ya que el 2-OG no difunde a través de transportadores de membrana plasmática, como sí lo hacen el lactato y el piruvato. Debido a esto, debimos emplear dimetil-2-oxoglutarato (DM-2-OG, Fig 18.A), un análogo del 2-OG que difunde a través de la membrana plasmática y es demetilado en el citosol provocando un aumento de los niveles intracelulares de 2-OG (*122*). De acuerdo a lo esperado, tras incubar discos imaginales de ala en soluciones con concentraciones crecientes de DM-2-OG se registró una disminución de la señal FRET dependiente de la concentración extracelular de esta especie (Fig 18.B y 18.C). La magnitud de la respuesta resultó ligeramente mayor a la descripta para este tipo de sensores, alcanzando un cambio máximo de 30%. El análisis del rango dinámico, sin embargo, resulta más complicado con este enfoque experimental. Dado que el aumento en los niveles citosólicos de 2-OG se debe al producto de un procesamiento metabólico del DM-2-OG y no al resultado de la

difusión del metabolito a través de la membrana plasmática, se torna complejo entonces conocer la concentración efectiva de 2-OG citosólico a la cual se observa una saturación de la respuesta del biosensor.

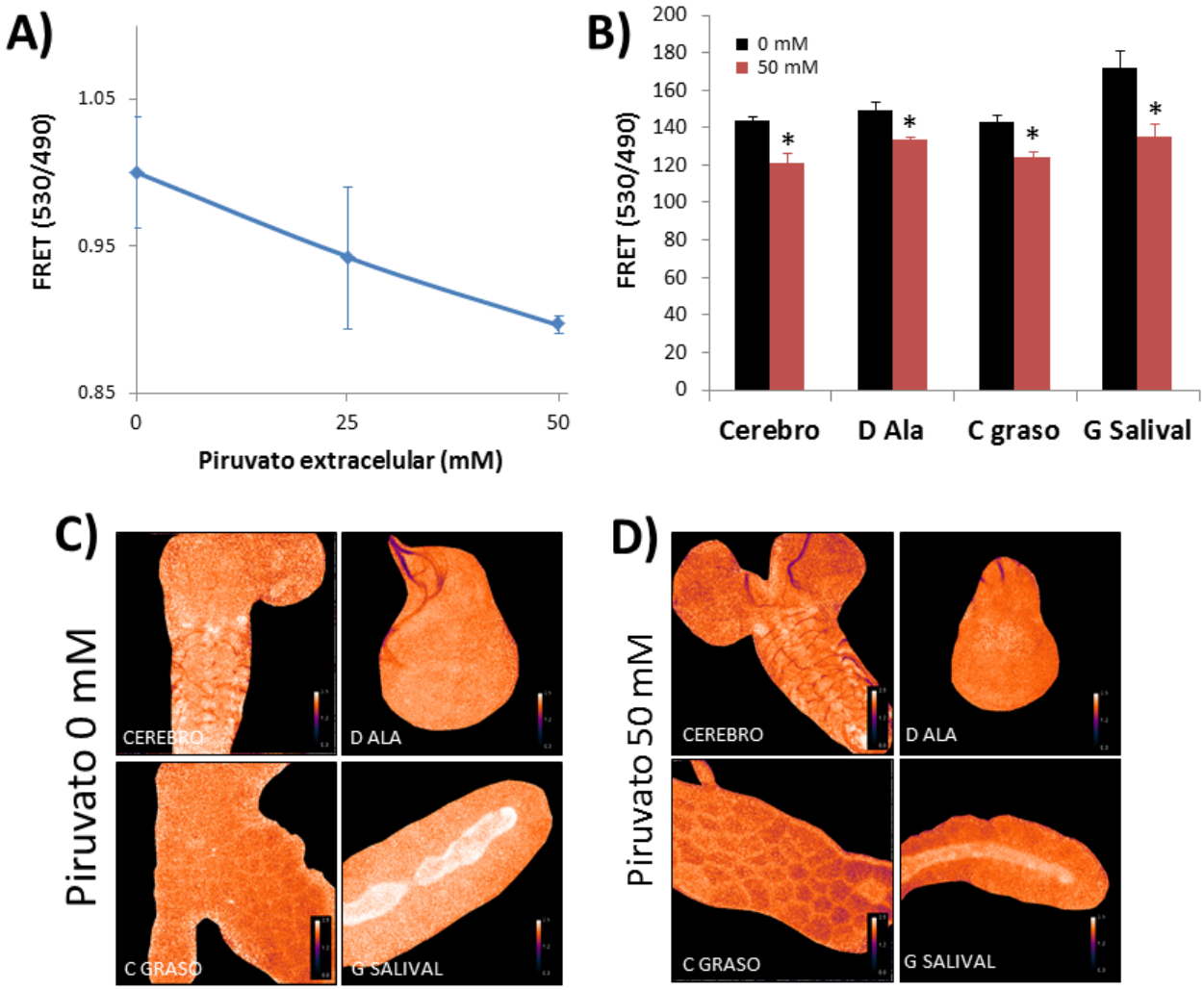


Figura 17: Dependencia de la señal FRET de Pyronic con la concentración de piruvato extracelular en diversos órganos de larvas del 3er estadío. A) Respuesta dosis-dependiente de la señal FRET de Pyronic expresado en discos imaginales de ala incubados durante 15 min en soluciones de distintas concentraciones de piruvato. B) Señal FRET de Pyronic en diversos órganos luego de 15 min de incubación en soluciones de piruvato 0 mM (columnas negras) o 50 mM (columnas rojas). En (B) y (C) se muestran los mapas de FRET de órganos expresando Pyronic incubados en soluciones de piruvato 0 mM y 50 mM respectivamente. *p-valor < 0,05 (T-test de Student, comparación con el valor del mismo órgano en la solución de piruvato 0 mM)

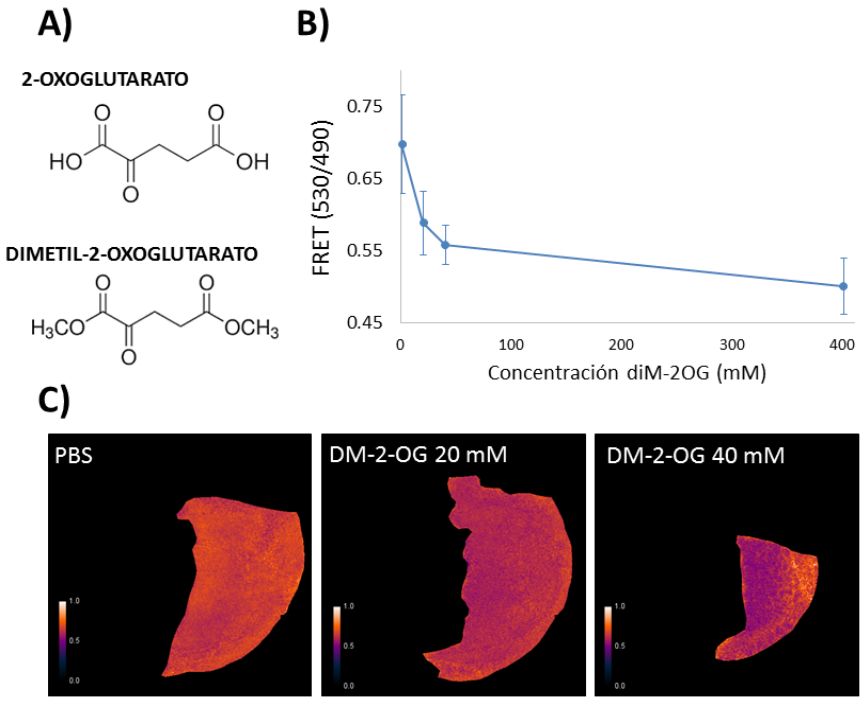


Figura 18: Dependencia de la señal FRET de OGSOR expresado en el compartimento posterior de discos imaginales de ala (en-Gal4) con la concentración de DM-2-OG extracelular. A) Comparación de las estructuras del 2-OG y del DM-2-OG. B) La señal FRET de OGSOR disminuye al aumentar la concentración de DM-2-OG extracelular luego de 15 min de incubación, reflejando el aumento en los niveles citosólicos de 2-OG. C) Mapas de FRET de discos imaginales expresando OGSOR en el compartimento posterior incubados en soluciones de distintas concentraciones de DM-2-OG.

Análisis de la respuesta metabólica en ambientes hipóxicos

Hasta aquí, validamos la señal FRET de los tres biosensores y caracterizamos la magnitud de la respuesta de cada uno de ellos al aumentar experimentalmente los niveles citosólicos de los metabolitos correspondientes. Por lo tanto, al alcanzar este punto consideramos que cumplimos las condiciones necesarias para comenzar a emplear las herramientas en experimentos que evalúen si los sensores son capaces de reportar reprogramaciones metabólicas fisiológicas previamente descriptas. Las larvas de *Drosophila* se enfrentan en la naturaleza a entornos con baja disponibilidad de O_2 (hipoxia) dentro de frutos en descomposición de los cuales se alimentan. Existen diversas adaptaciones que, actuando a distintos niveles, permiten a la larva lidiar con el ambiente hipóxico de su alimento. Estas adaptaciones incluyen el desarrollo de comportamientos cooperativos entre larvas, necesarios para estabilizar cavidades de aire en el interior del alimento (*123*), la ramificación del sistema traqueal optimizando así la llegada de O_2 a los distintos tejidos (*124*), así como reprogramaciones del metabolismo energético celular que posibilitan sintetizar ATP sin depender del O_2 como aceptor final de electrones (*125*). En particular, las larvas de *Drosophila* en hipoxia realizan fermentación láctica, reduciendo el piruvato a lactato para reconstituir el poder oxidante de la célula (ver *Respuesta metabólica a hipoxia*). De esta manera,

las células pueden depender casi exclusivamente de la síntesis de ATP acoplada a la glucólisis.

En primer lugar, entonces, analizamos el incremento de la concentración de lactato en homogenatos de larvas de 3er estadío provenientes de un ambiente moderadamente hipóxico (5% O_2 durante 16 hs) empleando un ensayo colorimétrico de determinación de lactato en solución. Con este análisis detectamos una concentración de lactato veinte veces mayor en homogenatos de larvas expuestas a hipoxia respecto a los niveles medidos en homogenatos de larvas en normoxia (Fig 19.A), tal como había sido previamente reportado (*125*).

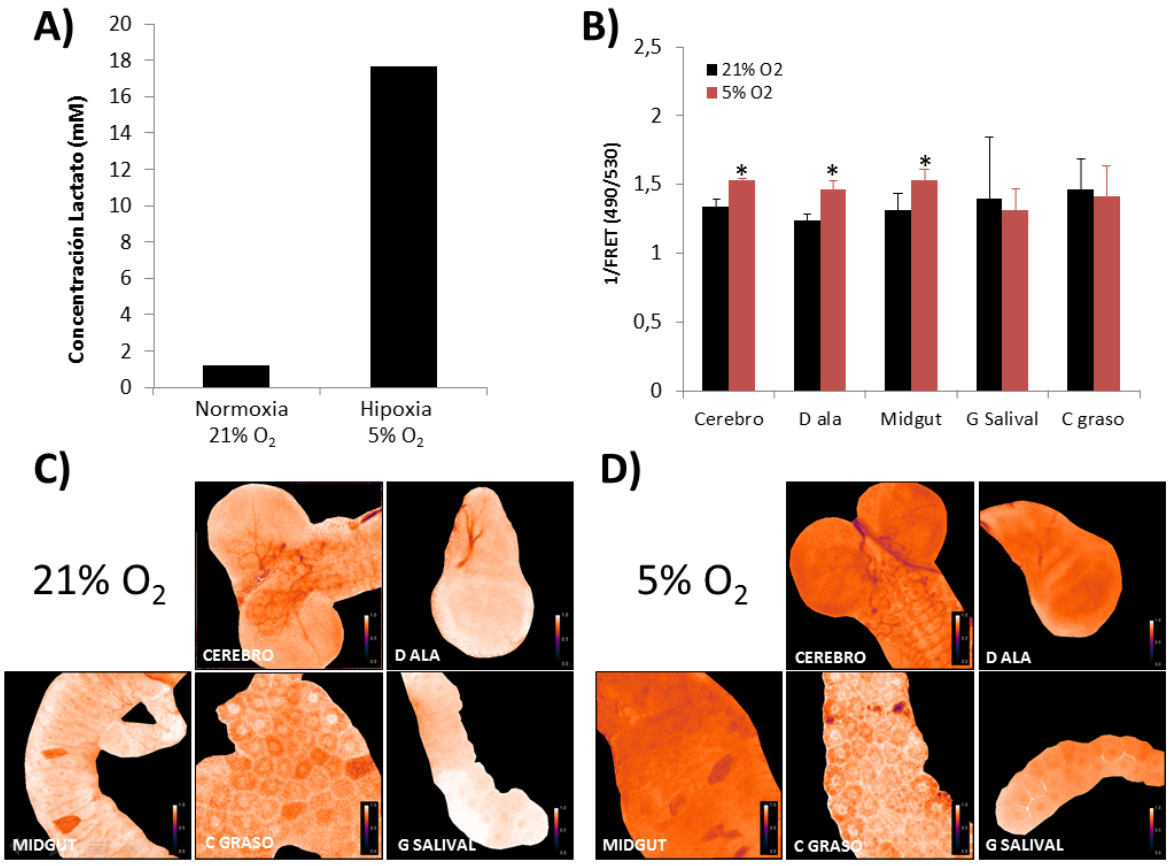


Figura 19: La señal de Laconic refleja la reprogramación metabólica inducida por hipoxia en distintos órganos larvales. A) Aumento en los niveles de lactato de homogenatos de larvas del 3er estadìo sometidas a una hipoxia moderada (5% O_2 por 16 hs), determinado mediante un ensayo colorimétrico. B) Señal de Laconic en diversos órganos provenientes de larvas en normoxia (columnas negras) o hipoxia (columnas rojas). Mapas de FRET representativos de órganos expresando Laconic obtenidos de larvas en normoxia o hipoxia se muestran en (C) y (D) respectivamente. *p-valor < 0,05 (T-test de Student, comparación con el valor del mismo órgano en normoxia)

Expresando Laconic de forma ubicua (bajo el control del promotor de tubulina), analizamos esta reprogramación metabólica en distintos órganos. En la figura 19.B se ha graficado, en lugar de la señal FRET de Laconic, su inversa: 1/FRET. Dado que aumentos en los niveles de lactato reducen la señal FRET de Laconic (Fig 15), esta representación permite visualizar de forma más directa los cambios en la concentración citosólica de este metabolito. Teniendo en cuenta que Pyronic y OGSOR funcionan de forma similar, en el resto de la tesis hemos optado por graficar 1/FRET al analizar la señal de los distintos sensores.

En cerebro, disco de ala y en la porción media del intestino larval (*midgut*) de larvas en hipoxia, detectamos un incremento en los niveles de lactato respecto a lo observado en los mismos órganos provenientes de larvas en normoxia. Sin embargo, en órganos íntegramente politénicos como es el caso del cuerpo graso y la glándula salival, no se observaron diferencias obvias en la señal de Laconic comparando normoxia con hipoxia (Fig 19.B-19.D). Esta respuesta metabólica diferencial a hipoxia en los distintos órganos no había sido reportada previamente, y constituye un buen ejemplo del tipo de posibles aplicaciones que ofrecen las herramientas desarrolladas en la presente tesis.

Analizamos a continuación la señal de los otros biosensores FRET expresados en discos imaginales de ala de larvas sometidas a hipoxia. La misma condición de hipoxia moderada no alteró perceptiblemente la señal de Pyronic (Fig 20.A y 20.B). Sin embargo, un grado mayor de restricción de O_2 (3% O_2 durante 16 hs) sí evidenció una disminución significativa en los niveles citosólicos de piruvato. Esta reducción del piruvato citosólico concuerda con reportes bibliográficos de reprogramaciones metabólicas, donde la adquisición de un perfil glucolítico se asocia a un incremento en los niveles estacionarios de lactato a costa de los de piruvato (*2*). Es relevante destacar que este tipo de mediciones nunca se habían realizado *in vivo* con resolución espacial.

La señal FRET de OGSOR en discos de larvas sometidas a hipoxia severa (3% O_2 por 16 hs) no resultó ser distinta a la de discos de larvas en normoxia (Fig 20.C y 20.D), lo cual indicaría que las concentraciones citosólicas de 2-OG no se ven alteradas como consecuencia de la reprogramación metabólica vinculada a la respuesta a hipoxia. La

falta del aceptor final de la cadena de transporte de electrones con total seguridad altera el estado metabólico mitocondrial (*2*), lo cual podría impactar en la concentración estacionaria de 2-OG, intermediario del ciclo de Krebs. Resulta curioso, por lo tanto, no haber observado cambios en la concentración citosólica de 2-OG en este contexto.

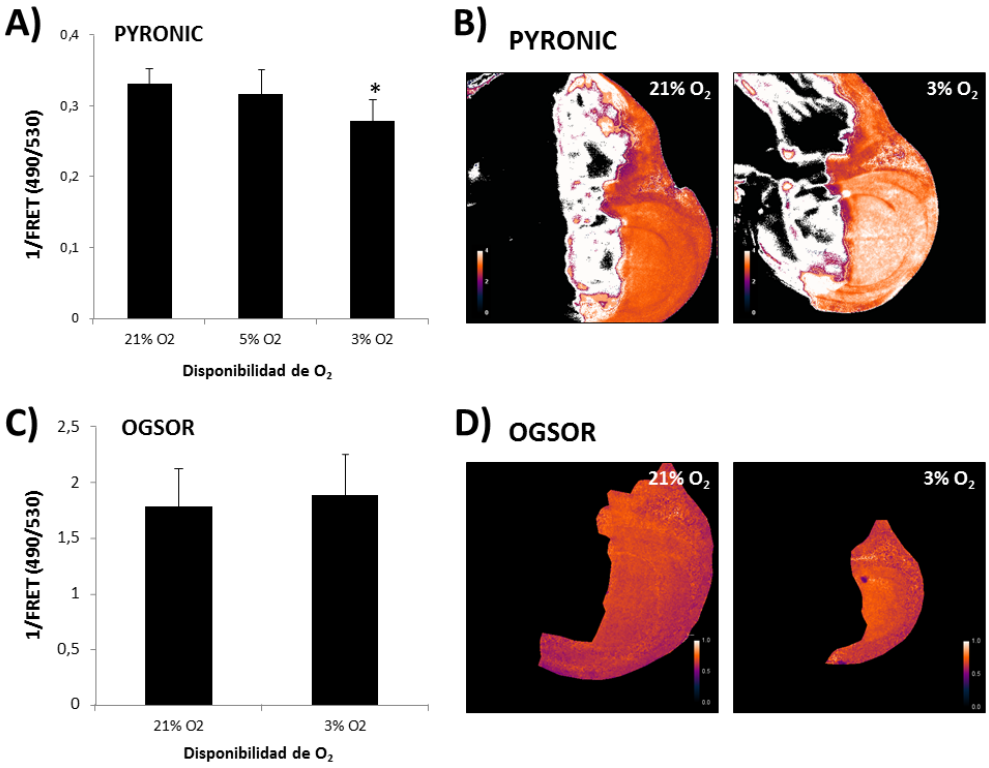


Figura 20: Niveles de piruvato y 2-OG en discos imaginales de ala provenientes de larvas del 3er estadío en normoxia e hipoxia. A) Señal de Pyronic en discos de ala provenientes de larvas en normoxia (21% O_2) o distintas condiciones de hipoxia (5% y 3% O_2 durante 16 hs). En (B) se muestran mapas de FRET representativos de las condiciones más extremas. C) Señal de OGSOR en discos de ala provenientes de larvas en normoxia (21% O_2) o hipoxia (3% O_2 durante 16 hs). En (D) se muestran mapas de FRET representativos de ambas condiciones. *p-valor < 0,05 (T-test de Student, comparación con el valor en normoxia)

El transporte de 2-OG entre el compartimento mitocondrial y el citosol no ocurre pasivamente, por simple difusión, sino que ocurre de manera regulada a través de la lanzadera de malato-aspartato (*2*). Este sistema consta de dos componentes: el transportador *antiporter* de malato/2-OG y el transportador *antiporter* de glutamato/aspartato. El primero permite el pasaje del 2-OG mitocondrial al citosol, acoplado a la entrada de malato desde el citosol a la mitocondria. Una vez en el citosol, el 2-OG no puede reingresar a la mitocondria. Allí, no obstante, puede recibir un grupo amino generando glutamato como consecuencia de la actividad de la aspartato aminotransferasa. El glutamato así formado sí puede transportarse a la mitocondria a través del *antiporter* de glutamato/aspartato de manera coordinada con la salida de aspartato desde la matriz mitocondrial al citosol. Luego, en el interior de la

mitocondria un *pool* distinto de la aspartato aminotransferasa vuelve a deaminarlo convirtiéndolo nuevamente en 2-OG (Fig 21). La complejidad de este sistema torna evidente que, lejos de estar en equilibrio, el 2-OG mitocondrial y el 2-OG citosólico constituyen dos reservorios aislados espacialmente de este metabolito, aunque debido a limitaciones técnicas el estudio de los roles fisiológicos de esta separación no ha sido encarado en profundidad. El hecho de que en un tejido hipóxico los niveles citosólicos de 2-OG no se alteren perceptiblemente permitiría especular con un comportamiento diferencial frente a la restricción en la disponibilidad de O_2 entre el *pool* mitocondrial de este metabolito y el citosólico.

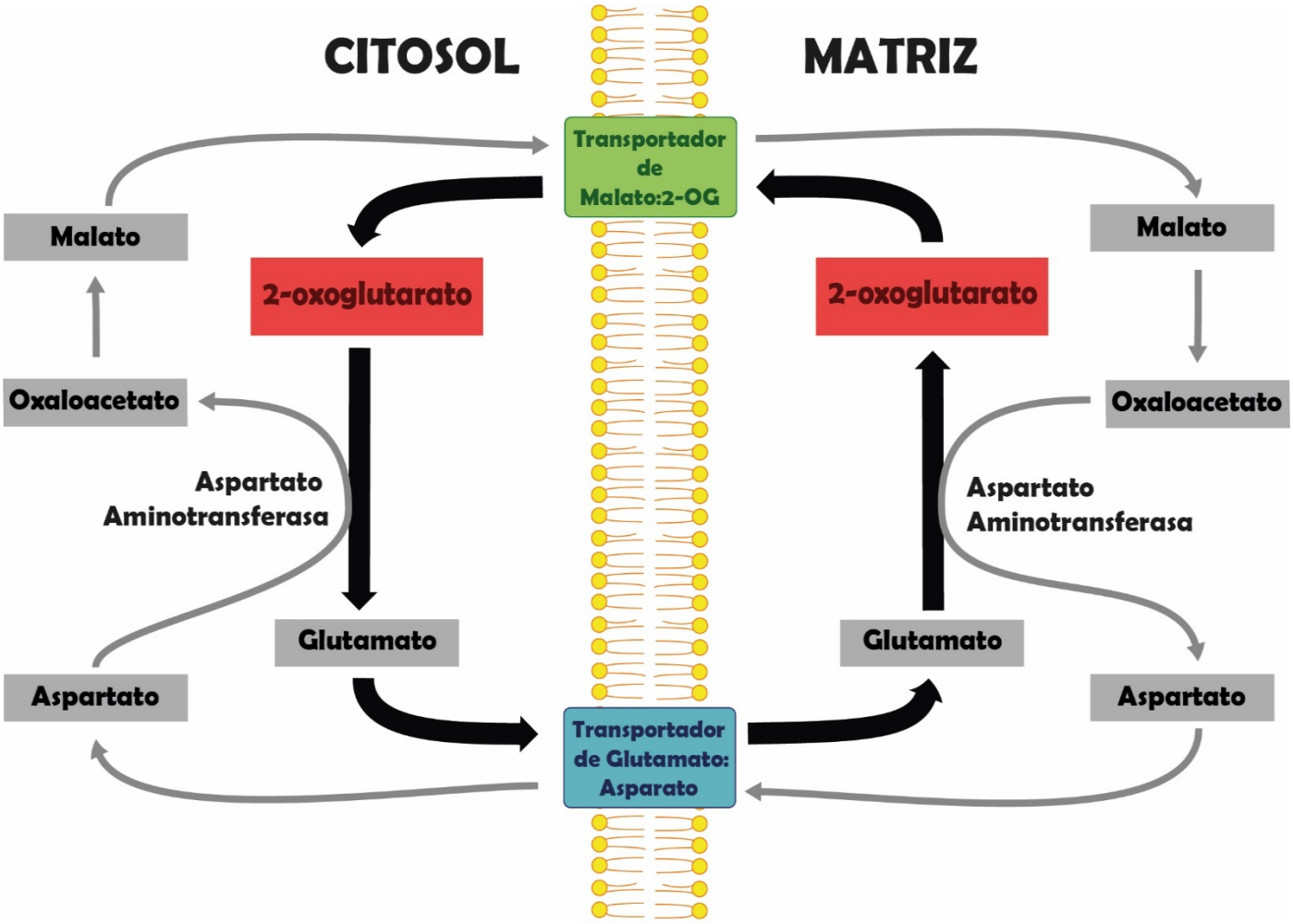


Figura 21: Lanzadera de Malato/Aspartato. El flujo de 2-OG entre la matriz mitocondrial y el citosol no ocurre de manera directa, sino a través de dos transportadores *antiporter* presentes en la membrana de la mitocondria. Estos transportadores permiten la salida del 2-OG mitocondrial al citosol, y la entrada del glutamato, producto de la aminación del 2-OG, desde el citosol a la matriz de la mitocondria.

Análisis de la respuesta metabólica a la restricción nutricional

A continuación decidimos evaluar si los biosensores FRET podrían poner en evidencia eventos de reprogramación metabólica en larvas sometidas a restricción nutricional. Para esto comparamos la señal de Laconic y Pyronic expresados en diversos órganos de larvas de 3er estadío alimentadas con el medio de cultivo estándar de *Drosophila* (ver *Materiales y Métodos*), con la señal determinada en larvas sometidas a ayuno durante 6 hs. Tal como se observa en la figura 22 (22.A y 22.B), no se observaron diferencias en la señal FRET de ninguno de los dos sensores, en ninguno de los tejidos evaluados. Tampoco se observaron cambios en la señal FRET de OGSOR tras la restricción nutricional *in vivo* (Fig 22.C).

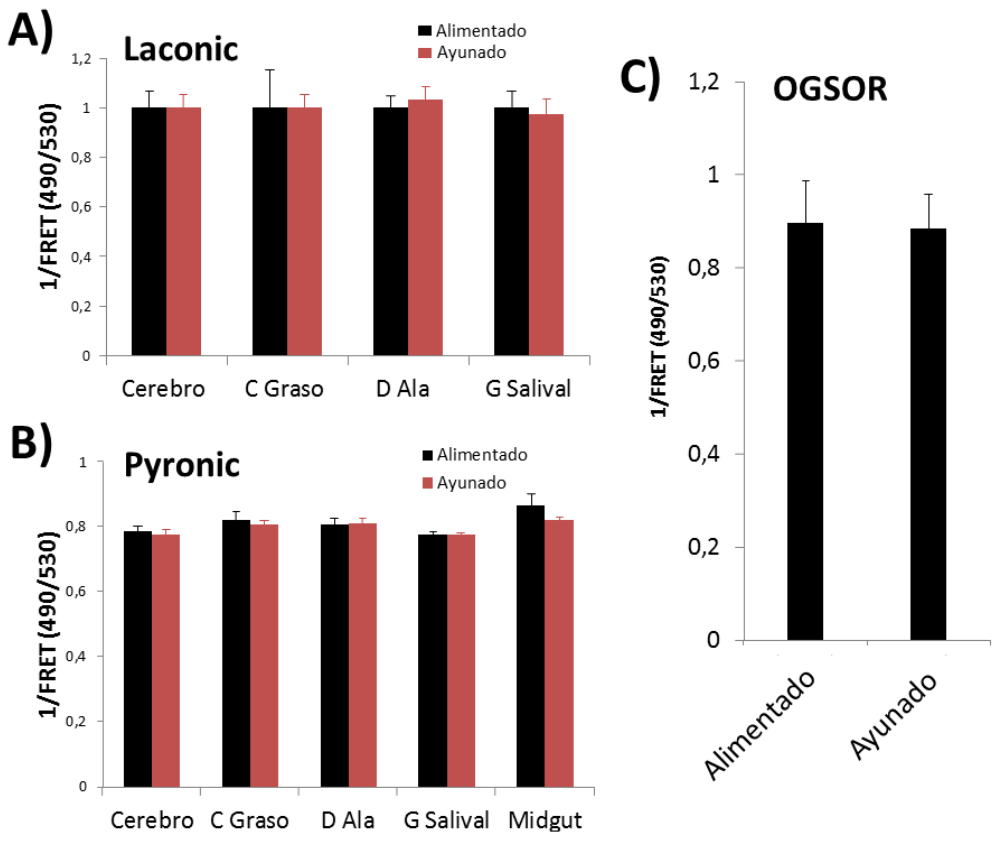


Figura 22: Niveles de lactato, piruvato y 2-OG en órganos de larvas de 3er estadío desarrolladas en condiciones estándar o sometidas a un ayuno severo de 6 hs. A) Señal de Laconic en diversos órganos provenientes de larvas alimentadas con el medio de cultivo estándar (columnas negras) o sometidas a ayuno durante 6 hs (columnas rojas). B) Señal de Pyronic en órganos provenientes de larvas expuestas a las mismas condiciones que en (A). C) Señal de OGSOR al expresarlo en el compartimento posterior de discos imaginales provenientes de larvas expuestas a las mismas condiciones que en (A).

En base a los resultados anteriores, decidimos utilizar otro diseño experimental, más alejado de las condiciones fisiológicas, pero que permite un mayor grado de control

sobre la disponibilidad de nutrientes en el tejido a evaluar. Este consiste en incubar *ex-vivo* discos imaginales de ala que expresan alguno de los tres sensores, en medio Schneider o PBS durante 15 min. Dado que el medio Schneider, empleado habitualmente para el cultivo de células de *Drosophila*, intenta reproducir la composición de la hemolinfa de esta especie (*126*), esta condición resultaría equivalente al desarrollo de larvas en las condiciones estándar del experimento anterior. Por otro lado, la incubación en PBS emularía condiciones de ayuno donde la disponibilidad de todas las fuentes de carbono se encuentra radicalmente limitada. La figura 23 muestra cómo la señal FRET de los tres sensores en discos incubados en PBS resultó significativamente mayor que la determinada en discos incubados en medio Schneider, indicando que la restricción nutricional genera una disminución en los niveles citosólicos de los tres metabolitos de interés. La disminución simultánea en las concentraciones de los tres metabolitos en el estado estacionario podría indicar una reducción en el flujo metabólico global, causada por la ausencia de cadenas de carbono catabolizables que puedan incorporarse desde el entorno extracelular.

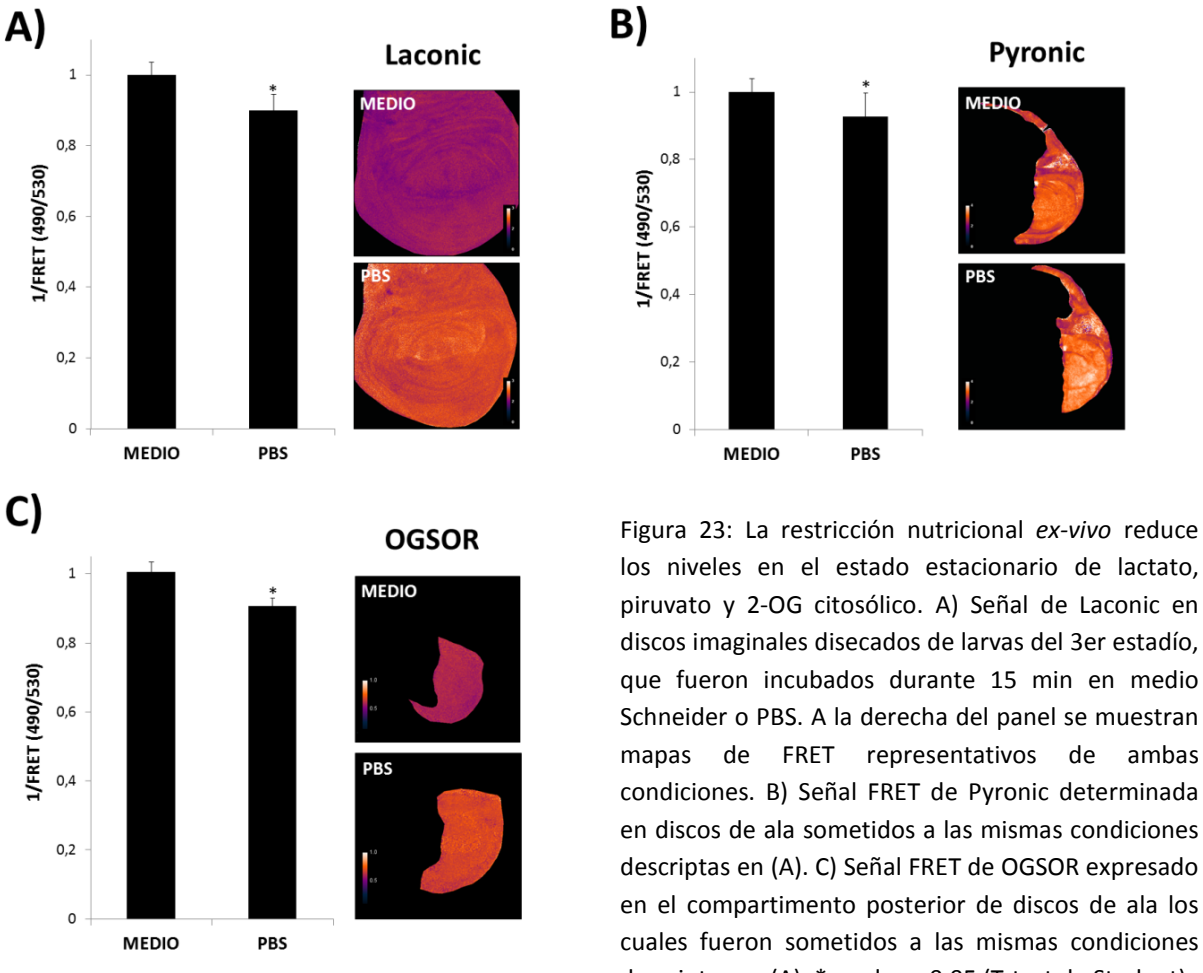


Figura 23: La restricción nutricional *ex-vivo* reduce los niveles en el estado estacionario de lactato, piruvato y 2-OG citosólico. A) Señal de Laconic en discos imaginales disecados de larvas del 3er estadío, que fueron incubados durante 15 min en medio Schneider o PBS. A la derecha del panel se muestran mapas de FRET representativos de ambas condiciones. B) Señal FRET de Pyronic determinada en discos de ala sometidos a las mismas condiciones descriptas en (A). C) Señal FRET de OGSOR expresado en el compartimento posterior de discos de ala los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones descriptas en (A). *p-valor < 0,05 (T-test de Student)

La dioxigenasa *Fatiga* como sensor del estado nutricional de la célula

En el experimento anterior hallamos una condición donde logramos imponer experimentalmente cambios en los niveles citosólicos de 2-OG. Este hallazgo abrió la oportunidad de testear una hipótesis sobre la biología del 2-OG que, a pesar de ser frecuentemente comentada en la bibliografía, hasta el momento no podía ser abordada experimentalmente en el contexto de un organismo pluricelular entero. Según esta hipótesis, las dioxigenasas dependientes de 2-OG actúan como sensores del estado nutricional de la célula, modulando su actividad en función de la disponibilidad de este metabolito (*127*). Las dioxigenasas dependientes de 2-OG son enzimas que en animales catalizan la hidroxilación de proteínas en residuos específicos. Distintas enzimas pertenecientes a esta familia cumplen diferentes roles fisiológicos, que incluyen la síntesis de colágeno, síntesis de carnitina y regulación epigenética entre otras (*76*). El mecanismo de reacción depende de O_2 y 2-OG como sustratos, y de Fe^{+2} y ascorbato como co-factores ((*3, 128*) y Fig 24). Sin embargo, el hecho de que cierta especie química sea sustrato de la reacción que la enzima cataliza no convierte a la enzima en un sensor celular de esa molécula: si la afinidad por el sustrato es tal que el mismo se encuentra en concentraciones saturantes incluso con los valores mínimos de su rango fisiológico (Km por debajo del rango fisiológico), la actividad de la enzima no se verá alterada por cambios en los niveles intracelulares del sustrato en cuestión.

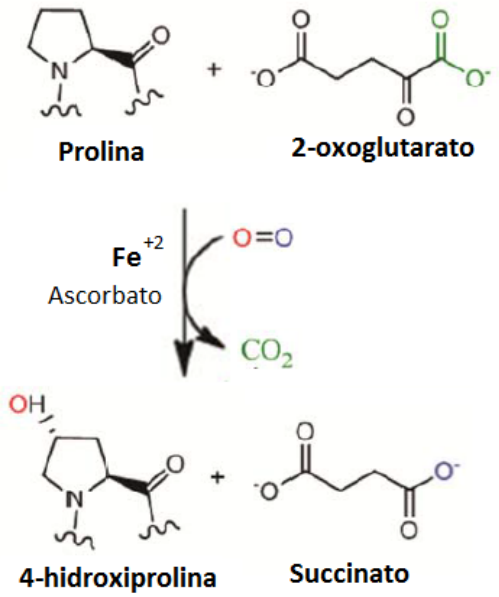


Figura 24: Esquema de la reacción catalizada por las dioxigenasas dependientes de 2-OG. Estas enzimas posibilitan la oxidación de residuos específicos en ciertas proteínas (prolina en el esquema) en un mecanismo que utiliza O_2 y 2-OG como co-sustratos. El Fe^{+2} y el ascorbato son empleados como co-factores. La familia recibe el nombre de dioxigenasas ya que catalizan la adición de los dos átomos de O presentes en la molécula O_2 a cadenas de carbono.

Cierta sub-familia de dioxigenasas, aquéllas que contienen un Dominio Prolil-4-Hidroxilasa (PHDs), son capaces de actuar como sensores celulares de O_2, disparando la respuesta transcripcional a hipoxia cuando la disponibilidad de este elemento en el interior celular disminuye por debajo de determinado umbral (*3, 128*). De manera análoga, entonces, se ha propuesto (*127*) que ciertas dioxigenasas serían capaces de actuar como sensores del otro sustrato de reacción, el 2-OG. La constante de afinidad de varias de estas enzimas por el 2-OG ha sido caracterizada *in vitro*, y en muchos casos (incluyendo a las PHDs de mamíferos) este parámetro indicaría que su actividad podría estar regulada por los niveles intracelulares de 2-OG (*129*). Sin embargo, la elevada concentración de solutos en el citosol altera sensiblemente la termodinámica del interior de la célula, dificultando la extrapolación de los resultados obtenidos *in vitro* al entorno intracelular. Existe, no obstante, un trabajo en el cual se reporta que al aumentar artificialmente los niveles de 2-OG en cultivos celulares donde se ha activado genéticamente la respuesta transcripcional a hipoxia, la actividad de las PHDs se exacerba rescatando el fenotipo de pseudo-hipoxia (*130*).

En *Drosophila* existe un solo gen homólogo a las PHDs, denominado *Fatiga* (*Fga*), cuya actividad como sensor de O_2 regulando la respuesta transcripcional a hipoxia se ha demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio (*131, 132*). Por lo tanto, decidimos evaluar si en el contexto de restricción nutricional absoluta en el cual observamos una reducción en los niveles de 2-OG citosólico (Fig 23.C), la actividad de Fga también se encuentra alterada. Para ello, utilizamos un reportero de la actividad de Fga codificado genéticamente, desarrollado por el grupo de Stefan Luschnig (*133*). El mismo consiste en la fusión de GFP a un dominio de respuesta a oxígeno (ODD), el cual es reconocido e hidroxilado por Fga. La hidroxilación en este contexto permite que la proteína quimérica (GFP:ODD) sea reconocida por dVHL, componente principal de un complejo E3-ubiquitin ligasa, y conducida a degradación en el proteasoma. De esta manera, al normalizar la intensidad de fluorescencia verde a la fluorescencia roja emitida por RFP expresada bajo el control del mismo promotor constitutivo que controla la expresión de GFP:ODD, se pueden obtener lecturas de la fluorescencia de GFP que indiquen de manera inversamente proporcional la actividad de Fga (Fig 25.A).

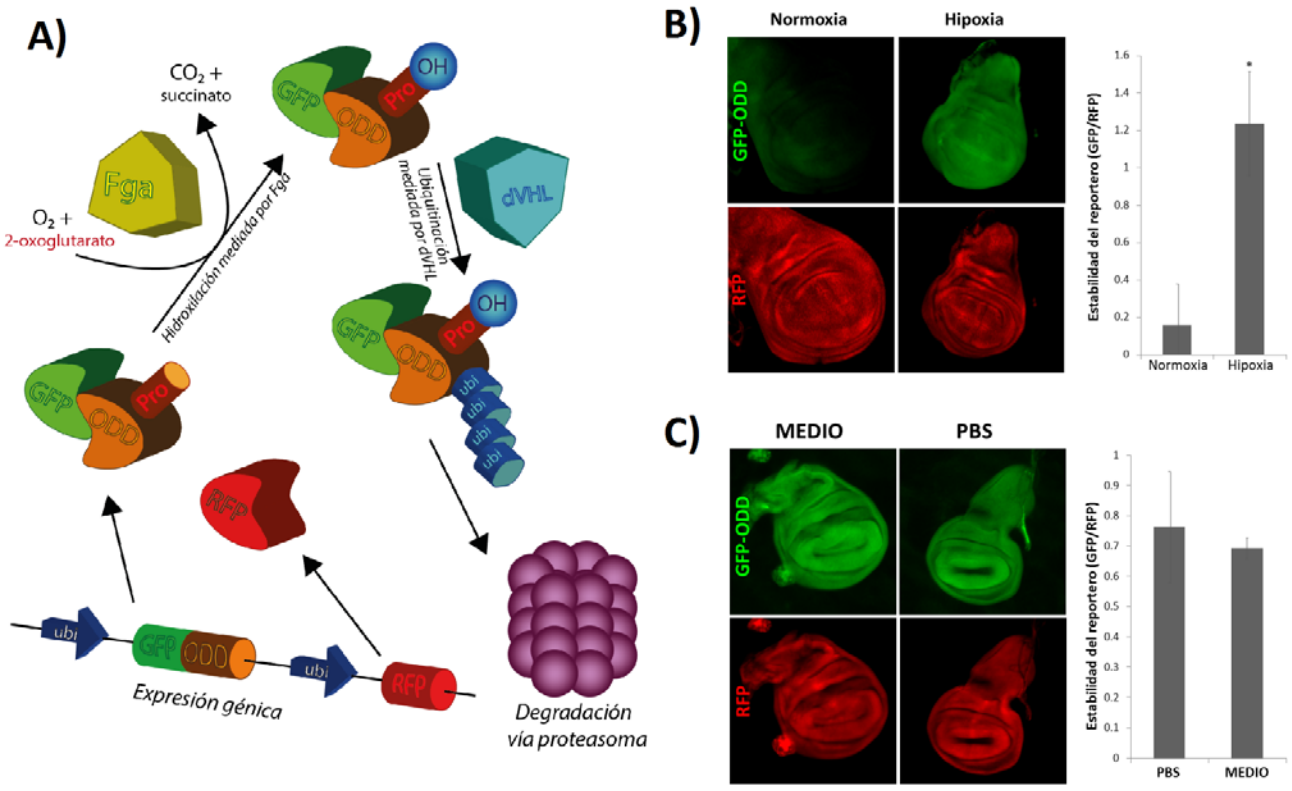


Figura 25: Cambios en los niveles de 2-OG no modulan la actividad de Fga. A) Reportero de la actividad de *Fga*. La proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a un dominio de respuesta a oxígeno (ODD) se encuentra bajo el control de un promotor ubicuo. La dioxigenasa Fga reconoce al ODD, hidroxilándolo, lo cual lo torna susceptible de ser reconocido por dVHL y ubiquitinado. Seguidamente, la ubiquitinación de la proteína quimérica (GFP:ODD) la conduce a degradación vía proteasoma. De esta manera, la intensidad de fluorescencia verde en una célula particular es inversamente proporcional a la actividad de Fga en dicha célula. La expresión de RFP bajo el control del mismo promotor ubicuo que dirige la expresión de GFP:ODD permite utilizar la fluorescencia roja para normalizar la señal de GFP. B) La actividad de Fga responde a O_2. Emisión de fluorescencia de GFP:ODD y RFP en discos imaginales de ala provenientes de larvas del 3er estadío sometidas a un ambiente normóxico o a una hipoxia moderada (5% O_2 durante 16 hs). A la derecha del panel se indica la cuantificación de la señal del reportero. C) La actividad de Fga no responde a 2-OG. Emisión de fluorescencia de GFP:ODD y RFP en discos imaginales de ala provenientes de larvas del 3er estadío incubados durante 15 min en medio Schneider o PBS. A la derecha del panel se indica la cuantificación de la señal del reportero. *p-valor < 0,05 (T-test de Student)

Al someter a una hipoxia moderada (5% O_2 por 16 hs) a larvas del 3er estadío que expresan GFP:ODD, se observó en discos imaginales de ala una clara estabilización de la proteína quimérica, lo cual evidencia la inhibición de la actividad de Fga frente a la menor disponibilidad de O_2 (Fig 25.B). Sin embargo, discos imaginales de estas larvas incubados durante 15 min en medio Schneider no muestran una señal distinta del reportero de Fga respecto a la observada en discos incubados durante el mismo

tiempo en PBS (Fig 25.C). Esto sugiere que los cambios en la concentración citosólica de 2-OG detectados por OGSOR no regulan la actividad de Fga, por lo que, al menos en el contexto del disco imaginal de ala, Fga no se comporta como sensor de 2-OG en la célula.

Este resultado, en principio, sugeriría que la regulación por disponibilidad de 2-OG reportada para las PHDs de mamíferos (*130*) no estaría conservada en *Drosophila*; sin embargo, no creo que éste sea el caso ya que no considero probado que las PHDs de mamíferos respondan a la disponibilidad de 2-OG Mi interpretación de los resultados del trabajo de MacKenzie y colaboradores (*130*) llevado a cabo en células de mamíferos es diferente a la propuesta por los autores. En este trabajo, ellos utilizan un modelo de pseudo-hipoxia en el cual mutaciones en la succinato deshidrogenasa o fumarato hidratasa aumentan los niveles de succinato o fumarato, respectivamente. Por lo tanto la pseudo-hipoxia se logra debido a que ambos metabolitos son capaces de actuar como inhibidores competitivos de las PHDs, desplazando al 2-OG con quien comparten una alta similitud estructural (*134*). De esta manera, al incrementarse la concentración citosólica de 2-OG, los autores del trabajo observan una mayor actividad de las PHDs, ya que logran desplazar a los inhibidores por acción de masas. Desde mi punto de vista, se trata entonces de un fenómeno esencialmente distinto de la dependencia de las PHDs por el O_2, ya que la regulación de la actividad de las enzimas no sería consecuencia de la disponibilidad de 2-OG (co-sustrato), sino que resultaría de la inhibición competitiva por parte de otros intermediarios del metabolismo energético. De esta manera, si bien las PHDs estarían siendo reguladas metabólicamente, ya que su actividad es proporcional a los cocientes 2-OG/succinato y 2-OG/fumarato, opino que no hay evidencias para afirmar que estas enzimas constituyen sensores celulares de los niveles de 2-OG. Esto explicaría, entonces, el motivo por el cual frente a una disminución en los niveles de 2-OG en los discos imaginales de *Drosophila* incubados en PBS no observamos una reducción consecuente de la actividad de Fga.

Manipulaciones genéticas del metabolismo

Al manipular genéticamente los niveles de enzimas o transportadores relevantes para el metabolismo energético en células que además expresen los biosensores FRET, debería ser posible analizar el efecto que estas proteínas ejercen sobre el estado metabólico celular en tejidos intactos u órganos enteros. Con este fin, analizamos la señal de Laconic luego de alterar individualmente los niveles de proteínas vinculadas, por trabajos previos, a reprogramaciones del metabolismo energético en el contexto del efecto Warburg. Estas proteínas son la **piruvato quinasa** (PK), la **piruvato deshidrogenasa quinasa** (PDHK), la **lactato deshidrogenasa** (LDH), el **transportador mitocondrial de piruvato** (MPC), los **transportadores de monocarboxilatos en membrana plasmática** (MCTs) y el transportador de glucosa en la membrana plasmática **Glut1** (Figura 26 y Tabla 2; ver *Introducción*).

Tal como se detalló en la Introducción, el piruvato cumple un rol central en el metabolismo energético, ya que está involucrado en reacciones que determinan si la célula adopta un perfil metabólico glucolítico o si adquiere un metabolismo dependiente de OXPHOS. Esta particularidad explica por qué diversos mecanismos de control metabólico convergen sobre esta molécula. El piruvato, producto final de la glucólisis, es generado a partir de fosfoenolpiruvato mediante la PK. En diversos contextos tumorales se ha reportado que la PK experimenta un cambio de isoforma como parte del efecto Warburg, observándose un aumento en la proporción de la forma PKM2. Esta variante de la enzima posee menor afinidad por el fosfoenlopiruvato, de manera que permite la acumulación de intermediarios glucolíticos requeridos para la síntesis de diversas biomoléculas (*31, 32*). Por otro lado, el bloqueo de la entrada del piruvato a la mitocondria es uno de los hitos que mejor caracterizan al efecto Warburg. En ciertos tumores, esto se consigue mediante la inhibición transcripcional de MPC (*37*). En otros contextos tumorales lo que se encuentra bloqueado es la conversión del piruvato mitocondrial en acetil-CoA mediante la inhibición del complejo PDH. A su vez, esta inhibición de PDH es producto de su fosforilación en residuos específicos mediada por PDHK, la cual se encuentra sobre-expresada en estos tumores (*40, 41*).

Otra característica inmanente del efecto Warburg es la presencia de un flujo glucolítico exacerbado. Esta condición se alcanza, en la mayoría de los modelos estudiados, aumentando los niveles de LDHA, isoforma de LDH con alta eficiencia en la reducción del piruvato a lactato (*35, 135*), y/o aumentando los niveles de Glut1, lo cual maximiza el ingreso de glucosa a la célula (*23*). Por último, los MCTs favorecen, en un contexto tumoral, la salida del lactato al medio extracelular. Así, el aumento en los niveles de MCTs descripto en células transformadas permite disipar la acumulación de este metabolito en el citosol generada a consecuencia del perfil metabólico alterado característico de estas células (*36*).

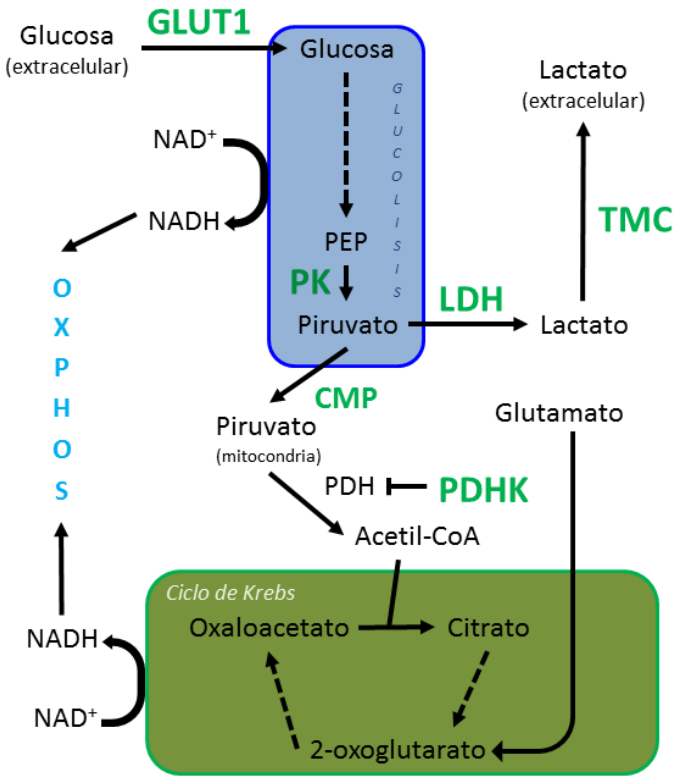


Figura 26: Esquema del metabolismo energético donde se muestran en verde los elementos manipulados genéticamente en los experimentos de esta tesis. Mediante la expresión tejido-específica de ARNi's utilizando el sistema Gal4/UAS, se silenció al transportador de glucosa GLUT1, a la piruvato kinasa (PK), a la lactato deshidrogenasa (LDH), a la piruvato deshidrogenasa kinasa (PDHK), al transportador de monocarbozxilatos (TMC), y al carrier mitocondrial de piruvato (CMP). La LDH y la PDHK fueron, además, sobre-expresadas de forma tejido-específica empleando también el sistema Gal4/UAS. La elección de estos elementos se realizó en base a trabajos previos donde se reporta que su desregulación está vinculada a reprogramaciones metabólicas (ver tabla 2).

Nombre del elemento	Función en el metabolismo energético	Desregulación observada en contextos tumorales	Referencias
GLUT1	Transporte de glucosa a través de la membrana plasmática	Activación de isoformas 1 y 3 en modelos tumorales de mamíferos Silenciamiento, en conjunto con el de LDH, reduce el fenotipo tumoral observado al activar la vía Notch en discos imaginales de *Drosophila*	(*23, 136*)
Piruvato Kinasa (PK)	Conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato	Aumento de la isoforma PKM2 en varios modelos tumorales de mamíferos	(*31, 32*)

Carrier Mitocondrial de Piruvato (MPC)	Transportadores mitocondriales de piruvato	Inhibición de las isoformas 1 y 2 en modelos tumorales de mamíferos. Silenciamiento en *Drosophila* genera letalidad al desarrollar larvas en medio con sacarosa como única fuente de carbono	(*37, 38*)
Transportador de Monocarboxilatos (MCT)	Transportadores de lactato en la membrana plasmática	Expresión elevada de la isoforma 4 en modelos tumorales de mamíferos	(*36*)
Piruvato Deshidrogenasa Kinasa (PDHK)	Inhibición del complejo Piruvato Deshidrogenasa	Aumento de la isoforma 1 en varios modelos tumorales de mamíferos	(*40, 41*)
Lactato Deshidrogenasa (LDH)	Reducción de piruvato generando lactato	Aumento de la isoforma LDHA en varios modelos tumorales de mamíferos La transformación de hiperplasia a neoplasia observada en ciertos modelos genéticos de *Drosophila* depende de la actividad LDH	(*35, 135*)

Tabla 2: Lista de genes manipulados para intentar forzar una reprogramación del metabolismo energético. Al igual que en la tabla 1 se indican los roles fisiológicos de las proteínas, así como la clase de desregulación observada en células tumorales.

Notablemente, ni el silenciamiento ni la sobrexpresión de ninguno de estos elementos de forma individual alteró de manera significativa los niveles estacionarios de lactato citosólico (Fig 27). Este resultado torna evidente el alto grado de robustez que presenta el metabolismo, lo cual constituye un hecho ampliamente descripto en la bibliografía. Existen varios trabajos en los cuales se ha intentado alterar el flujo metabólico o alguna característica determinada por éste (como el crecimiento o la morfogénesis) mediante la manipulación de enzimas metabólicas o transportadores en *Drosophila* y en todos ellos ha sido necesario alterar de manera concertada los niveles de varios elementos simultáneamente, o controlar simultáneamente la fuente de carbono en el alimento de las moscas, de manera de forzar la utilización exclusiva de una determinada ruta catabólica (*38, 136*).

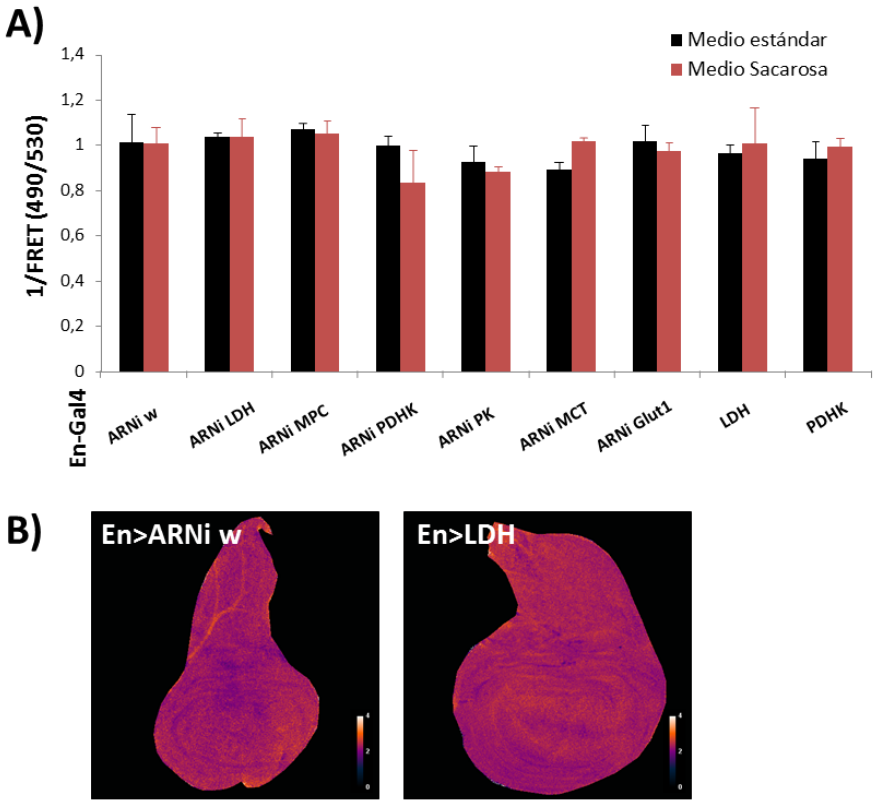


Figura 27: Manipulaciones individuales de enzimas o transportadores de metabolitos no alteran los niveles citosólicos de lactato. A) Señal de laconic en discos imaginales de ala, en cuyo compartimento posterior se sobre-expresaron o silenciaron los elementos descriptos en la tabla 2. Los discos se obtuvieron de larvas desarrolladas en medio estándar (columnas negras) o en medio con sacarosa como única fuente de carbono (columnas rojas). B) Mapas de FRET representativos de discos donde se silenció en el compartimento posterior (En-Gal4) un gen no vinculado al metabolismo en forma directa (w), o donde se sobre-expresó LDH.

Para intentar manipular el metabolismo, decidimos por lo tanto alterar la expresión de más de un gen a la vez (Tabla 2). Evaluamos el efecto de combinar el silenciamiento del transportador mitocondrial de piruvato (MPC) con la sobre-expresión de LDH o PDHK, esperando así lograr un aumento en los niveles citosólicos de lactato. Alternativamente, combinando el silenciamiento de LDH con el del transportador de glucosa GLUT1, intentamos reducir dichos niveles. Llamativamente, mientras que la combinación LDH ARNi + Glut1 ARNi no logró alterar la señal de Laconic en discos de ala, las combinaciones de MPC ARNi + LDH, y MPC ARNi + PDHK sí modificaron la señal del sensor (Fig 28). Este efecto resultó, además, independiente del medio de cultivo en el cual se desarrollaron las larvas. Debido a que la manipulación genética se realizó de manera específica en el compartimento posterior del disco de ala (se empleó el elemento En-Gal4 como inductor), resulta notable que los cambios en la señal de

Laconic se observen en la totalidad del disco (Fig 28.B). Una posible interpretación de este fenómeno puede ser que el lactato difunda al medio extracelular a través de los MCTs de la membrana plasmática, siendo luego recaptado por otras células del tejido. De esta manera, los cambios en la concentración de lactato en un compartimento del disco se propagarían al otro compartimento por simple difusión entre ambas regiones del órgano. Esto podría explicar, además, por qué no se observan cambios en las concentraciones estacionarias de lactato como consecuencia de manipulaciones genéticas simples.

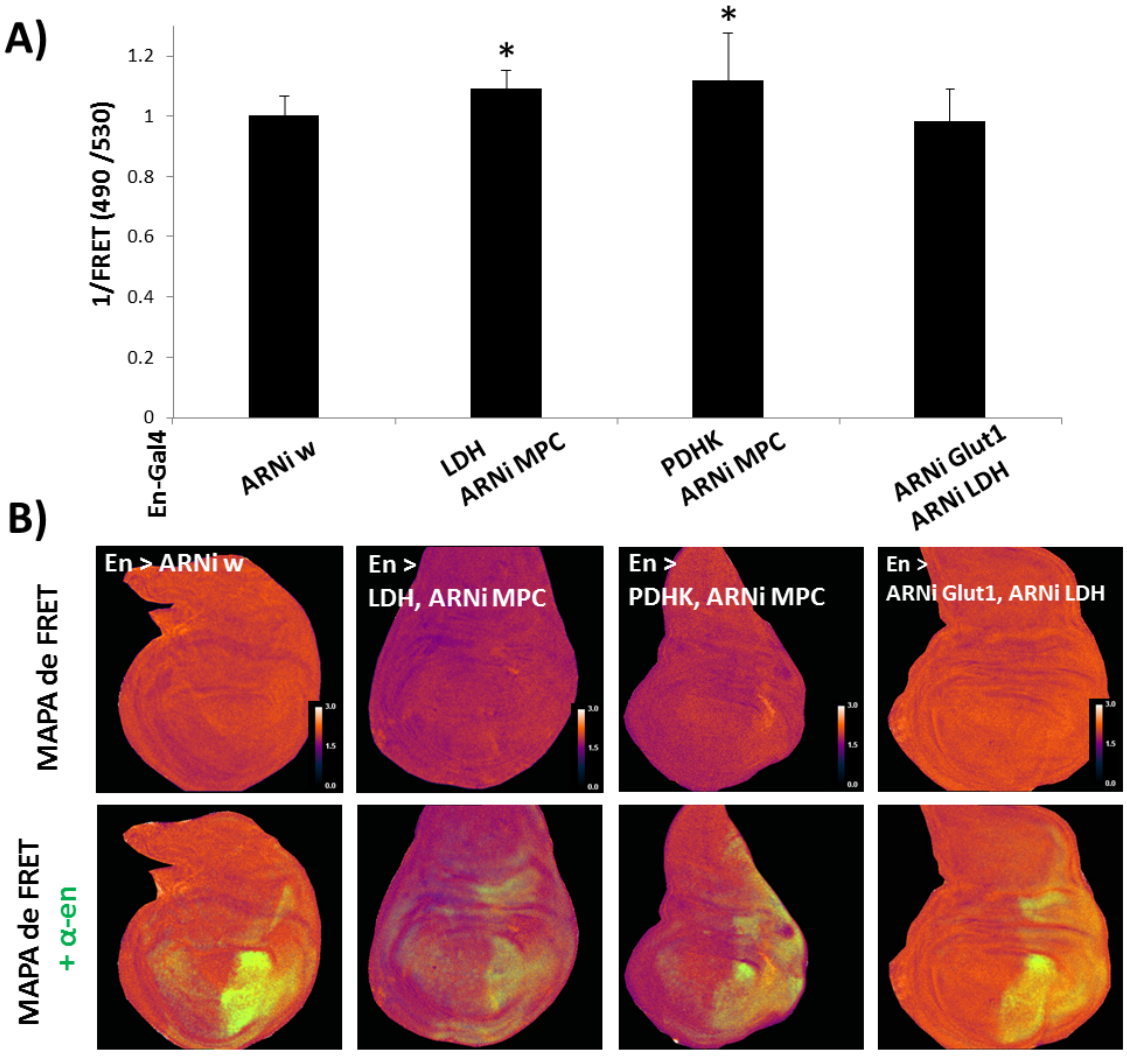


Figura 28: Manipulaciones combinadas de enzimas o transportadores alteran los niveles citosólicos de lactato. A) Señal de laconic en discos imaginales de ala, en cuyo compartimento posterior se sobre-expresaron o silenciaron los elementos descriptos en la imagen. B) Mapas de FRET representativos de discos donde se realizaron en el compartimento posterior (En-Gal4) las manipulaciones indicadas en cada panel. El compartimento posterior se indica a través de una inmunotinción contra en. *p<0,05 respecto al genotipo de referencia (en>ARNi w); test de Dunnet.

Análisis del metabolismo tumoral

El descubrimiento a comienzos del siglo XX, por parte de Calvin Bridges, de que ciertas mutantes de *Drosophila* desarrollan masas melanóticas similares a tumores, sugirió por primera vez que este organismo podría emplearse como modelo para estudiar la biología tumoral (*137*). Durante los años siguientes se identificaron una gran cantidad de mutaciones espontáneas en esta especie asociadas al crecimiento y a la proliferación desregulada de tejidos internos (*138*), al punto de que el primer reporte de un gen supresor de tumores fue llevado a cabo en *Drosophila (139, 140)*. El alto grado de conservación que existe entre humanos y *Drosophila* en los mecanismos de regulación del crecimiento y la división celular conduce a que el estudio de tumores en este organismo posea una relevancia clínica inherente. De hecho, la mayoría de los oncogenes y genes supresores de tumores humanos tienen su ortólogo correspondiente en esta especie.

Los discos imaginales, a su vez, constituyen un modelo sumamente adecuado para estudiar tumores en *Drosophila*. Estos órganos consisten en una monocapa de células epiteliales no politénicas, sometidas a la misma progresión del ciclo celular que las células humanas; progresión que se encuentra regulada a través de mecanismos conservados entre ambas especies (*141*). Por otro lado, la especificación de linajes durante la diferenciación celular en estos órganos también emplea mecanismos fuertemente conservados, los cuales se han vinculado a la transformación tumoral en humanos (*141*). Por ejemplo, el receptor transmembrana Notch cumple un rol en la adquisición de identidades celulares tanto en *Drosophila* como en humanos a través de mecanismos de comunicación célula-célula muy similares (*142*). En humanos, alteraciones en la vía Notch se han asociado a diversos tipos de cáncer, tales como leucemias, cáncer de mama, cáncer de colon y glioblastomas (*143*). En *Drosophila*, la sobre-activación de esta vía en discos imaginales produce hiperproliferación del tejido, generando órganos hiperplásicos (*144*).

El metabolismo de los tumores de disco de ala generados por sobreactivación de la vía Notch ha sido estudiado en un trabajo reciente (*136*). Tal como describimos en la introducción, las células tumorales se caracterizan por la adquisición de un perfil metabólico glucolítico, fenómeno que se conoce como efecto Warburg. En este

trabajo (*136*), Slaninova y colaboradores reportan que ciertos genes glucolíticos (LDH, HK A y Glut1) se activan transcripcionalmente en los discos hiperplásicos. Notablemente, el silenciamiento tejido específico de estos genes mediante ARNi's impacta sobre el crecimiento del disco, reduciendo el tamaño total alcanzado por el tumor.

La adquisición del metabolismo glucolítico por parte de los tejidos tumorales debe acompañarse de un aumento en la producción de lactato (ver *Introducción*) por lo que, en principio, podría esperarse que la concentración estacionaria de este metabolito en el citosol aumente. Decidimos, por lo tanto, utilizar Laconic para monitorear los niveles de lactato en tejidos tumorales. El receptor Notch, al activarse, sufre un clivaje que torna soluble al dominio citosólico, permitiendo que transloque al núcleo donde actúa como factor de transcripción (*143*). De esta manera, la expresión del dominio intracelular de Notch (NICD, por sus siglas en inglés) basta para activar esta vía de señalización. Al igual que en el trabajo de Slaninova discutido anteriormente (*136*), expresamos al NICD en discos imaginales de ala produciendo discos hiperplásicos. Como la expresión del NICD bajo el control de engrailed-Gal4 provoca una letalidad temprana en el desarrollo, se utilizó la variante termosensible de Gal80 para sobre-activar la vía recién al alcanzar el estadío de larva 3 (ver *Sistema Gal4/UAS* en MyM). Además de presentar tumores hiperplásicos en discos de ala, estas larvas no son capaces de pupar, por lo que persisten como larvas de 3er estadío durante más de 11 días y luego mueren. Analizamos, por lo tanto, la señal de Laconic en discos hiperplásicos generados por expresión del NICD, en función del tiempo de desarrollo del tumor. Tal como se observa en la figura 29, la señal de Laconic resultó idéntica en discos tumorales a la observada en los discos normales, incluso luego de 11 días de desarrollo tumoral. Esto indicaría que en las condiciones experimentales analizadas los cambios en la concentración citosólica de lactato serían despreciables, si es que efectivamente ocurren.

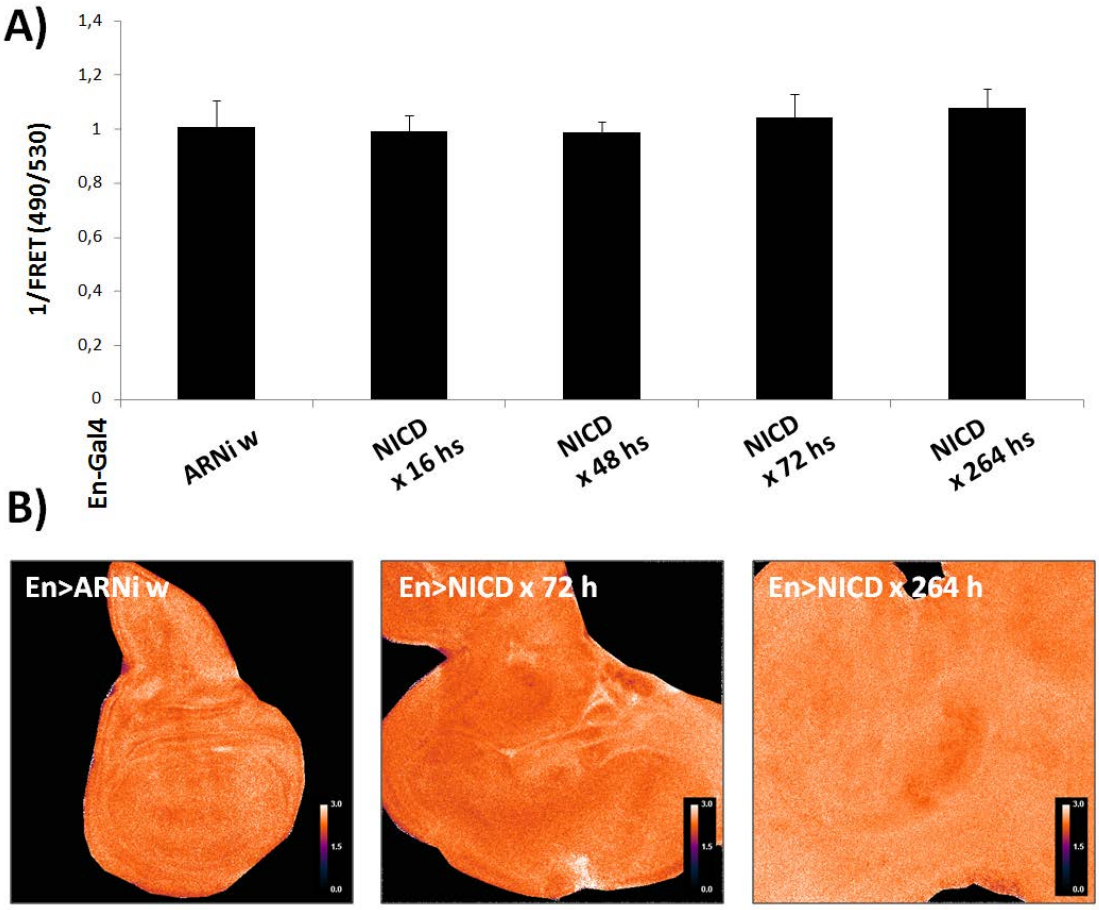


Figura 29: Los tumores hiperplásicos generados al expresar NICD presentan niveles normales de lactato citosólico A) Señal de laconic en discos imaginales de ala, en cuyo compartimento posterior se indujo la expresión del NICD al alcanzar el 3er estadío. En el eje x se indica, además, el tiempo de desarrollo tumoral al momento de la disección del tejido B) Mapas de FRET representativos de discos donde se indujo en el compartimento posterior (En-Gal4) la expresión del NICD a 72 o 264 hs. El silenciamiento del gen white se utilizó como condición de referencia.

En base a los resultados anteriores decidimos exacerbar el fenotipo tumoral, buscando condiciones en las que el efecto Warburg conduzca a una acumulación de lactato en el citosol. Para ello empleamos una estrategia de *múltiples hits*, donde en simultáneo a la activación de la vía Notch silenciamos al gen supresor de tumores *expanded* (ex). Este gen codifica para un activador de la vía Hippo, la cual cumple diversas funciones restringiendo el crecimiento tisular y modulando la proliferación, diferenciación y migración celular en distintos contextos (*145, 146*). De la misma forma que en el experimento anterior, las manipulaciones se realizaron utilizando a la línea engrailed-Gal4 como inductora. En este caso la sobreactivación de la vía Notch se produjo

expresando a un ligando de la vía, *Delta* (Dl). Estas larvas manipuladas genéticamente fueron colocadas a 29ºC en el 1er estadío para exacerbar el efecto del sistema Gal4/UAS y disecadas 72 hs después, ya habiendo alcanzado el 3er estadío larval. La figura 30 muestra cómo, en este contexto tumoral, el tejido transformado presenta niveles mayores de lactato citosólico respecto al tejido normal, susceptibles de ser detectados mediante Laconic. Este resultado torna evidente que el efecto Warburg depende fuertemente del tipo de tumor analizado, al igual que la mayoría de los aspectos de la biología tumoral.

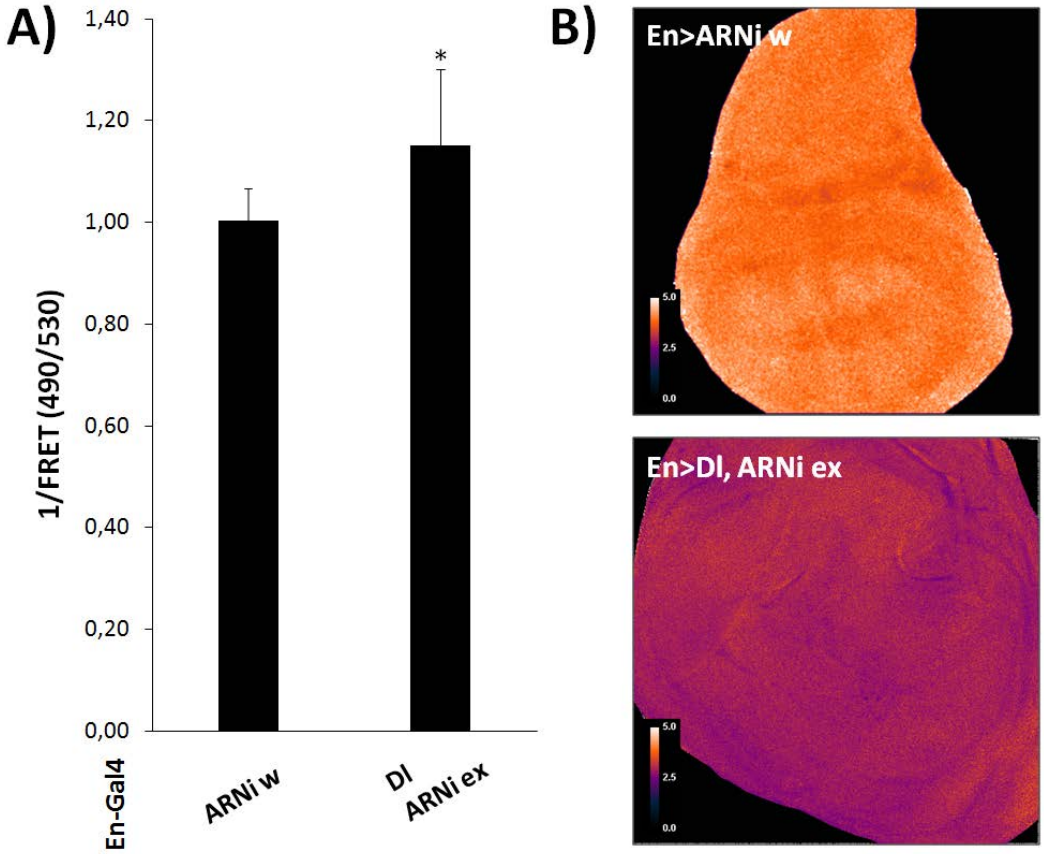


Figura 30: Los tumores generados al combinar la sobreactivación de la vía Notch (Dl) con el silenciamiento de la vía Hippo (ARNi ex) presentan mayores niveles de lactato citosólico que el tejido normal A) Señal de laconic en discos imaginales de ala, en cuyo compartimento posterior se realizaron las manipulaciones indicadas. El silenciamiento del gen white se utilizó como condición de referencia. B) Mapas de FRET representativos de las condiciones cuantificadas en A. *p-valor < 0,05 (T-test de Student)

Búsqueda de alteraciones metabólicas en células individuales

Los resultados descriptos hasta aquí evidencian el potencial que los biosensores FRET tienen para llevar a cabo estudios metabólicos en un organismo pluricelular como *Drosophila*. Sin embargo, en ningún experimento previo nos centramos en buscar reprogramaciones bioenergéticas con resolución de célula individual. Tal como se discutió en la introducción, uno de los problemas centrales de la biología del desarrollo del siglo XXI consiste en poder entender la manera en la cual los programas ontogenéticos y el metabolismo dialogan para permitir el desarrollo coordinado espacial y temporalmente de un nuevo individuo. Y este problema solo podrá ser abarcado en su totalidad mediante el desarrollo de técnicas que permitan analizar el estado metabólico de **células individuales** en el contexto tisular al cual pertenecen.

Teniendo en cuenta la hipótesis del efecto Warburg fisiológico (ver *El efecto Warburg y la diferenciación celular*), según la cual células progenitoras con alta tasa de proliferación tendrían asociado un perfil metabólico glucolítico, decidimos analizar la señal de Laconic en órganos larvales donde co-existan poblaciones de células diferenciadas con progenitores en proliferación.

El primero de estos órganos que analizamos fue el disco imaginal de ojo. En esta estructura, que dará origen al ojo compuesto de los individuos adultos de *Drosophila*, las células se encuentran proliferando durante todo el desarrollo larval (*147*). Al comienzo del 3er estadío larval, sin embargo, se forma un surco en la región posterior del disco, el cual se desplaza luego hacia la región anterior de manera progresiva, dejando a su paso células comprometidas con distintos programas de diferenciación. De esta manera, el surco morfogenético separará dos poblaciones de células claramente distinguibles (*147*): progenitores en proliferación en la región anterior y células en diferenciación hacia la zona posterior (Fig 31.A). Al analizar los niveles de lactato citosólico en este órgano mediante Laconic, no observamos diferencias entre ambas poblaciones (Fig 31.B-D). La homogeneidad de la señal del sensor en todo el disco de ojo impide distinguir entre un escenario en el cual no hay alteraciones en los niveles estacionarios de lactato vinculados a la diferenciación celular y otro en el cual estos cambios sí ocurren, pero la sensibilidad de los biosensores no permite reflejarlo (ver *Discusión*).

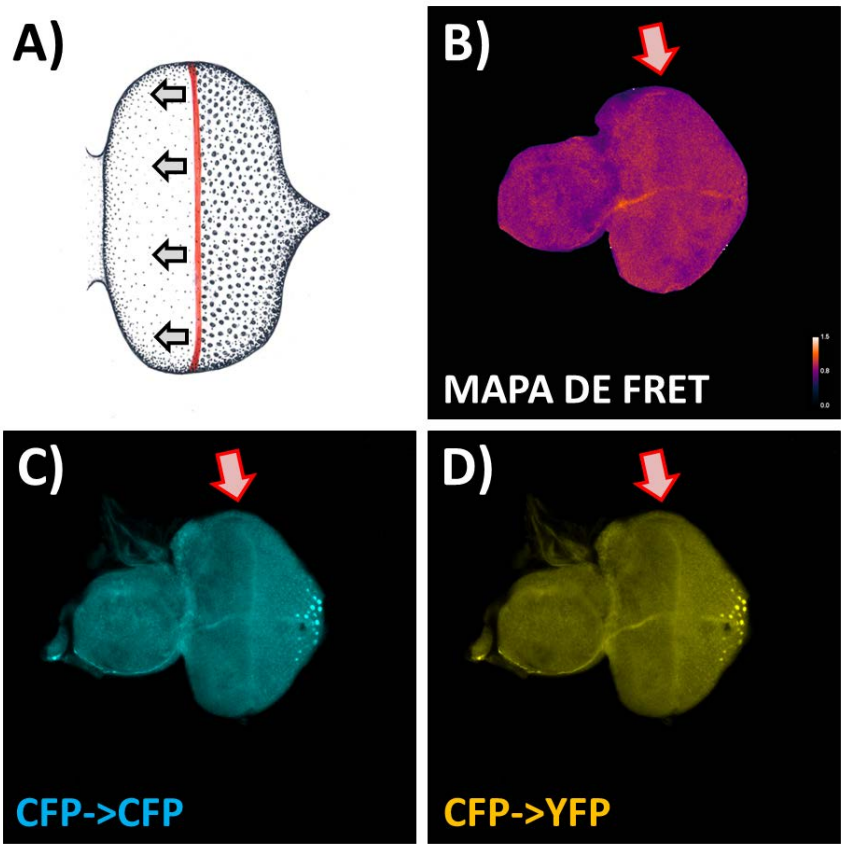


Figura 31: No se observan diferencias en la señal de Laconic asociadas a la proliferación celular en el disco imaginal de ojo. A) Esquema de la diferenciación de omatidios en el disco imaginal de ojo. El desplazamiento hacia la región anterior (flechas grises) del surco morfogénetico, en rojo, está asociado a la adquisición de destinos celulares en las células del disco. La posición del surco separa poblaciones de células en proliferación (anterior) y en diferenciación (posterior). B) Mapa de FRET de Laconic expresado de manera ubicua en discos imaginales de ojo en larvas del tercer estadío. En C) y D) se muestran los canales de CFP y YFP respectivamente. La flecha roja indica la posición del surco morfogenético.

En paralelo, estudiamos la señal de Laconic en la glándula linfática, órgano hematopoyético de la larva. En este órgano, al igual que en el disco imaginal de ojo, co-existen poblaciones de progenitores en proliferación y células diferenciadas. Los lóbulos primarios de la glándula linfática están constituidos, en el 3er estadío larval, por una región medular próxima al tubo dorsal donde se disponen células progenitoras mayormente quiescentes y una región cortical, más periférica, donde se concentran las células terminalmente diferenciadas, no proliferantes (Fig 32.A). En larvas del 3er estadío, existen progenitores proliferantes dispersos tanto en la zona medular como en la zona cortical (*148*). Al igual que en el disco imaginal de ojo, la señal de Laconic no revela la presencia de células con un metabolismo diferente al del tejido del que forman parte (Fig 32.B-D), por lo que nuevamente no es posible sacar conclusiones sobre el estado metabólico de las células proliferantes en este contexto.

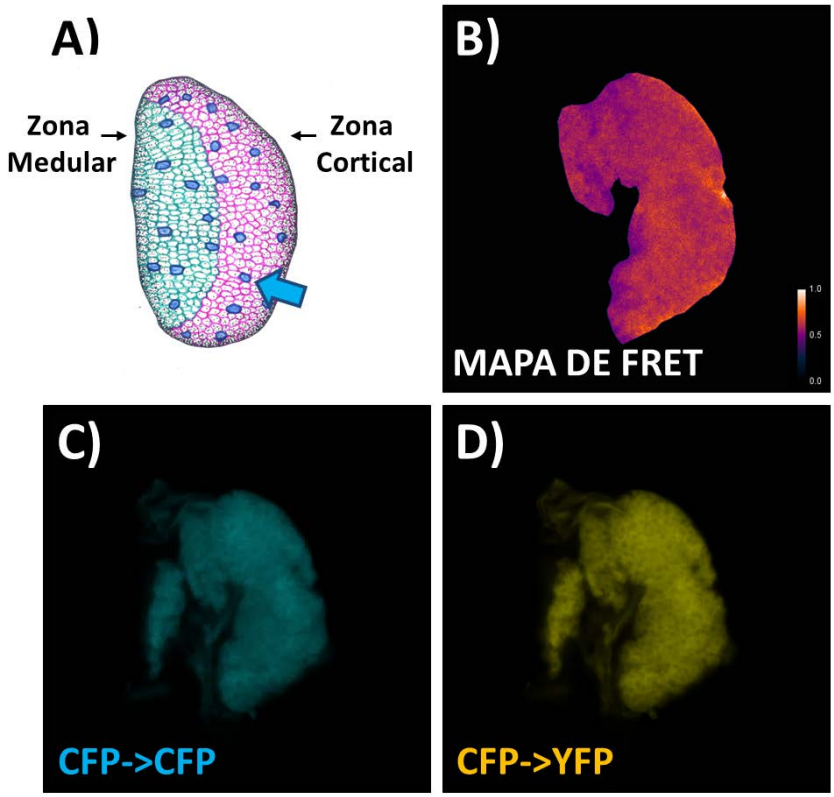


Figura 32: No se observan diferencias en la señal de Laconic asociados a la proliferación celular en la glándula linfática A) Esquema de un lóbulo primario de la glándula linfática en el tercer estadío larval. En verde se muestra la zona medular y en rojo la zona cortical. Los progenitores proliferantes, en azul, se indican con una flecha B) Mapa de FRET de Laconic expresado de manera ubicua en la glándula linfática en larvas del tercer estadío. En C) y D) se muestran los canales de CFP y YFP respectivamente.

Al expresar Laconic en el cordón nervioso ventral del cerebro larval en el 3er estadío, sí pudimos identificar una sub-población celular con concentraciones citosólicas de lactato distintas a las del resto del tejido del cual forma parte. Como se muestra en la figura 33, estas células se encuentran ordenadas metaméricamente de modo bilateral (Fig 33.A) y presentan niveles de lactato notablemente más bajos a los observados en el resto de las células que componen el cordón nervioso ventral y el sistema nervioso central en general (Fig 33.B). El plano donde se encuentran estas células “oligolácticas” se ubica 4 µm por debajo de la superficie dorsal del cordón nervioso ventral (Fig 33.C).

Si bien todavía no hemos logrado identificar a esta sub-población celular, su morfología y la posición que estas células ocupan en el órgano permiten especular con la posibilidad de que se trate de motoneuronas. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos de co-localización con marcadores de distintas sub-poblaciones neuronales, los cuales posiblemente nos permitan establecer su identidad.

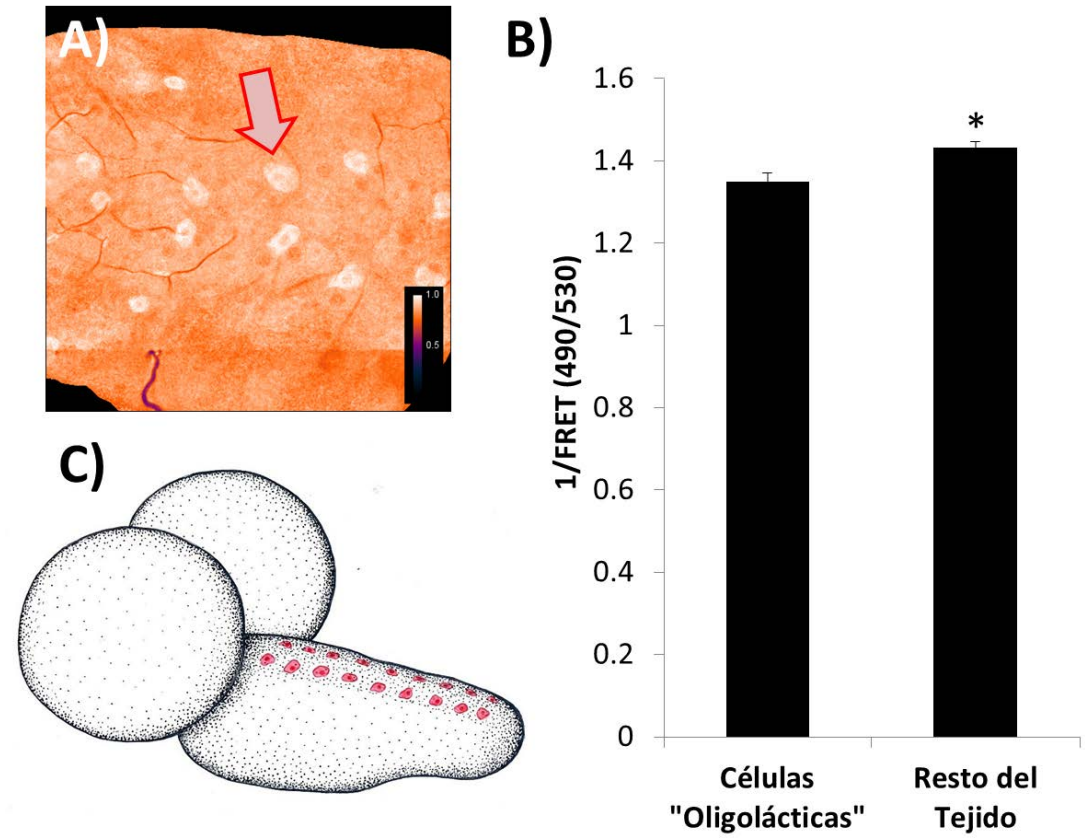


Figura 33: Células oligolácticas en el cordón ventral del cerebro de larvas del tercer estadío. A) Mapa de FRET donde se observa el patrón espacial de estas células en el cordón nervioso. La flecha roja señala a una de ellas. B) Señal FRET de Laconic en células oligolácticas y en el tejido aledaño. C) Esquema que indica la posición de estas células en el cerebro larval. *p-valor < 0,05 (T-test de Student)

Reportero transcripcional del efecto Warburg

Como estrategia complementaria para estudiar reprogramaciones metabólicas durante el desarrollo, generamos una herramienta que permite identificar sub-poblaciones celulares con un potencial metabolismo glucolítico mediante microscopía de fluorescencia. La enzima PDHK1 de mamíferos cumple un rol central en el desacople entre la OXPHOS y el metabolismo energético, inhibiendo al complejo PDH, el cual se encarga del ingreso del piruvato al ciclo de Krebs (Figura 1, (*2*)). De hecho, en diversos contextos tumorales el efecto Warburg se alcanza como consecuencia de la activación transcripcional de PDHK1 (*115-118*). Debido a ello, clonamos al promotor de PDHK1 río arriba de GFP, e incorporamos esta construcción al genoma de *Drosophila*

(ver *Introducción*). Así, esta herramienta permite reconocer células en las que se encuentran activos ciertos mecanismos conservados de activación de la reprogramación metabólica, sin aislarlas de su contexto biológico.

Al analizar al reportero transcripcional del efecto Warburg, PDHK1->eGFP, en condiciones de desarrollo estándar, observamos actividad del mismo en diversos órganos larvales y en la mosca adulta (Fig 34). En larvas del 3er estadío, se identificó en el cerebro un patrón definido de células que expresan el reportero. Del mismo modo, observamos patrones de expresión espacialmente acotados en los túbulos de Malpighi y en distintas regiones del intestino (Fig 34.A). Luego de la metamorfosis la señal persiste en las mismas cuatro regiones, aunque con un patrón ligeramente diferente (Fig 34.B). Además, en moscas adultas detectamos una quinta región con actividad del reportero en la porción posterior del intestino: la ampolla rectal.

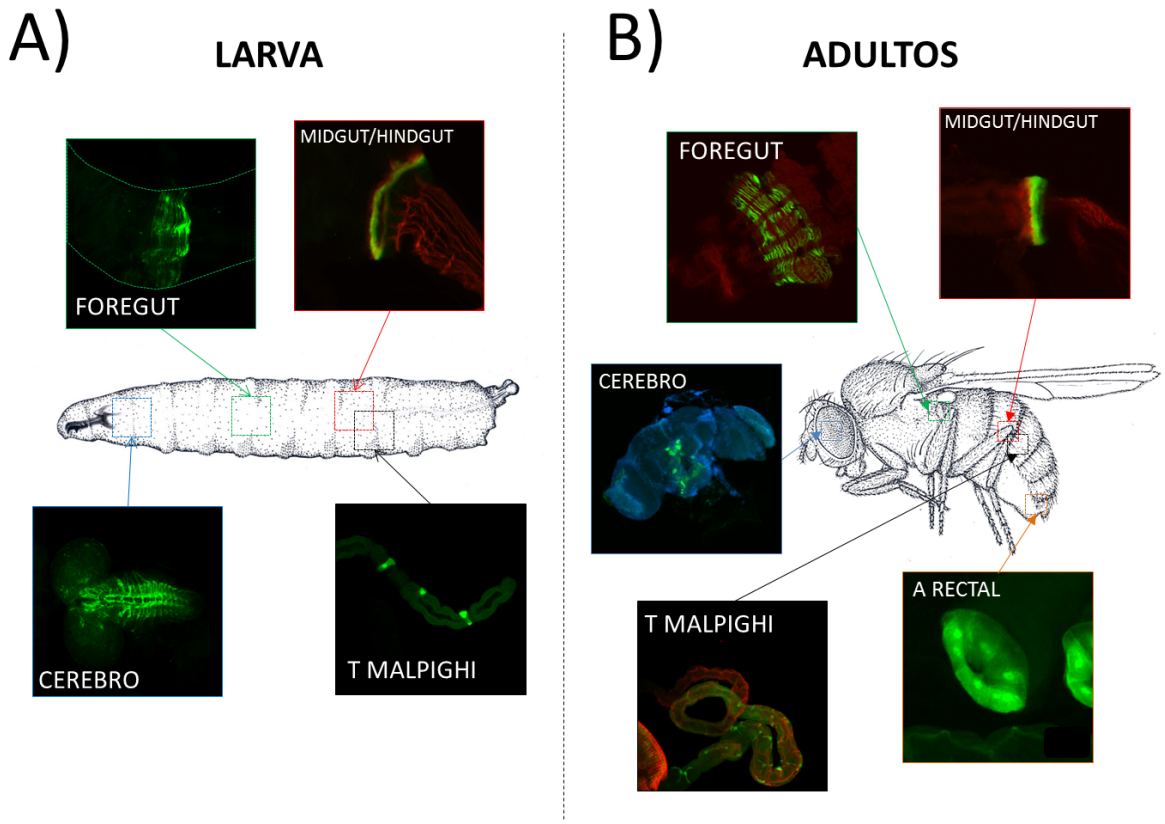


Figura 34: Patrón de expresión del reportero transcripcional del efecto Warburg en larvas y adultos. A) Señal del reportero en larvas del 3er estadío. Se observa actividad en el cerebro, túbulos de Malpighi, en la región anterior del intestino (foregut) y en la frontera entre intestino medio e intestino posterior (hindgut). B) Señal del reportero en adultos. A las regiones donde se detectó actividad en la larva se suma la ampolla rectal. En todas las imágenes la señal del reportero se amplificó mediante inmunofluorescencia. En ciertos paneles la autofluorescencia roja se empleó para mostrar los límites de la estructura. Ilustraciones en tinta realizadas por Ayelén Valko.

La señal del reportero en el cerebro larval indica que existe una subpoblación celular que podría depender de un perfil metabólico diferencial al del tejido del cual forma parte. Si bien esta observación recuerda a las células "oligolácticas" identificadas empleando Laconic (Fig 33), su posición en el cerebro larval no coincide con la de las células que muestran actividad de este reportero transcripcional. Además en este caso se trataría de células que posiblemente presenten niveles elevados de PDHK, lo cual llevaría a un bloqueo del flujo metabólico hacia la mitocondria, y por lo tanto a la acumulación de ácido láctico.

Una posibilidad que evaluamos, considerando el modelo de la lanzadera de lactato en el tejido nervioso, es que se trate de células gliales. Este modelo describe cómo un tipo particular de células gliales, los astrocitos, oxidan la glucosa a lactato, liberándolo al medio extracelular, de manera que las neuronas pueden emplearlo como sustrato catabólico alternativo a la glucosa (*8*) (ver *Heterogeneidad inter- e intracelular…*). De esta forma, los astrocitos serían células esencialmente glucolíticas, con una elevada tasa de producción de lactato. En *Drosophila* esta dinámica pareciera estar conservada, siendo las células gliales de la barrera hemato-encefálica las principales proveedoras de lactato de las neuronas (*149*).

Evaluamos, entonces, la co-localización de la señal del reportero con el marcador glial Repo. Tal como se observa en la figura 35, no hay superposición entre la señal del reportero y la señal del marcador Repo, lo cual indica que la sub-población que expresa el reportero está formada esencialmente por neuronas.

Otra región con señal positiva del reportero que resulta relevante desde el punto de vista del metabolismo energético es la frontera entre las regiones media y posterior del intestino (*midgut/hindgut*), ya que es ahí donde se disponen las células madre encargadas del mantenimiento del intestino posterior del adulto(*150*). Esta región, denominada *zona de proliferación del intestino posterior* (HPZ, por su sigla en inglés; fig 36.A) se divide a su vez en una zona anterior formada por células ahusadas que expresan *wingless* y *stat92*, y una posterior, más compacta, formada por células redondeadas que expresan *hedgehog*, la cual deriva de la anterior. Ambas poblaciones celulares son consideradas células madre; sin embargo mientras que las células

ahusadas se dividen poco, las células redondeadas muestran una alta tasa de proliferación (*150*). Durante la metamorfosis, células que derivan de la HPZ se expanden rápidamente sobre el intestino posterior larval y luego se diferencian, mientras las células larvales desplazadas mueren por apoptosis (*150*). En el adulto la HPZ persiste y provee continuamente de células al intestino posterior, siendo responsable del recambio celular en este órgano (*150*).

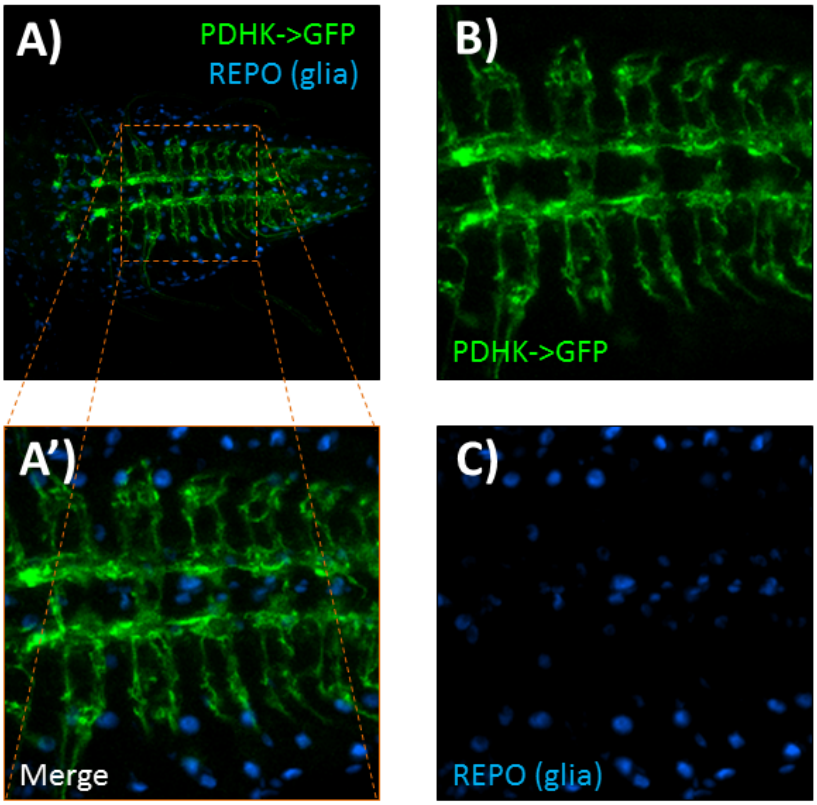


Figura 35: La señal del reportero transcripcional no muestra colocalización con el marcador pan-glial Repo. Fig A) Cordón nervioso ventral de larvas de 3er estadío donde se muestra en verde la señal del reportero transcripcional (GFP amplificada por inmunofluorescencia) y en azul al marcador Repo (inmunofluorescencia; Ac 2°: Alexa 647). Un aumento de la región central se muestra en A'). En B) Y C) se muestran independientemente los canales del reportero y de Repo respectivamente.

La señal anular del reportero en esta región coincide claramente con la posición de la HPZ (Fig 36.B). Esta observación resulta interesante debido a que permitiría comenzar a identificar un perfil metabólico diferencial en células madre intestinales de *Drosophila*, lo cual no fue reportado previamente. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos de co-localización con los marcadores característicos de las dos subpoblaciones que constituyen la HPZ, mencionados en el párrafo anterior, buscando poder establecer con mayor precisión la identidad de estas células intestinales con señal positiva del reportero.

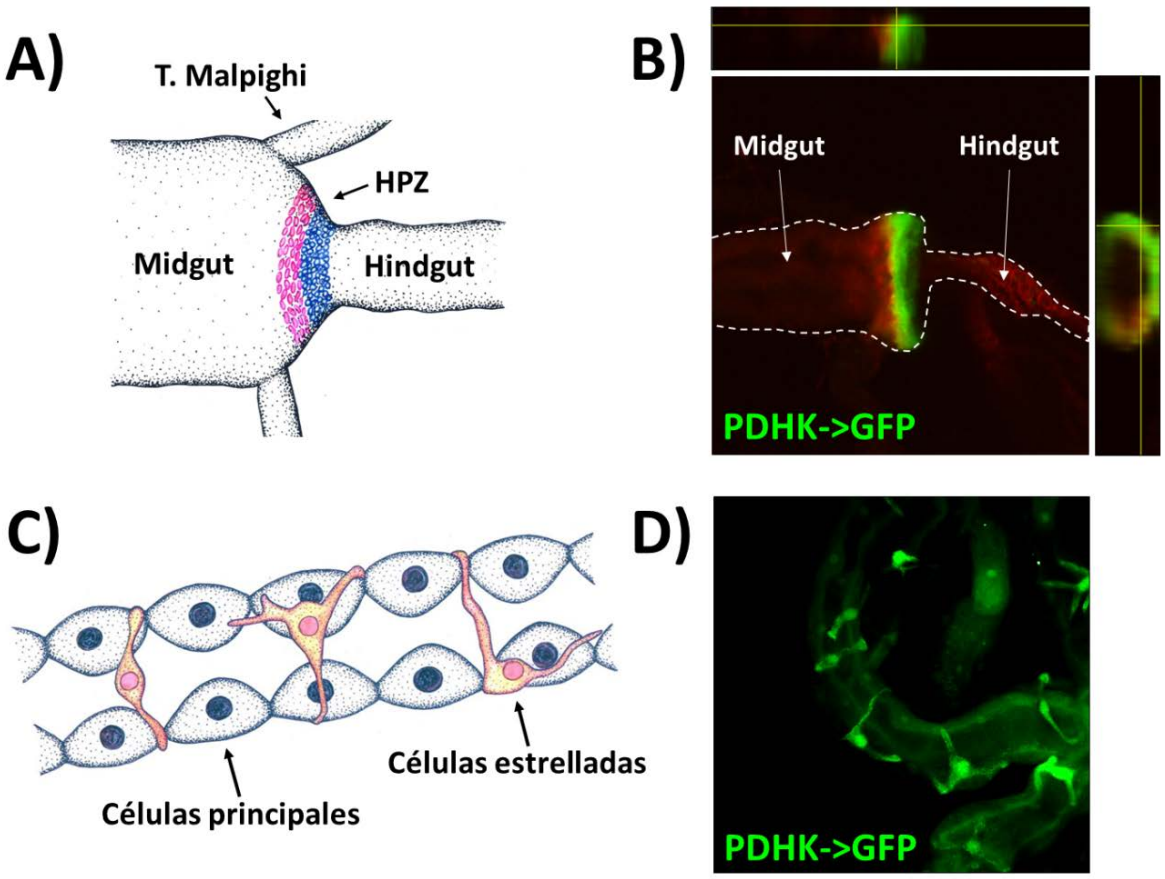


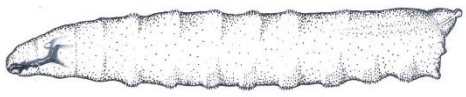
Figura 36: Señal del reportero transcripcional en el intestino y en túbulos de Malpighi. A) Esquema de la HPZ donde se muestra la región de células ahusadas (en rosa) y la de células redondeadas (en azul). B) Señal del reportero en la frontera que separa al intestino medio del intestino posterior. La autofluorescencia roja se empleó para mostrar los límites de la estructura. C) Esquema de los tipos celulares que componen a los túbulos de Malpighi. D) Señal del reportero en los túbulos de Malpighi donde se observa la forma estrellada de las células con señal de GFP.

También se observaron células con señal del reportero en los túbulos de Malpighi. Estos órganos están compuestos por dos tipos celulares diferentes (Fig 36.C): las células principales y las células estrelladas (*151*). Mientras que las primeras regulan el balance iónico a través de una plétora de transportadores específicos (Na^+/K^+ ATPasas, canales de cationes orgánicos, bombas de potasio, etc), las células estrelladas se encuentran asociadas al balance hídrico. Por un lado, las células estrelladas poseen aquaporinas que permiten el pasaje de agua a través de la membrana plasmática. A su vez estas células generan un gradiente de Cl^- entre el medio intra- y extracelular a través de transportadores específicos, lo cual constituye una instancia regulatoria central para controlar el flujo de agua (*151*). Las células estrelladas reciben su nombre de la morfología peculiar que las caracteriza. Tal como se observa en la figura 36.D, las

células del túbulo de Malpighi con señal positiva para el reportero poseen una morfología estrellada inconfundible, por lo que es posible afirmar que se trata de este tipo celular. Sin embargo, a diferencia de los casos anteriores en esta oportunidad no resulta sencillo especular sobre la función biológica que puede cumplir en estas células el estado metabólico lactogénico.

En conclusión, a lo largo del presente trabajo de tesis hemos generado líneas transgénicas de *Drosophila* que permiten estudiar el metabolismo energético en un organismo pluricelular mediante microscopía de fluorescencia. Estas líneas expresan sensores FRET capaces de reportar cambios en los niveles citosólicos de lactato, piruvato o 2-OG. Adicionalmente, desarrollamos un reportero transcripcional del efecto Warburg, el cual permite identificar células que podrían haber adquirido un perfil bioenergético glucolítico a través de mecanismos regulatorios conservados en vertebrados. El desarrollo de estas herramientas implicó generar protocolos de captura y procesamiento de imágenes con el cual se pudo caracterizar la magnitud y el rango de respuesta de cada sensor. Una vez hecho esto, fue posible emplear estas herramientas para analizar reprogramaciones metabólicas previamente descriptas, como la que ocurre en tejidos tumorales o en la respuesta a hipoxia. Notablemente, al emplear los sensores FRET en el estudio de este último fenómeno logramos profundizar en el conocimiento del mismo. En particular, identificamos una respuesta metabólica diferencial a hipoxia en distintos órganos, lo cual no había sido previamente reportado. Finalmente, el análisis de los niveles citosólicos de lactato en el cerebro larval permitió identificar una población de células oligolácticas, claramente distinguibles del tejido del cual forman parte. En conjunto, este cuerpo de resultados demuestra el potencial, así como las limitaciones, que tienen estas herramientas para el estudio del metabolismo de un organismo pluricelular complejo como lo es *Drosophila melanogaster*.

Discusión



Validación y caracterización de las herramientas generadas

Al comenzar a trabajar con los biosensores FRET en *Drosophila*, notamos que el protocolo sugerido para obtener y procesar imágenes de muestras que expresan los sensores no resultaría adecuado para nuestros propósitos. La gran heterogeneidad en los niveles de autofluorescencia detectada en órganos y tejidos arquitectónicamente complejos hizo necesario el desarrollo de un algoritmo *ad hoc* para procesar las imágenes. De esta manera, la puesta a punto de las herramientas requirió un grado de trabajo mayor al esperado, convirtiéndose así en el corazón del trabajo de Tesis. La validez de las imágenes generadas con cada uno de los tres sensores pudo ser confirmada mediante tres controles clave para legitimar la señal FRET: a) análisis de la excitación directa del aceptor, b) aumento de la emisión del dador luego de la fotoinactivación del aceptor y c) independencia de la señal FRET de los niveles de expresión del sensor. Habiendo validado la señal de los tres sensores, procedimos a analizar su rango de respuesta al expresarlos en tejidos de *Drosophila*. Dado que en una proteína quimérica los barriles que constituyen el elemento fotoreactivo de los polipéptidos fluorescentes poseen una libertad de movimiento relativamente acotada, la magnitud de los cambios en la señal de este tipo de sensores FRET suele ser bastante limitada (*152*). Notablemente, el cambio detectado en la señal de Laconic resultó no solo mayor a lo esperado teniendo en cuenta la consideración anterior, sino también mayor a lo reportado previamente por el grupo de trabajo que generó esta herramienta en cultivos de células de mamíferos (*109*). Resulta tentador especular con la posibilidad de que ciertas condiciones particulares de las células de *Drosophila* alteren al sensor, dando cuenta del mayor cambio en la señal FRET detectado en este sistema. Sin embargo, dado que el método de obtención y procesamiento de las imágenes son diferentes en ambos trabajos, no es posible obtener una conclusión clara al respecto. La magnitud del cambio de la señal de Pyronic y de OGSOR, por otro lado, coincide con lo reportado en los trabajos que describen la generación de la herramienta (*110, 111*).

Las concentraciones fisiológicas de lactato y piruvato en mamíferos raramente es mayor a 10 mM (*121, 153*). Si bien en *Drosophila* no se han reportado mediciones confiables de estos metabolitos, resulta razonable suponer que los valores deben ser

similares. Esto resulta positivo, ya que para que los sensores resulten de utilidad, las variaciones fisiológicas en los niveles de estos metabolitos deben estar incluidas en el rango dinámico de respuesta de los sensores. Sin embargo, debe notarse que el rango fisiológico constituye una porción acotada del rango dinámico de los sensores, por lo que es posible (especialmente en el caso de Pyronic) que los cambios en los niveles citosólicos de los metabolitos en condiciones normales produzcan un cambio sutil o incluso imperceptible en la señal de FRET. En el caso de OGSOR, al no ser evidente la estequiometria de la conversión en el citoplasma del DM-2-OG en 2-OG, no es posible realizar especulaciones equivalentes.

Respecto al reportero transcripcional del efecto Warburg PDHK1->eGFP, logramos identificar sub-poblaciones celulares con señal positiva de esta herramienta. Si bien el hecho de detectar heterogeneidad en la señal del reportero dentro de tejidos u órganos complejos resulta interesante, se necesitan más experimentos para entender el significado de esta observación. Actualmente estamos intentando establecer la identidad de estas sub-poblaciones celulares para intentar forzar reprogramaciones metabólicas de manera célula-específica y analizar así el fenotipo resultante de esta manipulación.

Reprogramaciones metabólicas en la respuesta integrada a estrés

La concepción moderna de la respuesta a estrés enfatiza los puntos de contacto entre los mecanismos moleculares activados por distintos elementos estresores. Surge así la idea de que la célula emplea un programa integrado de respuesta a estrés, con características particulares en cada caso que favorecen una mejor adaptación al medio estresor en cuestión (*154, 155*). La regulación metabólica constituye uno de los pilares centrales que permiten mantener la homeostasis en situaciones anómalas, por lo que identificar reprogramaciones del metabolismo energético con nuestras herramientas en tejidos de larvas sometidas a hipoxia o restricción de nutrientes constituyó una prueba de concepto adecuada para validarlas. La figura 37 resume las observaciones recopiladas en estos experimentos.

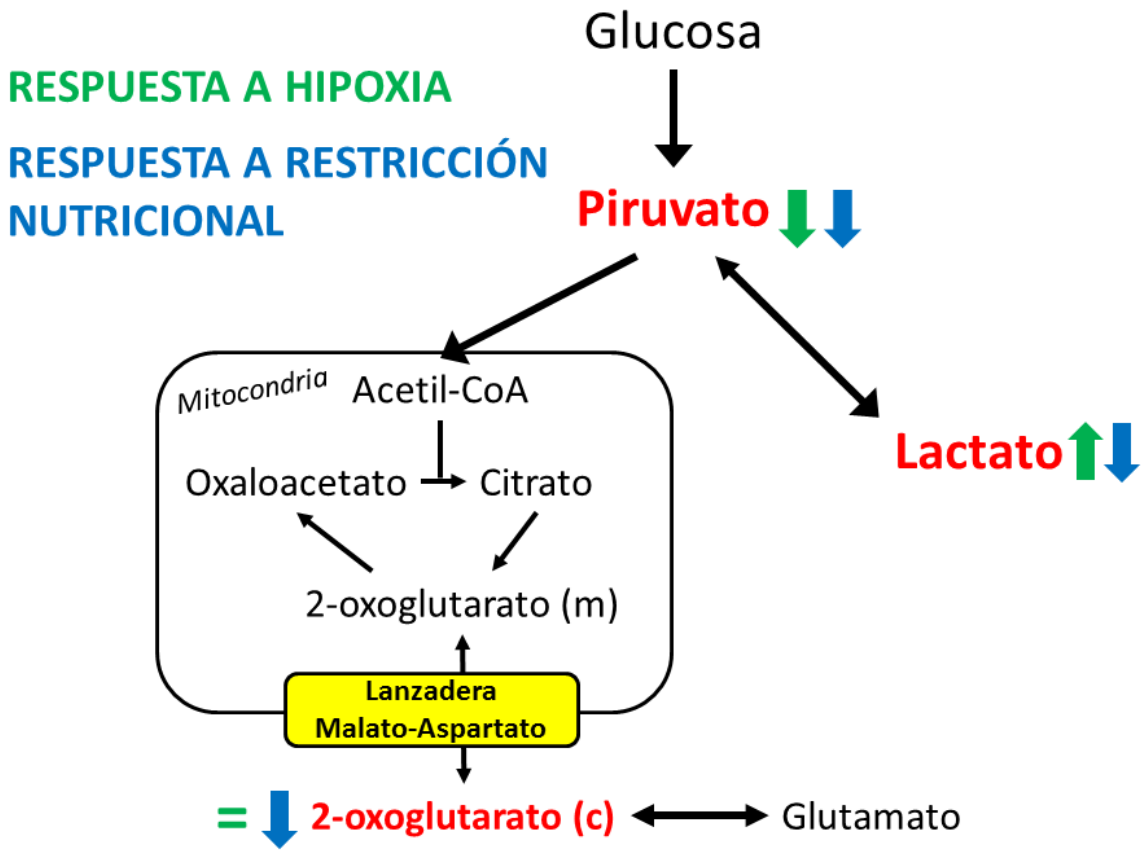


Figura 37: Alteraciones en el metabolismo energético en respuesta a diversos estresores. Resumen de los cambios detectados en los niveles citosólicos de piruvato, lactato y 2-OG empleando los sensores FRET en discos imaginales de ala, ya sea en condiciones de falta de O_2 o restricción nutricional. En el caso del 2-OG, los reservorios mitocondriales y citosólicos se identifican con una (m) o una (c) respectivamente. Los símbolos adyacentes a los metabolitos de interés (que a su vez se muestran en rojo) indican si la concentración estacionaria del mismo aumentó (↑), disminuyó (↓) o permaneció igual (=). En verde se esquematizan los resultados de hipoxia y en azul los resultados de ayuno.

El análisis de la respuesta a hipoxia constituye una buena validación de las herramientas, ya que los cambios en los niveles de metabolitos reportadas por los sensores coincide con lo esperado de acuerdo a la información bibliográfica disponible (*3, 125*). En respuesta a hipoxia se observó un aumento en los niveles de lactato, a costa del piruvato cuya concentración estacionaria disminuyó perceptiblemente. Estas variaciones en los niveles de lactato y piruvato evidencian que nuestros sensores son capaces de identificar la reprogramación metabólica hacia un perfil lactogénico característico de la respuesta a hipoxia (ver *Introducción*). El 2-OG citosólico, por otro lado, no se modificó frente a la falta de O_2. La ausencia de herramientas que permitan distinguir entre el reservorio mitocondrial y el citosólico de este metabolito impidió una caracterización previa de la manera en la cual se alteran los niveles citosólicos de

2-OG en respuesta a hipoxia, por lo que nuestra observación constituye la primera descripción reportada del fenómeno.

El análisis de la restricción nutricional resultó más complejo, ya que en las condiciones estándar de ayuno empleadas en el laboratorio los sensores no reportaron alteraciones metabólicas. Se optó, entonces, por emplear un enfoque experimental distinto, más alejado de las condiciones fisiológicas pero que aportase un mayor grado de control del sistema, incubando durante un tiempo breve discos imaginales de ala que expresan los sensores en medio Schneider (emulando la condición de alimentación normal) o PBS (emulando un ayuno absoluto). Notablemente, observamos una disminución significativa en los niveles de los tres metabolitos en los discos incubados en PBS. La interpretación de estos resultados es, en verdad, más compleja que la de las observaciones en discos provenientes de larvas en hipoxia. Sin embargo, una propuesta parsimoniosa podría contemplar el hecho de que la ausencia de cadenas de carbono provenientes del medio externo induce una disminución global del flujo metabólico, la cual se traduce en una disminución de las concentraciones en el estado estacionario de los tres metabolitos evaluados. De cualquier manera, nuestros tres sensores permitieron caracterizar la alteración metabólica que esta condición impone en los discos de ala.

Un resultado particularmente interesante fue el descubrimiento de que diferentes órganos responden de manera diferencial al entorno hipóxico. Hasta el momento, este fenómeno no había sido descripto, nuevamente debido a limitaciones en las técnicas disponibles. Empleando Laconic encontramos que mientras el disco imaginal de ala, el cerebro y el intestino medio se tornan lactogénicos en la condición de hipoxia analizada, el cuerpo graso y la glándula salival no lo hacen.

Curiosamente, mientras que la glándula salival y el cuerpo graso son tejidos politénicos que serán degradados en la metamorfosis, los discos imaginales y el cerebro no lo son, y darán origen al tejido del individuo adulto. El intestino medio, que responde a hipoxia alterando su metabolismo energético posee una combinación de células politénicas que experimentarán apoptosis en el estadío de pupa y células madre no politénicas que constituirán el intestino adulto. Resulta interesante especular con la posibilidad de que la adquisición de un perfil metabólico lactogénico por parte de los tejidos que constituirán el cuerpo del adulto, forme parte de una estrategia de

preservación de la integridad genómica. Existe una vasta evidencia que apoya la idea de que en un entorno hipóxico, la falta del O_2 que actúa como aceptor final en la cadena de transporte de electrones mitocondrial genera ROS (*156, 157*). Así, en este escenario hipotético, aquellos tejidos que darán origen al individuo adulto desvían el flujo metabólico de la mitocondria para minimizar la biosíntesis de ROS y el daño genómico asociado. En tejidos politénicos que serán degradados, preservar la integridad de la información genética no resulta prioritario, por lo que pueden seguir empleando el catabolismo mitocondrial, más eficiente, aun a riesgo de alcanzar niveles elevados de daño oxidativo.

Dentro de esta hipótesis, por lo tanto, resultaría esperable observar menores niveles de proteínas vinculadas a la reducción del estrés oxidativo en tejidos politénicos respecto a los observados en las células que darán origen a los tejidos del adulto. Al analizar la información *high-throughput* generada mediante RNA-seq que se encuentra disponible en la base de datos modENCODE (acceso a través de http://www.modencode.org/), notamos que los niveles de expresión de las superoxido dismutasas y varias peroxiredoxinas, dos familias de enzimas encargadas de la eliminación de ROS, son efectivamente mayores en disco imaginal de ala y cerebro respecto a la expresión detectada en cuerpo graso y glándula salival, lo cual apoyaría la idea de que en los tejidos no politénicos la fisiología celular controla de forma más rigurosa la cantidad de ROS (fig 38). El caso de la catalasa resulta más cuestionable, ya que los máximos niveles de expresión están reportados en el cuerpo graso. De una manera u otra, experimentos adicionales son necesarios para analizar la validez de esta propuesta.

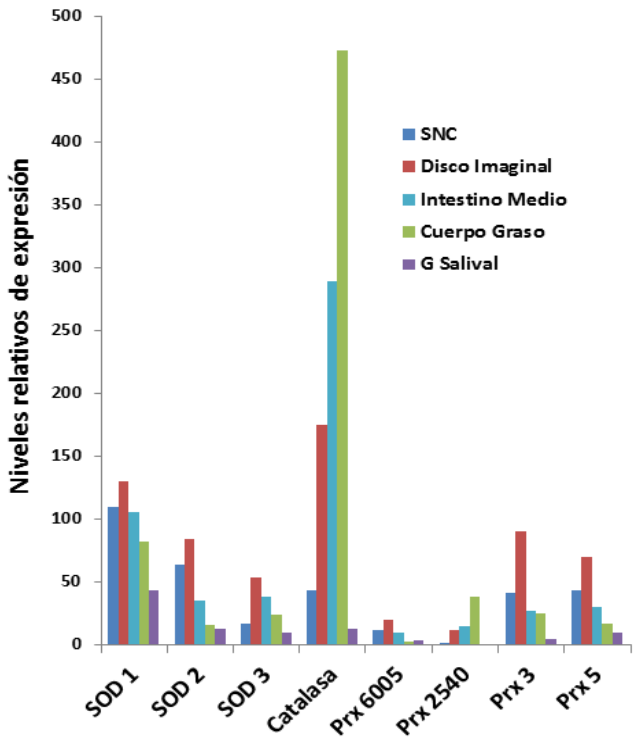


Figura 38: Niveles de expresión de diversos sistemas antioxidantes en sistema nervioso central (SNC), discos imaginales, intestino medio, cuerpo graso y glándula salival. Los valores, generados mediante RNA-seq, se obtuvieron de la base de datos modENCODE.

Manipulación genética del metabolismo

En secciones anteriores discutimos la capacidad de las células de modular la actividad metabólica en ciertas condiciones particulares (ver *Plasticidad del metabolismo energético*). Sin embargo, en ausencia de las señales regulatorias que disparan la reprogramación del metabolismo energético, el mantenimiento de la homeostasis requiere que el flujo metabólico permanezca inalterable. La mayoría de los sistemas biológicos presentan cierto grado de *robustez*, definida como la capacidad inherente de mantener una actividad "normal" en presencia de perturbaciones externas (*158*). El metabolismo, lejos de ser la excepción, constituye uno de los ejemplos clásicos de robustez biológica.

Teniendo esto presente, no resulta sorprendente que el intento de inducir alteraciones metabólicas modulando los niveles de enzimas o transportadores individuales no haya prosperado. Por el contrario, al manipular concertadamente dos elementos con elevado coeficiente de control de flujo (ej: sobrexpresión de LDH y silenciamiento de MPC) sí logramos observar una alteración en los niveles citosólicos de lactato. De esta manera, estas manipulaciones concertadas habrían saturado la robustez metabólica, observándose como consecuencia de ello un desvío del flujo catabólico hacia la producción de lactato.

Es importante destacar que no toda reprogramación metabólica podrá ser percibida por estos sensores. Solo en aquellos casos donde ocurran cambios en las concentraciones estacionarias de los metabolitos analizados (lactato, piruvato y 2-OG citosólico) estas herramientas reportarán alteraciones del metabolismo energético. Debido a la importancia relativa de estos metabolitos, y en particular del cociente lactato/piruvato, en la bioenergética celular (ver *Introducción*), resulta sensato especular con la posibilidad de que en una proporción mayoritaria de los casos las concentraciones de estos metabolitos se verán afectadas. Pero es evidente que esto no ocurrirá en todos los casos.

Si bien es cierto que esta limitación restringe las situaciones en las que los biosensores lograrán identificar reprogramaciones de la bioenergética celular, la *calidad* de los datos obtenidos al emplearlos es diferente a la de los resultados generados con métodos bioquímicos tradicionales. La posibilidad de realizar determinaciones

metabólicas mediante microscopía de fluorescencia permite recabar información de células individuales dentro del contexto de un tejido u órgano intacto, lo cual se aproxima más a las condiciones fisiológicas en las que transcurre la vida celular, y por lo tanto reflejan con mayor precisión el fenómeno biológico que se pretende estudiar. Por ejemplo, al intentar estudiar funciones de los intermediarios metabólicos en la fisiología celular es importante tener presente que los cambios en sus concentraciones intracelulares deben medirse de forma directa, y no inferirse a partir de alteraciones en los niveles de las enzimas que los producen o los consumen. En este sentido, las herramientas que hemos desarrollado resultan particularmente útiles, ya que permiten estudiar los cambios en los niveles intracelulares de ciertos metabolitos relevantes de forma directa, pero sin aislar a las células de su contexto biológico.

En el caso del lactato y del piruvato, la difusión libre a través de la membrana plasmática mediada por los MCTs podría impedir que se vean afectados sus niveles estacionarios en el citosol. Muy probablemente este fenómeno explique los cambios en la señal de Laconic observados en todo el disco imaginal de ala luego de manipular genéticamente el metabolismo de forma exclusiva en el compartimento posterior del mismo (fig 28).

El efecto Warburg y la identidad del tumor

El análisis de la señal de Laconic en tumores del disco imaginal de ala reveló que la reprogramación metabólica tumoral depende del mecanismo de transformación celular. Mientras que en tumores generados por sobre-activación de la vía Notch los niveles citosólicos de lactato parecerían ser similares a los del tejido normal, en discos donde además se silenció al gen supresor de tumores ex la concentración intracelular de este metabolito se encuentra claramente incrementada.

Si bien la bibliografía sobre el efecto Warburg es considerablemente extensa, existen pocos estudios sobre el metabolismo de tumores en discos imaginales de ala. Uno de ellos es el trabajo previamente mencionado de Slaninova y colaboradores (*136*), en el cual se reporta que al expresar en este tejido al NICD, los tumores generados activan transcripcionalmente a ciertas enzimas glucolíticas, las cuales a su vez son necesarias para el crecimiento tumoral (ver *Análisis del metabolismo tumoral*). Nuestra

observación de que en estos tumores los niveles intracelulares de lactato no se incrementan puede explicarse, tal como discutimos en la sección anterior, si se considera que este metabolito difunde libremente a través de los MCT de la membrana plasmática. De esta forma, en este contexto tumoral la alteración metabólica no alcanzaría a alterar la concentración estacionaria de lactato en el citosol. Este resultado, entonces, reclama nuevamente cautela a la hora de especular sobre las concentraciones de metabolitos cuando se identifican reprogramaciones metabólicas con metodologías más tradicionales.

La dependencia del efecto Warburg con el tipo de tumor en discos de ala fue explorada, con otras técnicas, en un trabajo previo (*159*). En este reporte, los autores analizan la expresión de LDH en discos de ala tumorales generados mediante la expresión en forma individual de versiones constitutivamente activas de EGFR, PVR, InR o Ras, o al sobre-expresar *wingless*, *unpaired* o *yorkie* (yki). Notablemente, la activación transcripcional de LDH solo es detectada en los tumores producidos por sobre-expresión de yki, o por la expresión de formas constitutivamente activas de Ras o PVR. El coactivador transcripcional yki, que pertenece a la vía Hippo, promueve la proliferación, supervivencia y migración celular. La vía Hippo constituye uno de los principales mecanismos del organismo para limitar el tamaño del tejido, por lo que cuando la vía está activa yki se encuentra inhibido (*145*). En este sentido, este resultado es consistente con nuestra observación de que los tumores obtenidos al sobre-expresar Dl en simultáneo con el silenciamiento de ex, activador de la vía Hippo, poseen mayores niveles de lactato citosólico que el tejido normal. Es tentador especular, por lo tanto, con la posibilidad de que el silenciamiento de ex contribuya a través de yki al aumento en los niveles de LDH, ya incrementados como consecuencia de la activación de la vía Notch (*136*). Así, la producción exacerbada de lactato en estos tumores saturaría la capacidad de los MCTs de disipar los elevados niveles citosólicos de este metabolito, aumentando su concentración estacionaria. De todas formas, se necesitan más experimentos para corroborar el rol del eje ex-yki-LDH en este contexto.

Un tercer análisis que se ha publicado sobre el metabolismo tumoral en discos de ala resulta particularmente informativo. En este trabajo (*135*), Eichenlaub y colaboradores analizan el metabolismo de tumores generados al sobre-expresar EGFR. En contextos clínicos el término *neoplasia* suele emplearse en referencia tanto a tumores benignos

que conservan la arquitectura tisular como a tumores malignos, altamente invasivos, formados por células que han perdido la polaridad apico-basal y crecen descontroladamente en tres dimensiones (*139*). En el campo de la biología tumoral de *Drosophila*, por otro lado, neoplasia se utiliza exclusivamente para referirse a este último caso, mientras que el crecimiento desregulado de células que mantienen su polaridad apico-basal intacta y que por lo tanto no altera la arquitectura básica del tejido se denomina hiperplasia (*139*). Si bien los tumores producidos al sobre-expresar EGFR en discos de ala son hiperplásicos, trabajos previos del mismo grupo demuestran que al combinar esta manipulación con el silenciamiento de *pipsqueak*, un regulador de la cromatina, los mismos se tornan neoplásicos (*160*). Eichenlaub y colaboradores compararon el perfil transcripcional de ambos tipos tumorales, hiperpásicos vs neoplásicos, y encontraron que en estos últimos la expresión de varios genes glucolíticos, en particular LDH, se encuentra incrementada (*135*). Curiosamente, la adquisición de un perfil metabólico glucolítico resulta esencial en este contexto para la adquisición de los fenotipos neoplásicos, como la pérdida de la polaridad celular o la desorganización de la arquitectura tisular. Sin embargo, los autores aún no han logrado discernir si el vínculo entre la reprogramación metabólica y la neoplasia es exclusivo de este tipo de tumores generados por sobre-expresión de EGFR o es una característica general de la biología tumoral.

En el caso de nuestros tumores lactogénicos, todavía no hemos estudiado si constituyen tumores neoplásicos o se trata de crecimientos hiperplásicos. La activación de la vía Notch y el silenciamiento de la vía Hippo, en forma individual, generan tumores hiperplásicos (*136, 146*). No obstante es posible que la alteración concertada de ambas vías conduzca a la adquisición de fenotipos neoplásicos. Por otro lado, además del rol que cumple regulando la vía Hippo, ex modula la distribución apical de f-actina de manera independiente de yki en discos de ala (*146*). De esta manera, resulta razonable especular que estos tumores presentan una polaridad ápico-basal alterada.

Heterogeneidades intercelulares en los niveles de lactato

Al analizar la señal de Laconic en contextos de diferenciación celular ampliamente estudiados de la larva de *Drosophila*, no logamos identificar niveles de lactato

diferenciales entre progenitores en proliferación y células terminalmente diferenciadas (Figs U y V). Tal como se discutió en las secciones anteriores, no es posible descartar que reprogramaciones del metabolismo energético estén, efectivamente, ocurriendo en estos modelos, y que al no alterar la concentración estacionaria de lactato en el citosol resulten imperceptibles para Laconic.

Resulta interesante, teniendo presente la consideración anterior, el haber encontrado en el cordón nervioso ventral de larvas del 3er estadío una sub-población de células oligolácticas, con menor concentración de lactato en el citosol respecto a la del resto del tejido nervioso del cual forman parte (Fig W). La existencia de una dinámica especial del lactato en el sistema nervioso central ya ha sido descripta con detalle en vertebrados, donde la actividad glucolítica de los astrocitos provee a las neuronas de lactato, el cual es empleado como principal fuente de carbono por este tipo celular (ver *lanzadera de lactato* en Introducción). En *Drosophila*, por otro lado, las particularidades metabólicas del cerebro recién están comenzando a ser exploradas. Volkenhoff y colaboradores (*149*) propusieron recientemente que las células de la glía sub-perineural, que forma parte de una estructura análoga a la barrera hematoencefálica de vertebrados, captan trehalosa de la hemolinfa (disacárido que constituye la principal fuente de glucosa para los tejidos de *Drosophila*) y liberan lactato al medio extracelular, el cual es empleado por las neuronas como fuente de carbono. Esta conclusión es producto de experimentos genéticos, donde los autores detectan que el silenciamiento de enzimas glucolíticas en estas células gliales conduce a la apoptosis neuronal, mientras que las mismas manipulaciones en neuronas no producen ningún fenotipo apreciable. Es cierto que los autores disgregan, además, el cerebro larval, y luego de separar a los distintos tipos celulares mediante citometría de flujo detectan una producción de lactato exacerbada en la glia sub-perineural, pero la falta de herramientas adecuadas les impidió realizar análisis metabólicos del tejido intacto.

En un trabajo más reciente (*161*), los mismos autores emplearon un sensor FRET de glucosa codificado genéticamente, similar a los desarrollados en esta tesis, y detectaron aumentos en la concentración citosólica de glucosa en neuronas de cerebros incubados en un medio con trehalosa como única fuente de carbono. Esta observación pone en evidencia que la dinámica metabólica de este órgano es

considerablemente más compleja que lo sugerido por los experimentos genéticos y en cultivo del trabajo previo, resaltando la importancia del enfoque experimental que nuestras herramientas habilitan. Al día de hoy, la función exacta del metabolismo energético en el sistema nervioso central de *Drosophila* no se comprende cabalmente.

Nuestra identificación de células oligolácticas en el cerebro larval torna particularmente interesante el estudio de los MCTs en este órgano. En vertebrados existen cuatro genes que codifican para estos transportadores, identificados como MCT1 al MCT4 (*162*). En *Drosophila*, por otro lado, existen 15 genes que poseen cierto grado de homología de secuencia con la familia a la cual pertenecen estos transportadores, sin embargo solo uno de ellos ha sido estudiado en detalle, Chaski (Chk, CG3409), encontrando que efectivamente actúa como transportador de lactato y piruvato(*163*). Al igual que en el trabajo de Volkenhoff et al (*149*), en este trabajo las conclusiones se obtienen a partir de experimentos genéticos y en cultivos celulares, sin realizar análisis metabólicos del órgano intacto. Por otro lado, los autores describen que Chk se expresa en el cerebro larval, tanto en neuronas como en células gliales. Diversos alelos mutantes de Chk son viables en homocigosis y no presentan alteraciones anatómicas del cerebro larval y adulto. Sin embargo, en los mutantes la transmisión sináptica se encuentra comprometida, y los individuos adultos poseen fenotipos comportamentales alterados. Varios de los 14 genes restantes con cierto grado de homología a la familia de transportadores de vertebrados se expresan en el sistema nervioso central, por lo que la dinámica del lactato en este órgano aparenta no ser trivial. No cabe duda que trabajos futuros podrán aprovechar el desarrollo de Laconic llevado a cabo en este trabajo de tesis para echar más luz sobre este fenómeno.

Experimentos pendientes y perspectivas a futuro

Habiendo caracterizado el comportamiento de las herramientas desarrolladas, nuestros esfuerzos futuros se centrarán en aplicarlas al estudio metabólico del desarrollo de *Drosophila*. La utilidad de los biosensores FRET para analizar metabólicamente el desarrollo larval se vería multiplicada si fuese posible trabajar con

ellos sin disecar los órganos a estudiar, obteniendo las imágenes de larvas vivas a través de la cutícula. Con este fin, emplearemos un sistema de *microscopía de iluminación selectiva de plano* (SPIM, por sus siglas en inglés), en el cual los especímenes son iluminados en un solo plano a través de un haz de luz con forma de lámina, generado mediante una lente cilíndrica (*164*). Este arreglo provee un seccionamiento óptico tridimensional, reduciendo al mínimo la carga energética sobre la muestra irradiada, lo cual reduce considerablemente la fotoinactivación de los fluorocromos. Además, estos sistemas permiten alcanzar una profundidad de penetración de la luz en la muestra considerablemente elevada, junto con un tiempo de escaneado muy reducido, lo cual los torna particularmente adecuados para trabajar con especímenes intactos (*165*). La combinación de un sistema SPIM con sensores FRET ya ha producido resultados relevantes en *Arabidopsis thaliana* (*166*).

El mismo sistema podrá ser aplicado al estudio de la embriogénesis de *Drosophila*. Al comenzar a explorar las posibilidades de uso de estos sensores, realizamos algunas observaciones preliminares en embriones, pero los elevados niveles de autofluorescencia del vitelo y otras estructuras embrionarias nos condujeron a optar por los tejidos larvales para llevar a cabo la caracterización inicial de las herramientas. Empleando el protocolo desarrollado en este trabajo de tesis, probablemente logremos realizar observaciones relevantes del metabolismo embrionario de esta especie.

Surge así la posibilidad de encarar un programa de investigación de los aspectos metabólicos del desarrollo de *Drosophila*, en base a los pasos esquematizados en la figura 39. En primer lugar, se utilizarán las herramientas desarrolladas para analizar el metabolismo del desarrollo embrionario y larval. Este análisis, probablemente, permita identificar sub-poblaciones celulares o regiones de tejidos y/u órganos con perfiles metabólicos diferenciales, evidenciando instancias de regulación metabólica intercelular. Luego de identificar a los tipos celulares involucrados, se intentará forzar genéticamente reprogramaciones metabólicas, a través de estrategias similares a las empleadas en la figura 28. Por último, analizaremos el impacto que estas manipulaciones generan sobre la ontogenia, lo cual permitirá elucidar con técnicas mínimamente invasivas las funciones que cumplen las regulaciones metabólicas en el desarrollo de *Drosophila.*

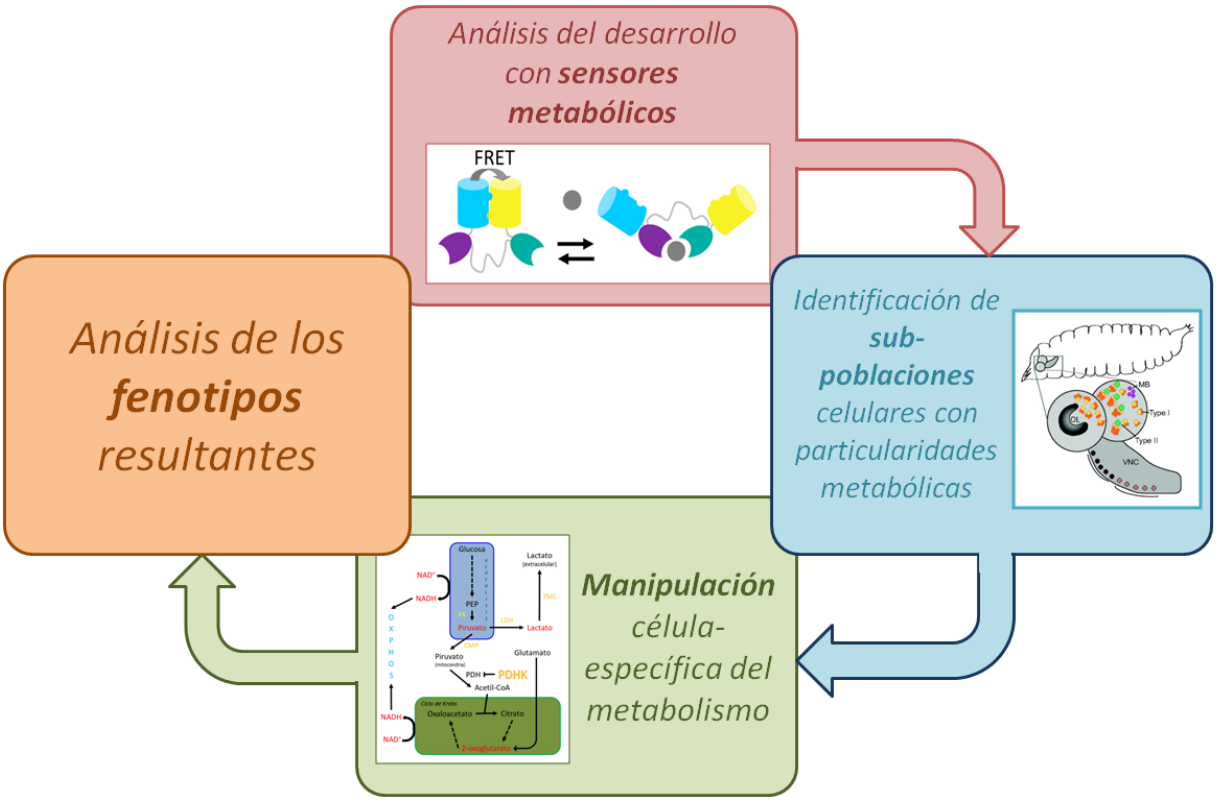
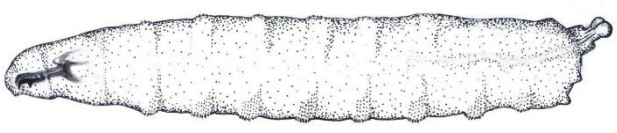


Figura 39: Esquema del trabajo destinado a definir aspectos metabólicos de la ontogenia utilizando las herramientas desarrolladas en esta tesis. El análisis metabólico del desarrollo embrionario y larval permitirá identificar reprogramaciones del metabolismo energético. Al alterar genéticamente estas reprogramaciones podremos elucidar la función que cumplen en el desarrollo de *Drosophila*.

Materiales y Métodos



Trabajo con *Drosophila*

1. Mantenimiento de líneas de Drosophila

Las líneas isogénicas de *Drosophila melanogaster* que se emplearon en esta tesis fueron mantenidas en viales de vidrio, de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de alto. Estos viales contienen alimento estándar compuesto por harina de maíz 8,25%, levadura 2%, sacarosa 3% y agar-agar 1,5%, suplementado con el anti-fúngico Nipagin (1.19 g/l) y ácido propiónico (4,36 g/l). Los viales se mantuvieron a 18ºC para retrasar la progresión del ciclo de vida y facilitar el mantenimiento de la colección de líneas.

Al momento de trabajar con determinada línea, los adultos fueron traspasados a botellas plásticas de 250 ml buscando aumentar la cantidad de individuos en la siguiente generación. Estas botellas se mantuvieron a 25ºC, a menos que el experimento particular requiriera condiciones diferentes. Nuestro laboratorio cuenta con incubadoras que regulan la temperatura del entorno y permiten, por lo tanto, mantener las líneas a las temperaturas indicadas.

2. Genética de moscas y selección de larvas

Para combinar diversos elementos genéticos de interés en la misma mosca, es necesario cruzar individuos de distintos genotipos. Esto se logra aislando hembras vírgenes que poseen determinada constitución genética, las cuales luego se ponen en contacto con machos del genotipo complementario. La selección se realiza bajo lupa binocular, sobre una plataforma de material poroso gaseada continuamente con CO_2. Así, las moscas se mantienen anestesiadas permitiendo identificar su sexo y discriminar su genotipo a través de la utilización de marcadores fenotípicos. En cada cruzamiento se utilizaron 30 hembras vírgenes por vial y aproximadamente la mitad de machos. Estos viales, conteniendo alimentos estándar, fueron mantenidos a 25ºC durante 2 o 3 días antes de desplazar a los adultos a un nuevo vial.

La mayoría de los experimentos se realizaron analizando directamente a los descendientes de una cruza entre dos líneas isogénicas (generación filial 1, F1). En estos casos, las larvas con el genotipo de interés fueron seleccionadas por ausencia de

marcadores fenotípicos fluorescentes, presentes en **cromosomas balanceadores**. Los cromosomas balanceadores son herramientas que otorgan una gran plasticidad genética a *Drosophila*, contribuyendo a su establecimiento como organismo modelo (*92*). Estos cromosomas contienen múltiples inversiones en ambos brazos, por lo que presentan una baja probabilidad de recombinación con sus homólogos. En simultáneo, los cromosomas balanceadores cuentan con mutaciones dominantes o transgenes fluorescentes, que revelan su presencia en el genoma del individuo a través del análisis del fenotipo de la larva o el adulto. Así, ambas características permiten identificar la presencia de elementos de interés sin fenotipo evidente a través de la ausencia de los marcadores fenotípicos del balanceador homólogo. Además, las mutaciones en estos cromosomas son letales en homocigosis, de manera que posibilitan mantener mutaciones recesivas en el fondo genético de una línea isogénica sin necesidad de seleccionar a favor de la misma en cada generación.

Para poder identificar larvas en el 1er estadío, los cruzamientos fueron colocados en vasos plásticos de 200 ml con pequeños orificios que permiten el intercambio gaseoso con el ambiente, cubiertos por *placas de ovipuesta*. Estas placas contienen un medio sólido compuesto por agar-agar 2%, sacarosa 3% y Nipagin, en el cual las hembras son capaces de depositar los huevos fecundados. Dado que el medio carece de aminoácidos, las placas fueron suplementadas con una pasta de levadura de la cual los progenitores se alimentan, estimulando la ovipuesta. Entre 8 y 16 hs después, las placas se reemplazaron por placas frescas. Las placas retiradas fueron incubadas a 25ºC durante 24 hs, hasta que se completa la embriogénesis y ocurre la eclosión. Las larvas del 1er estadío que carecen del marcador fluorescente propio de los cromosomas balanceadores empleados en esta tesis fueron seleccionadas a través de una lupa binocular de fluorescencia Olympus MVX10. Luego, estas larvas se transfirieron a viales o botellas con alimento estándar, a razón de 30 larvas por vial, y se incubaron a 25ºC (o a la temperatura que el experimento requiera) hasta el momento de la disección.

3. Sistema de expresión génica controlada Gal4/UAS

El **sistema Gal4/UAS** constituye el principal mecanismo que permite controlar de manera artificial la expresión génica, tanto espacial como temporalmente, en *Drosophila* (*92*). En su versión más sencilla, el sistema consta de dos elementos: el factor de transcripción Gal4 y el promotor UAS (*upstream activation sequence*). Gal4 es un factor de transcripción de levaduras, vinculado al metabolismo de la galactosa, y no posee ortólogos en insectos, de forma que no regula la transcripción de genes endógenos de *Drosophila*. Existen colecciones de líneas isogénicas de *Drosophila*, de acceso público, que expresan Gal4 bajo el control de una plétora de promotores diferentes. De esta manera, estas líneas permiten expresar Gal4 con resolución tejido-específica o incluso célula-específica. El promotor UAS, por otro lado, es una secuencia artificial que responde a Gal4. Junto con las colecciones de expresión de Gal4, existen líneas isogénicas donde un gen determinado se encuentra río abajo del promotor UAS. De esta manera, al cruzar una línea que expresa Gal4 con un patrón de expresión determinado, con otra línea que posee al gen de interés bajo el control de UAS, se obtendrá una progenie donde el gen de interés se expresa con el patrón deseado (Fig 40). Los elementos clonados río abajo del promotor UAS pueden ser de variada naturaleza, incluyendo genes de *Drosophila* o de otra especie, ARNs de interferencia (ARNi), citotoxinas o construcciones artificiales como reporteros y sensores.

Un nivel adicional de complejidad puede conseguirse al añadir el elemento Gal80. Esta proteína, también proveniente de levaduras y ausente en *Drosophila*, se une al dominio de activación de Gal4, bloqueando su capacidad de activar la transcripción (*167*). De esta manera, combinando los tres elementos, es posible refinar aún más el patrón de expresión del gen de interés, limitando la región donde el promotor UAS efectivamente se activa. La proteína Gal80, además, ha sido modificada para generar una variante termosensible que se inactiva a 29°C (Gal80TS). En los casos donde esta variante esté presente, al mantener a los animales a 18°C, Gal80TS se encuentra inhibiendo al sistema Gal4/UAS y por lo tanto el gen de interés no se expresará, mientras que al aumentar la temperatura a 29°C, el Gal80TS se inactiva permitiendo la activación transcripcional mediada por Gal4. Así, este sistema permite controlar la

expresión (activación o inhibición mediada por ARNi) de cierto gen de interés, no solo espacialmente sino también en el tiempo.

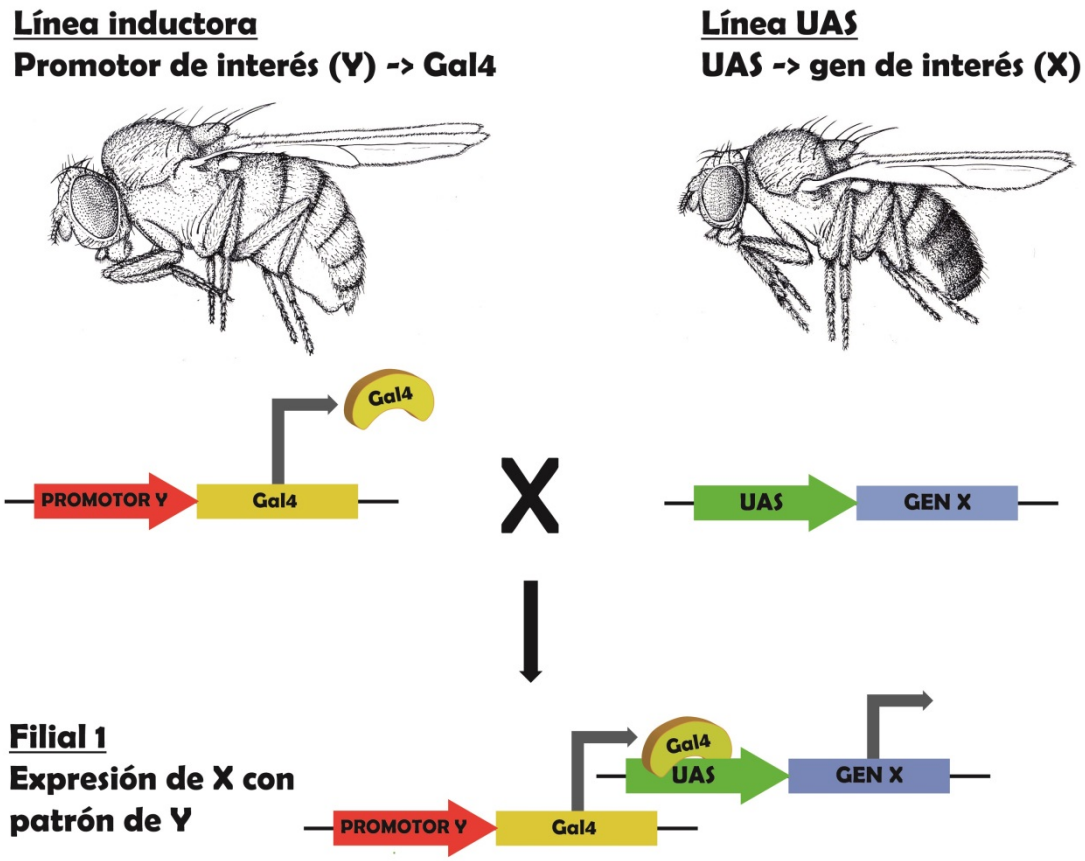


Figura 40: Esquema del sistema Gal4/UAS. Una línea parental expresa el factor de transcripción Gal4 bajo el control del promotor Y (*línea inductora*), mientras que la otra línea parental posee al gen de interés X bajo el control del promotor UAS (*línea UAS*). En la descendencia, por lo tanto, el gen X se expresará con el patrón espacio-temporal característico del promotor Y. Ilustraciones en tinta realizadas por Ayelén Valko.

4. Líneas obtenidas de repositorios o de laboratorios colaboradores

Tal como describimos en la sección anterior, existen repositorios públicos que proveen diversas líneas isogénicas necesarias para manipular la expresión génica a través del sistema Gal4/UAS. Las siguientes líneas, empleadas en este trabajo de tesis, fueron obtenidas del *Vienna Drosophila Research Center* (https://stockcenter.vdrc.at/): 106773, 4607, 102317 y 9163 (ARNi's contra MCTs), 37968 y 37966 (ARNi's contra PDHK), 15858 y 103829 (ARNi's contra MPC), 110190 y 31192 (ARNi's contra LDH) y

49533 (ARNi contra PK). La línea UAS-LDH se obtuvo del *Zurich ORFeome Project* (https://flyorf.ch/).

La línea UAS-NICD (52008), las líneas inductoras tub-Gal4 (5138) y en-Gal4 (1973), así como el ARNi contra Glut1 (40904) y contra white (33613), se obtuvieron del *Bloomington Drosophila Stock Center* (https://bdsc.indiana.edu/). De este repositorio se adquirieron, además, dos líneas con sitios attP en las posiciones 58A (cromosoma 2, línea 24484) y 86Fb (cromosoma 3, línea 24749), que además expresan a la integrasa ΦC31 bajo el control de promotor de la línea germinal Vasa. Estas líneas fueron utilizadas para realizar transgénesis sitio dirigida.

La línea ubi-GFP:ODD, ubi-RFP que expresa el reportero de la actividad de Fga fue donada gentilmente por Stefan Luschnig.

La línea UAS-Dl, UAS-ARNi exp, que permite manipular de forma simultánea la vía Notch y la vía Hippo, fue generosamente compartida por Andrés Garelli.

5. Generación de nuevas líneas – transgénesis

La generación de moscas transgénicas se llevó a cabo utilizando una estrategia sitio-dirigida, a través de recombinaciones mediadas por la Integrasa ΦC31. Esta enzima, expresada en la línea germinal de las líneas inyectadas, reconoce a los sitios attP presentes en estas líneas en posiciones definidas del genoma y a los sitios attB en el plásmido inyectado, catalizando la recombinación entre ambas secuencias (Fig 41.A).

El ADN plasmídico, disuelto en H_2O a pH=8 a una concentración de 1 µg/µl, se diluyó al medio en un buffer de inyección con la siguiente composición: K_2HPO_4 1 mM, KH_2PO_4 1 mM, KCl 5 mM pH=7,8. Esta nueva solución se incubó a 37ºC durante 15 min, y luego se centrifugó a 10000g durante 15 min a 4ºC. El sobrenadante fue inyectado en los embriones.

La inyección se realizó en embriones tempranos, antes del estadío 5 donde el blastodermo se celulariza (*168*). La aguja se generó a partir de un capilar de vidrio Narishige GD-1, el cual fue estirado empleando un *puller* automático PC-10 de la misma compañía (http://narishige-group.com/) y luego la solución de ADN plasmídico se introdujo en la aguja por la parte posterior de la misma empleando tips GELoader de Eppendorf (#0030001222). Una vez cargada, la aguja fue colocada en un

microinyector PLI-100A de Harvard Apparatus (https://www.harvardapparatus.com/) acoplado a un microscopio Olympus BH.

Los embriones del estadío adecuado, recolectados en ovipuestas cortas de no más de 30 min, fueron ordenados sobre una placa de agar bajo una lupa binocular, transferidos a un cubreobjetos de vidrio con cinta doble-faz y luego cubiertos con aceite halocarbonado de SIGMA (#H8898). Este aceite transparenta el corion, permitiendo inyectar a los embriones sin decorionarlos previamente. La solución de ADN fue inyectada en el *espacio perivitelino*, que separa a la membrana vitelina del corion, tal como ilustra la figura 41.B, a 18ºC. La configuración del microinyector (tiempo y presión de inyección) se modificó al trabajar con distintas agujas, con el fin de obtener el volumen óptimo de solución inyectada en cada caso.

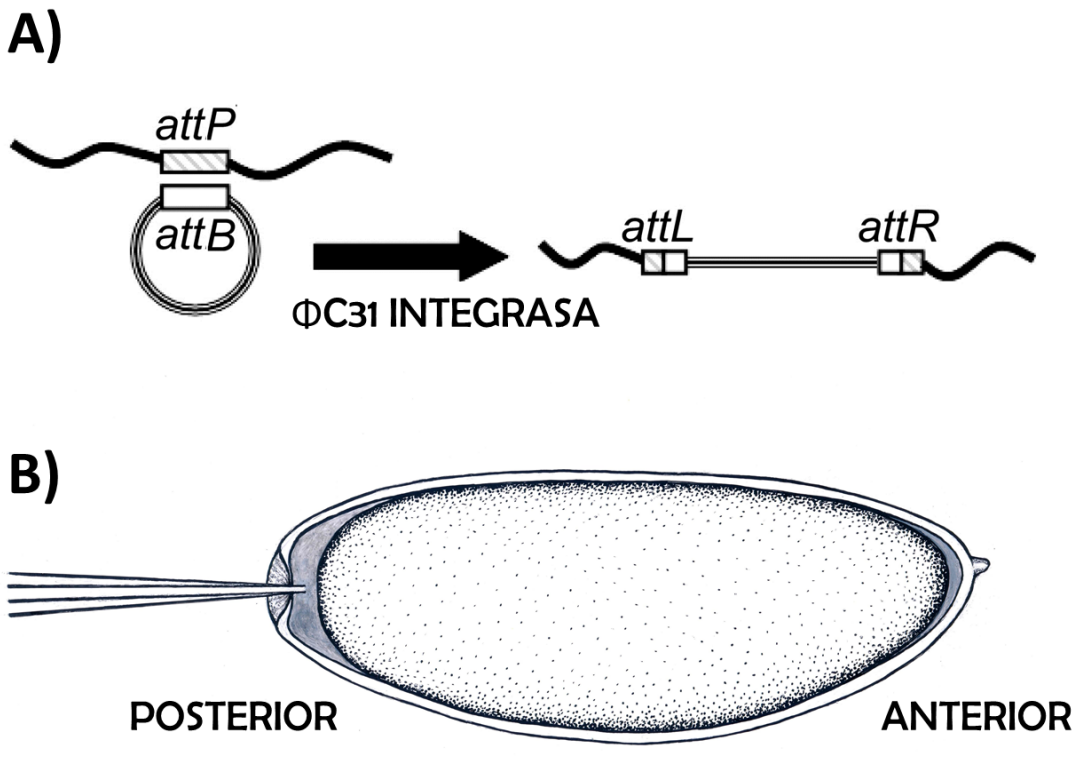


Figura 41: Transgénesis sitio-dirigida en embriones de *Drosophila*. A) Esquema que ilustra el funcionamiento de la ΦC31 Integrasa, enzima que reconoce los sitios attP presentes en una posición definida del genoma de la línea inyectada y los sitios attB en el plásmido utilizado. De esta forma, la enzima cataliza la recombinación entre las dos secuencias, integrando el plásmido al genoma. B) Esquema de la posición de la aguja en el espacio perivitelino al momento de la inyección. Ilustración en tinta de Ayelén Valko.

Una vez inyectados, los embriones fueron transferidos en el mismo cubreobjetos a un vial con alimento estándar, el cual se incubó a 25ºC hasta que emergieron los individuos adultos. Dado que la incorporación del transgén ocurrió en la línea

germinal, debido a la expresión localizada de la integrasa, sólo se observarán moscas que posean copias del transgén en todo su genoma en la descendencia de los individuos inyectados. Por este motivo los adultos se cruzaron con líneas que portan al cromosoma balanceador homólogo al que posee el sitio de inserción del transgén en la línea inyectada. La F1 de este cruzamiento fue analizada en busca de individuos de ojos rojos, lo cual evidenciaría la incorporación del plásmido que contiene al gen de interés. Seguidamente, cada adulto de ojos rojos fue utilizado para establecer una línea isogénica independiente. Empleando este protocolo se obtuvo una eficiencia de transgénesis de aproximadamente 10%, dependiendo de la línea inyectada y del tamaño del plásmido utilizado. Se generaron así las líneas descriptas en la tabla 3.

Línea	Genotipo	Descripción de la línea
Tub-Laconic	;M{3xP3-RFP}ZH-58A, Tub-Laconic;	Expresión de Laconic bajo el control del promotor de Tubulina
UAS-Laconic	;M{3xP3-RFP}ZH-58A, UAS-Laconic;	Expresión de Laconic bajo el control del promotor UAS
UAS-Pyronic	;M{3xP3-RFP}ZH-58A, UAS-Pyronic;	Expresión de Pyronic bajo el control del promotor UAS
UAS-OGSOR	;M{3xP3-RFP}ZH-58A, UAS-OGSOR;	Expresión de OGSOR bajo el control del promotor UAS
PDHK1->eGFP	;;M{3xP3-RFP}ZH-86Fb, PDHK1->eGFP	Reportero transcripcional del efecto Warburg PDHK1->eGFP
UAS-PDHK	;;M{3xP3-RFP}ZH-86Fb, UAS-PDHK	Expresión de PDHK bajo el control del promotor UAS

Tabla 3: Líneas isogénicas generadas mediante transgénesis sitio-específica en esta tesis. La tabla indica el genotipo detallado de cada una de estas líneas.

6. Generación de nuevas líneas – recombinación

Para manipular genéticamente el metabolismo en un contexto de expresión ubicua de Laconic, fue necesario generar la línea isogénica En-Gal4, Tub-lac. Dado que ambos

elementos están presentes en el cromosoma 2, la combinación de ambos en el mismo cromosoma se logró mediante recombinación meiótica. En *Drosophila*, la recombinación meiótica ocurre solamente en las gametas femeninas, por lo que fue necesario generar en primera instancia hembras transheterocigotas para los elementos de interés. Estas hembras fueron luego cruzadas con machos que portan un cromosoma 2 balanceador, en particular CyO, seleccionando en la descendencia de estas cruzas individuos recombinantes. En general, los elementos transponibles están asociados a los mini-genes rosy^{+} o white^{+}, de forma que la presencia de estos elementos puede identificarse por el color de ojos de los individuos portadores. En muchos casos, incluyendo la generación de la línea En-Gal4, Tub-lac, la presencia de ambos elementos puede ser identificada por el color de ojos resultante de la combinación de ambos elementos. De esta manera, en la progenie de la cruza anterior se identificaron individuos recombinantes los cuales fueron a su vez cruzados nuevamente por moscas CyO. Dado que la recombinación meiótica ocurre en una posición relativamente aleatoria del cromosoma, cada individuo recombinante porta un cromosoma 2 único. Debido a esto, los individuos recombinantes fueron cruzados individualmente con la línea CyO. A partir de los descendientes de estas cruzas sí fue posible establecer líneas isogénicas, obteniéndose así tantas líneas como individuos recombinantes se identificaron previamente. Las siguientes líneas, que permiten manipular enzimas y transportadores vinculados al metabolismo energético en forma simultánea, también fueron generadas mediante recombinación meiótica: UAS- LDH, UAS- ARNi MPC / UAS-PDHK, UAS- ARNi MPC / UAS-ARNi Glut1, UAS- ARNi LDH

Clonado de las herramientas

Para generar las líneas que expresan genes de interés bajo el control del promotor UAS, los distintos elementos se clonaron en el vector de expresión pUASt.attB. Este plásmido posee sitios attB que le permiten integrarse al genoma de los embriones inyectados en presencia de la integrasa ΦC31. En primer lugar la secuencia de Laconic o Pyronic fue subclonada en el vector pBluescript SK- a partir de los plásmidos provistos por el grupo que construyó las herramientas originales (pcDNA3.1; (*109, 110*)). Al colocar las secuencias que codifican para estos sensores en el plásmido

pBluescript aumentamos la disponibilidad de sitios de restricción al momento de realizar el subclonado en pUASt.attB. Este primer subclonado se realizó utilizando las enzimas NotI y HindIII. Finalmente, a partir de las construcciones pBluescript-Laconic y pBluescript-Pyronic, ambos sensores fueron subclonados direccionalmente en el vector de expresión utilizando las enzimas XhoI y XbaI (Fig 42.A)

La secuencia de Laconic, además, se clonó en el plásmido pss193, bajo el control del promotor de Tubulina, donado gentilmente por Julieta Acevedo. Para generar esta construcción, Tub-Laconic, se utilizó como fuente de la secuencia de Laconic el plásmido pUASt.attB-Laconic generado previamente. Las enzimas BamHI y BglII generan extremos que son cohesivos entre sí. De esta manera, el subclonado en el plásmido pss193 se realizó digiriendo la construcción pUASt.attB-Laconic con BglII y XbaI, mientras que el vector de destino (pss193) fue digerido con BamHI y XbaI. Cabe aclarar que esta estrategia inutiliza el sitio BamHI/BglII en la construcción final, ya que genera una secuencia híbrida que por lo tanto no es reconocida por ninguna de las dos enzimas de restricción (Fig 42.E)

La secuencia codificante de OGSOR fue obtenida del plásmido pET-28a-OGSOR, vector de expresión en *E. coli*. Nuevamente, el subclonado en el vector pUASt.attB se realizó aprovechando la compatibilidad de los extremos generados por las enzimas BamHI y BglII. De esta forma, la construcción pET-28a-OGSOR se digirió con BamHI y NotI, mientras que el vector de destino (pUASt.attB) fue digerido con BglII y NotI (Fig 42.B)

El marco de lectura abierto del gen PDHK utilizado para generar la construcción UAS-PDHK se obtuvo del *Drosophila* Genomics Resource Center (https://dgrc.bio.indiana.edu; #BS06809). Al igual que en los casos anteriores, la secuencia de interés se subclonó desde el plásmido original (pDNR-DUAL), en el vector pUASt.attB, utilizando las enzimas NotI y XbaI (Fig 42.C)

Por último, el reportero transcripcional PDHK1->eGFP se generó clonando la secuencia regulatoria (1334 pb río arriba de la secuencia codificante) de PDHK1 de mamíferos río arriba de eGFP. Esta secuencia regulatoria se obtuvo a partir del plásmido pHAGE2-PDHK1->mCherry donado por Raul Mostoslavsky. El subclonado en el plásmido peGFP.attB, compatible con el sistema de transgénesis sitio-dirigida empleada en esta tesis, se realizó utilizando las enzimas AgeI y NotI (Fig 42.D)

Mientras que las secuencias de Laconic y Pyronic se encuentran publicadas, la identidad exacta del dominio de unión a 2-OG de OGSOR no ha sido reportada previamente. La misma, por lo tanto, se encuentra en el Anexo de esta tesis. Asimismo, el Anexo contiene las secuencias de PDHK utilizada para generar la línea UAS-PDHK, así como la región regulatoria de PDHK1 empleada para construir el reportero transcripcional.

Tratamiento de hipoxia

1. Incubación en hipoxia

Los ensayos en hipoxia se llevaron a cabo utilizando incubadoras *Forma Series II* de Thermo Scientific, que permiten regular los niveles relativos de oxígeno en el ambiente. Las larvas sometidas a hipoxia fueron incubadas en un ambiente con la presión parcial de O_2 indicada en cada experimento, a 25ºC durante 16 hs.

2. Determinación bioquímica de los niveles de lactato

La determinación de la concentración de lactato en homogenatos de larvas se realizó utilizando el kit *Lactate* de Wiener Lab. (#1999795). El kit permite determinar enzimáticamente la presencia de lactato en solución a través de la acción acoplada de la lactato oxidasa y la peroxidasa de rábano picante, provistas en el mismo. La primera enzima convierte al lactato en piruvato, produciendo en el proceso H_2O_2. En presencia de H_2O_2, la peroxidasa oxida a un reactivo sintético, TOOS, originando un producto coloreado. La aparición del producto coloreada fue monitoreada en un lector ELISA a 510 nm y 595 nm.

En cada experimento se procesaron 30 larvas del 3er estadío, provenientes de un ambiente normóxico o hipóxico. Las larvas fueron lavadas con PBS para remover restos de alimento, y luego se homogeneizaron en 100 µl de PBS frío utilizando un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem con interfaz vidrio-teflón. El producto resultante fue calentado a 70ºC durante 10 min y luego centrifugado a 10000g durante 3 min. El lactato se determinó en el sobrenadante así obtenido.

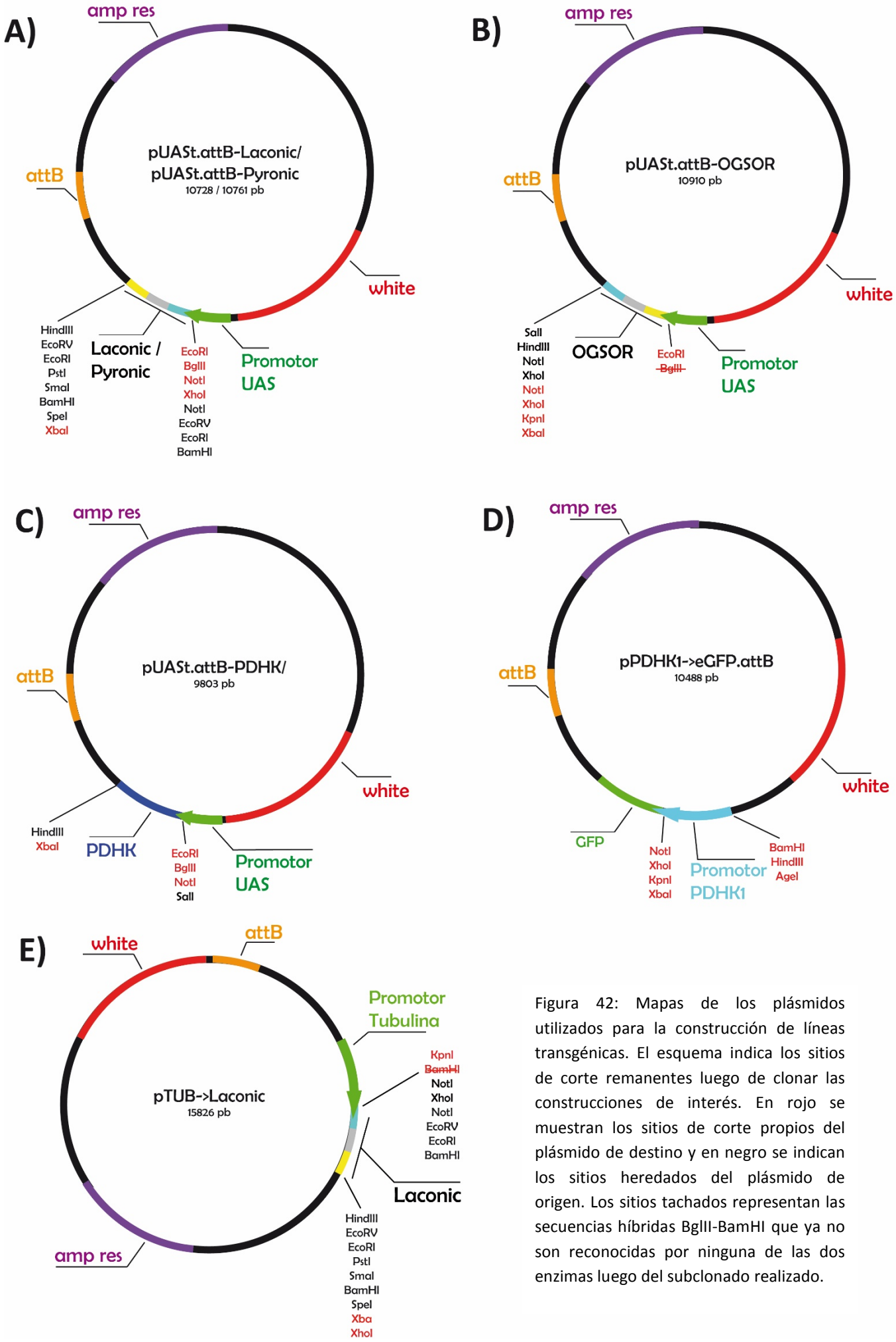


Figura 42: Mapas de los plásmidos utilizados para la construcción de líneas transgénicas. El esquema indica los sitios de corte remanentes luego de clonar las construcciones de interés. En rojo se muestran los sitios de corte propios del plásmido de destino y en negro se indican los sitios heredados del plásmido de origen. Los sitios tachados representan las secuencias híbridas BglII-BamHI que ya no son reconocidas por ninguna de las dos enzimas luego del subclonado realizado.

Tratamiento de ayuno

Las larvas sometidas a ayunos fueron extraídas del alimento estándar en el 3er estadío y colocadas en placas con agar-agar 2%, sacarosa 3% y Nipagin. La incubación de las larvas en este medio durante 6hs a 25ºC constituye una condición de ayuno severo, validada previamente en nuestro laboratorio (*169*).

Preparación de las muestras

1. Disección

Larvas del 3er estadío de los genotipos de interés fueron disecadas en una gota de PBS bajo lupa binocular empleando fórceps de disección. En primer lugar, el extremo posterior del cuerpo de la larva fue removido empleando estas pinzas. Seguidamente se invirtió el cuerpo de la larva empujando con la punta del fórceps a través de la región anterior. De esta forma los diferentes órganos quedan expuestos al medio externo. Las larvas así invertidas fueron transferidas a tubos eppendorf de 2 ml conteniendo 1 ml de formol 3,7% en PBS. Esta solución fija los tejidos larvales luego de 120 min de incubación a 25ºC y agitación horizontal. A continuación, los tejidos fijados fueron lavados 3 veces con PBS-Tritón 0,3% durante 10 min. Estos lavados sirvieron también como paso de permeabilización del tejido. Finalmente, los tejidos así tratados se colocaron en medio de montaje (Mowiol de Calbiochem, #475904) y se individualizaron los órganos a analizar sobre un portaobjetos, descartando el resto de tejidos.

2. Inmunotinción

En los casos donde fue necesario realizar inmunomarcaciones de los órganos a analizar, los tejidos larvales fueron fijados y permeabilizados tal como se indica en la sección anterior. Luego de ello, los tejidos fueron bloqueados en una solución de suero normal de cabra 10% en PBS durante 120 min a 25ºC con agitación orbital, para luego incubar con la solución de anticuerpo 1º durante 16 hs a 4ºC y agitación orbital. El

anticuerpo anti-engrailed (4D9, DSHB) se diluyó 1:10 en la misma solución de suero de cabra empleada para bloquear. Para trabajar con el anti-GFP (A-11120, Molecular Probes) se utilizó una dilución de 1:250.

Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS-Tritón 0,3% durante 10 min, e incubadas con soluciones del anticuerpo 2º de interés (de acuerdo a especificaciones del proveedor) en solución de bloqueo. Los tejidos se incubaron con la solución de anticuerpo secundario durante 120 min, luego de los cuales fueron lavadas 3 veces nuevamente con PBS- Tritón 0,3% durante 10 min. Por último, los tejidos tratados de esta manera se colocaron en Mowiol, para ser montados tal como se detalló en la sección anterior.

Microscopía de fluorescencia

A lo largo de la presente tesis hemos empleado dos microscopios confocales. El equipo 510 META de Zeiss, acoplado a un monocromador, permitió realizar la detección espectral necesaria para las primeras etapas de caracterización de las herramientas. En etapas posteriores se utilizó también un microscopio 710 de Zeiss, con cuyo divisor de haces regulable es posible captar luz proveniente de la muestra en un rango de longitudes de onda definibles por el usuario. Así, con este equipo se pueden generar mapas de FRET sin contar con el espectro de emisión completo.

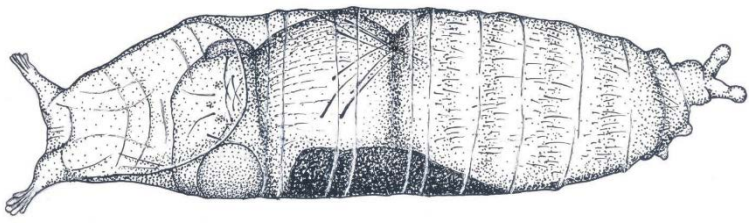
Las imágenes obtenidas fueron procesadas de acuerdo al protocolo descripto en la sección *Señales FRET libres de artificios*, para lo cual se utilizó el programa ImageJ, del NIH (https://imagej.nih.gov/ij/index.html).

Análisis estadístico

En los casos donde fue necesario comparar entre dos condiciones o genotipos se realizaron test T de Student. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante un ANOVA de un factor, seguido del test de Tukey (cada condición vs cada condición) o de Dunnett (cada condición vs control), dependiendo del experimento. En todos los casos

la normalidad se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad a través del test de Bartlett. La presencia de valores atípicos significativamente diferentes al resto de los datos se determinó utilizando el test de Grubb. En caso de identificarse, estos valores fueron removidos del conjunto de datos. Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces. En cada imagen se especifica la significancia estadística. Los distintos gráficos indican la media +/- el desvío estándar de cada condición. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa GraphPad PRISM (v 5.03).

Anexo



Secuencia del dominio NifA de unión a 2-OG de OGSOR

CAGATCGACGAACTGCTCGAACAGGTCCTGGCCGTACTGCACAATGACCTCGGCCTGCTGCAT
GGCCTGGTGACCATTTCCGACCCGGAACACGGCGCCCTGCAGATCGGCGCCATCCACACCGAC
TCGGAAGCGGTGGCCCAGGCCTGCGAAGGCGTGCGCTACAGAAGCGGCGAAGGCGTGATCG
GCAACGTGCTCAAGCACGGCAACAGCGTGGTGCTCGGGCGCATCTCCGCCGACCCGCGCTTTC
TCGACCGCCTGGCGCTGTACGACCTGGAAATGCCGTTCATCGCCGTGCCGATCAAGAACCCCG
AGGGCAACACCATCGGCGTGCTGGCGGCCCAGCCGGACTGCCGCGCCGACGAGCACATGCCC
GCGCGCACGCGCCTTCTGGAGATCGTCGCCAACCTGCTGGCGCAGACCGTGCGCCTGGTGGTG
AACATCGAGGACGGCCGCGAGGCGGCCGACGAGCGCGACGAACTGCGTCGCGAGGTGCGCG
GCAAGTACGGCTTCGAGAACATGGTGGTGGGCCACACCCCCACCATGCGCCGGGTGTTCGATC
AGATCCGCCGGGTCGCCAAGTGGAACAGCACCGTACTGGTCCTCGGCGAGTCCGGTACCGGC
AAGGAACTGATCGCCAGCGCCATCCACTACAACTCGCCGCGCGCGCACCGCCCCTTCGTGCGC
CTGAACTGCGCCGCGCTGCCGGAAACCCTGCTCGAGTCCGAACTCTTCGGCCACGAGAAGGGC
GCCTTCACCGGCGCGGTGAAGCAGCGCAAGGGGCGTTTCGAGCAGGCCGACGGCGGCACCCT
GTTCCTCGACGAGATCGGCGAGATCTCGCCGATGTTCCAGGCCAAGCTGCTGCGCGTGCTGCA
GGAAGGCGAGTTCGAGCGGGTCGGCGGCAACCAGACGGTGCGGGTCAACGTGCGCATCGTC
GCCGCCACCAACCGCGACCTGGAAAGCGAGGTGGAA

Secuencia del marco de lectura abierto de PDHK en UAS-PDHK

GAAGTTATCAGTCGACATGCGCCTGTTTCCAGTCCGATTCTCAGCCGCCTCCTCGTCGATGGCG
AGTTTGGCCAAAATGCTCGACTTTTACTCGGGCTTCAACCCCTCGCCCCTCTCGATAAAGCAGTT
CATGGACTTTGGTCAGAATGCCTGCGAGAAGAAATCGTACATATTCCTGCGCAAGGAACTGCC
TGTTCGACTGGCGAATATCATGAAGGAGATCGCCCTTCTGCCGGATAACCTGTTGCACACCAG
ATCCGTAAGCGAAGTTAGTTCCTGGTATGTCAAGAGTTTCGAGGATGTGCTGGTGTACGAGAA
AGCAGAGCCCACCCACGACAATCTGCAAAAGTTTGTGGCCGATTTGGATCTCATTAGGAATCG
GCACAACGATGTGGTGCAAACGATGGCCCAGGGTGTGATCGAAATGAAGGAGAACGAGGGC
GGCCAGGTGGATGCGCCTACAGAGAGTTCCATTCAGTACTTTCTCGACAGGCTCTACATGTCTC
GCATCAGCATTCGAATGCTGATAAATCAGCACACCCTTCTCTTTGGCGGAAATCCACATGCGGG
TGGCCGCCATATTGGTTGCCTGGATCCCGCCTGTGATCTGTCGGATGTGGTTCGCGATGCTTAC
GAGAATGCGCGATTCCTATGCGATCAGTACTACCTGACCAGTCCGGCATTGGAGATCCAGCAG

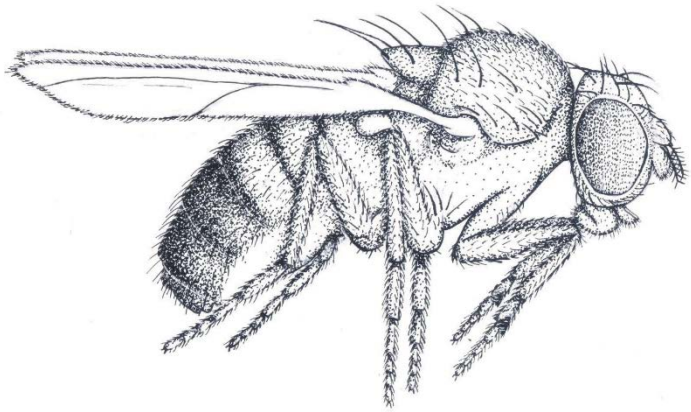
CACAGCAGCGAGCCTGGAGACAACCTGCCCATCCGCACCGTTTACGTGCCCTCGCACCTGTACT
ACATGCTTTTCGAGCTCTTCAAGAACTCTATGCGAGCTGTTGTAGAGCACCATGGCCATGACAA
CAATGACACATTGCCCCCCTTGAAAGTAGCCATTTGCAAGGGCAAGGAGGACATCTGTGTGAA
AATTTCTGACCAGGGAGGCGGCATTCCCCGCTCCCAGACCGATCAGCTCTTCAAGTATATGTAC
AGCACAGCGCCGCAGCCCTCGAAGTCGGATCTGCATACGGTGCCATTAGCGGGCTATGGATAC
GGTCTGCCGATCTCAAGGCTTTACGCCCGCTATTTCCATGGCGACATTGTGCTGCTCTCCTGCG
AAGGATTCGGAACAGATGCAATCATCTATCTAAAGGCTCTGTCCGACGAAGCAAACGAATTGC
TGCCGATCTTCAACAAGACAAGCTCAAAGTTCTATCGCGCCACCGTGCCCACGGGTGACTGGT
CCAATCAGGTAAAATACGCTAAAAAGAAGAAGACGAGCGCTGTCAACCAGTAGAAGCTTTCTA
GACCAT

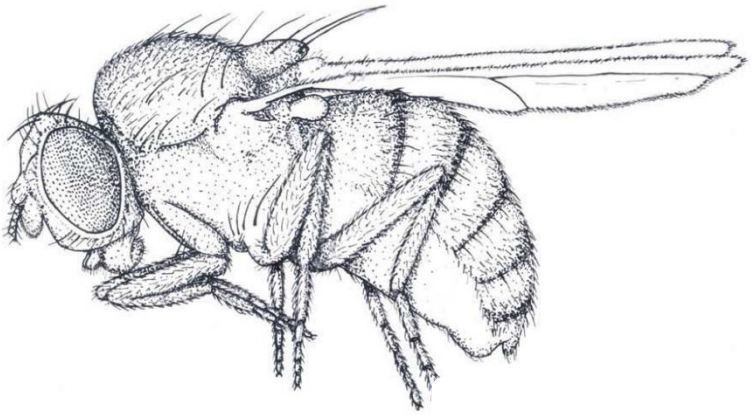
Secuencia de la región regulatoria de PDHK1 en el reportero PDHK1->eGFP

CTTCCTGAGGGAAAAAAATCTTGCTAAAATAGTCTCAAGGTTTCTGCTGGGCCTTTGTACTTTC
ACGCAAATTAATGTTCAGCTGAGCATCTTGACATGCTCAGGCAGAAAGCAGCAAAATTGCAAA
CAGGGATTGAGGGAGCTGAATAATGCTGTGCATGATAAAGTGACAAGACTTTGGAGCTCAGG
GAATAATCTAGAAGGAAGGAGATTAGAAAGGAGGAGGCAACCTGAGAGGCTGGGGTAGAG
CTGTGGAAATGTTTGAGGGACTATTTTAAGAATGTGTAATATTCAACTTAAAATTGTTTTCTTCT
TTCCAACTTAGGTCCCGCAGAAGAAGGGTGGGAAGAAGAAGGGGGCCATTCAGCCATCAATG
AGGTGGTGACACCATCAACATTCCCAAGCACATCCCATTGAAACGGACTTCAGGAAGTGTGCC
CCTCGGGCACTCAGCAAAGATATCTGGAAATTTGCCAAGAAAGAGATGGGCACTCCAGATGC
GCATACTGATACCAGGTTTGACAAAGCTGTCTGGCCAAAAGAATAATGTCCCATACGGTATCC
ACATGTGGTTGTCCAGAAAAACATAATGCGAATGAAGATTCACTGATATGTGAAAGGAAAATA
TCACGGGCCACAAAATCACTGAGCTAAAGGGAAAATTCAAGCTGGGAACTGCTCAAGGCAAA
CCTGCCTCCCATTCTATTCAAAGTCATCCCTCTGCTGAGACAGATGCATATCTGATTGCTTCCTT
GGGAAAGGCTTATCAGAAACTCCAAAGACTGCAACCATTTGTCTCTCACCTACTTATAACCTGG
AAGCCTTCCTCCCTGCTTCAAGTTGTCCCACCTTTCCGGCAGGAACCAATGTACTTCTTGCATAT
AGATTGAGGTCTCCTGTCTCCCTGTATAAAACCAAGCTGTTCACCCCTTGGGCACGTGTTCTCA
GGACTTCCTGAGGCTGTGTCACGGGCACGCGTCCTCAACCTTGTCAAGATAAACTTTATACATT
AACTGAGACTTGTCTCAAACTTTCGGAGTTCACAAAACTATGTACCCGTTACACTTTCTAAAACC
AACAGTCAGTGTGGGAGAACTGCTGATACTCGAATACATCAAATAGTTATAAAACCGCCAAAA

ACCGTTTTCTCTCAAACTTTTGGTAAAATGTGCTTCAGGGAAAACGCAGATTGGTGGTTCTGAT
AAAATCTTAATAATGAAATAATTTTAAAAAGCAATAATGGTAAAAATAAATCCCATTTATTATC
TGGTATGTCCCCGGCATTGTGCTAACACAGATAGCTCTACTACCCATGTCACAGCAACTGAAAC
AG

Bibliografía





1. L. Gándara, P. Wappner, Metabo-Devo: A metabolic perspective of development. *Mechanisms of development*, (2019).
2. D. Voet, J. G. Voet, Biochemistry, 4-th Edition. *NewYork: John Wiley& SonsInc*, 492-496 (2011).
3. J. Aragonés, P. Fraisl, M. Baes, P. Carmeliet, Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell metabolism* **9**, 11-22 (2009).
4. H. Miyazawa, A. Aulehla, Revisiting the role of metabolism during development. *Development* **145**, dev131110 (2018).
5. A. Herrero-Mendez, A. Almeida, E. Fernández, C. Maestre, S. Moncada, J. P. Bolaños, The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1. *Nature cell biology* **11**, 747 (2009).
6. P. Mächler, M. T. Wyss, M. Elsayed, J. Stobart, R. Gutierrez, A. von Faber-Castell, V. Kaelin, M. Zuend, A. San Martín, I. Romero-Gómez, In vivo evidence for a lactate gradient from astrocytes to neurons. *Cell metabolism* **23**, 94-102 (2016).
7. A. P. Halestrap, The monocarboxylate transporter family—structure and functional characterization. *IUBMB life* **64**, 1-9 (2012).
8. L. Pellerin, A. K. Bouzier-Sore, A. Aubert, S. Serres, M. Merle, R. Costalat, P. J. Magistretti, Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* **55**, 1251-1262 (2007).
9. K. C. Verbist, C. S. Guy, S. Milasta, S. Liedmann, M. M. Kamiński, R. Wang, D. R. Green, Metabolic maintenance of cell asymmetry following division in activated T lymphocytes. *Nature* **532**, 389 (2016).
10. D. Zala, M.-V. Hinckelmann, H. Yu, M. M. L. da Cunha, G. Liot, F. P. Cordelières, S. Marco, F. Saudou, Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* **152**, 479-491 (2013).
11. S. Jang, J. C. Nelson, E. G. Bend, L. Rodríguez-Laureano, F. G. Tueros, L. Cartagenova, K. Underwood, E. M. Jorgensen, D. A. Colón-Ramos, Glycolytic enzymes localize to synapses under energy stress to support synaptic function. *Neuron* **90**, 278-291 (2016).
12. A. Almeida, J. P. Bolaños, S. Moncada, E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 738-741 (2010).
13. K. Mitra, C. Wunder, B. Roysam, G. Lin, J. Lippincott-Schwartz, A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 11960-11965 (2009).
14. K. L. Eckel-Mahan, V. R. Patel, R. P. Mohney, K. S. Vignola, P. Baldi, P. Sassone-Corsi, Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 5541-5546 (2012).
15. J. Qian, F. A. Scheer, Circadian system and glucose metabolism: implications for physiology and disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **27**, 282-293 (2016).
16. N. W. Blackstone, Charles Manning Child (1869–1954): the past, present, and future of metabolic signaling. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **306**, 1-7 (2006).
17. J. B. Gurdon, B. Rodbard, Biographical memoir on Joseph Needham (1900-1995). *International Journal of Developmental Biology* **44**, 9-13 (2003).
18. J. Needham, Joseph Needham's views of his own work. *Personal records of the Royal Society*, (1941).
19. O. Warburg, On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).
20. H. G. Crabtree, Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical journal* **23**, 536 (1929).
21. S. Weinhouse, R. H. Millington, C. E. Wenner, Metabolism of Neoplastic Tissue. *Cancer research* **11**, 845-850 (1951).

22. R. A. Gatenby, R. J. Gillies, Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* **4**, 891-899 (2004).
23. L. Szablewski, Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **1835**, 164-169 (2013).
24. R. A. Medina, G. I. Owen, Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biological research* **35**, 9-26 (2002).
25. S. Mathupala, Y. a. Ko, P. Pedersen, Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* **25**, 4777 (2006).
26. X. Filella, R. Molina, J. Jo, E. Mas, A. Ballesta, Serum phosphohexose isomerase activities in patients with colorectal cancer. *Tumor biology* **12**, 360-367 (1991).
27. M. Baumann, A. Kappl, T. Lang, K. Brand, W. Siegfried, E. Paterok, The diagnostic validity of the serum tumor marker phosphohexose isomerase (PHI) in patients with gastrointestinal, kidney, and breast cancer. *Cancer investigation* **8**, 351-356 (1990).
28. R. Kessler, F. Bleichert, J.-P. Warnke, K. Eschrich, 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *Journal of neuro-oncology* **86**, 257-264 (2008).
29. O. Minchenko, A. Ochiai, I. Opentanova, T. Ogura, D. Minchenko, J. Caro, S. Komisarenko, H. Esumi, Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie* **87**, 1005-1010 (2005).
30. F. Ren, H. Wu, Y. Lei, H. Zhang, R. Liu, Y. Zhao, X. Chen, D. Zeng, A. Tong, L. Chen, Quantitative proteomics identification of phosphoglycerate mutase 1 as a novel therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer* **9**, 81 (2010).
31. H. R. Christofk, M. G. Vander Heiden, M. H. Harris, A. Ramanathan, R. E. Gerszten, R. Wei, M. D. Fleming, S. L. Schreiber, L. C. Cantley, The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452**, 230 (2008).
32. S. Desai, M. Ding, B. Wang, Z. Lu, Q. Zhao, K. Shaw, W. A. Yung, J. N. Weinstein, M. Tan, J. Yao, Tissue-specific isoform switch and DNA hypomethylation of the pyruvate kinase PKM gene in human cancers. *Oncotarget* **5**, 8202 (2014).
33. G. L. Semenza, HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology* **88**, 1474-1480 (2000).
34. H. Shim, C. Dolde, B. C. Lewis, C.-S. Wu, G. Dang, R. A. Jungmann, R. Dalla-Favera, C. V. Dang, c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 6658-6663 (1997).
35. P. Miao, S. Sheng, X. Sun, J. Liu, G. Huang, Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB life* **65**, 904-910 (2013).
36. G. Baek, F. T. Yan, Z. Hu, D. Cox, N. Buboltz, P. McCue, C. J. Yeo, M. A. White, R. J. DeBerardinis, E. S. Knudsen, MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell reports* **9**, 2233-2249 (2014).
37. J. C. Schell, K. A. Olson, L. Jiang, A. J. Hawkins, J. G. Van Vranken, J. Xie, R. A. Egnatchik, E. G. Earl, R. J. DeBerardinis, J. Rutter, A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the Warburg effect and colon cancer cell growth. *Molecular cell* **56**, 400-413 (2014).
38. D. K. Bricker, E. B. Taylor, J. C. Schell, T. Orsak, A. Boutron, Y.-C. Chen, J. E. Cox, C. M. Cardon, J. G. Van Vranken, N. Dephoure, A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans. *Science* **337**, 96-100 (2012).
39. M. Holness, M. Sugden. (Portland Press Limited, 2003).
40. T. Hitosugi, J. Fan, T.-W. Chung, K. Lythgoe, X. Wang, J. Xie, Q. Ge, T.-L. Gu, R. D. Polakiewicz, J. L. Roesel, Tyrosine phosphorylation of mitochondrial pyruvate

dehydrogenase kinase 1 is important for cancer metabolism. *Molecular cell* **44**, 864-877 (2011).

41. J. Kaplon, L. Zheng, K. Meissl, B. Chaneton, V. A. Selivanov, G. Mackay, S. H. van der Burg, E. M. Verdegaal, M. Cascante, T. Shlomi, A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* **498**, 109 (2013).
42. D. R. Wise, R. J. DeBerardinis, A. Mancuso, N. Sayed, X.-Y. Zhang, H. K. Pfeiffer, I. Nissim, E. Daikhin, M. Yudkoff, S. B. McMahon, Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 18782-18787 (2008).
43. P. S. Ward, J. Patel, D. R. Wise, O. Abdel-Wahab, B. D. Bennett, H. A. Coller, J. R. Cross, V. R. Fantin, C. V. Hedvat, A. E. Perl, The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting α-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer cell* **17**, 225-234 (2010).
44. L. Dang, D. W. White, S. Gross, B. D. Bennett, M. A. Bittinger, E. M. Driggers, V. R. Fantin, H. G. Jang, S. Jin, M. C. Keenan, Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739 (2009).
45. S. Schuster, D. Boley, P. Möller, H. Stark, C. Kaleta, Mathematical models for explaining the Warburg effect: a review focussed on ATP and biomass production. *Biochemical Society Transactions* **43**, 1187-1194 (2015).
46. R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, C. B. Thompson, The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism* **7**, 11-20 (2008).
47. T. Pfeiffer, S. Schuster, S. Bonhoeffer, Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **292**, 504-507 (2001).
48. E. M. Palsson-McDermott, L. A. O'neill, The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays* **35**, 965-973 (2013).
49. C. T. Hensley, A. T. Wasti, R. J. DeBerardinis, Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation* **123**, 3678-3684 (2013).
50. A. R. Mullen, Z. Hu, X. Shi, L. Jiang, L. K. Boroughs, Z. Kovacs, R. Boriack, D. Rakheja, L. B. Sullivan, W. M. Linehan, Oxidation of alpha-ketoglutarate is required for reductive carboxylation in cancer cells with mitochondrial defects. *Cell reports* **7**, 1679-1690 (2014).
51. R. O'connor, The metabolism of cell division. *British journal of experimental pathology* **31**, 390 (1950).
52. M. Agathocleous, N. K. Love, O. Randlett, J. J. Harris, J. Liu, A. J. Murray, W. A. Harris, Metabolic differentiation in the embryonic retina. *Nature cell biology* **14**, 859 (2012).
53. T. Wang, C. Marquardt, J. Foker, Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* **261**, 702-705 (1976).
54. K. A. Brand, U. Hermfisse, Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *The FASEB journal* **11**, 388-395 (1997).
55. Y.-H. Wang, W. J. Israelsen, D. Lee, W. Vionnie, N. T. Jeanson, C. B. Clish, L. C. Cantley, M. G. Vander Heiden, D. T. Scadden, Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell* **158**, 1309-1323 (2014).
56. X. Zheng, L. Boyer, M. Jin, J. Mertens, Y. Kim, L. Ma, M. Hamm, F. H. Gage, T. Hunter, Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife* **5**, e13374 (2016).
57. L. Qiang, R. Fujita, A. Abeliovich, Remodeling neurodegeneration: somatic cell reprogramming-based models of adult neurological disorders. *Neuron* **78**, 957-969 (2013).

58. M. Agostini, F. Romeo, S. Inoue, M. Niklison-Chirou, A. Elia, D. Dinsdale, N. Morone, R. Knight, T. Mak, G. Melino, Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell death and differentiation* **23**, 1502 (2016).
59. L. B. Sullivan, D. Y. Gui, A. M. Hosios, L. N. Bush, E. Freinkman, M. G. Vander Heiden, Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell* **162**, 552-563 (2015).
60. H. Miyazawa, Y. Yamaguchi, Y. Sugiura, K. Honda, K. Kondo, F. Matsuda, T. Yamamoto, M. Suematsu, M. Miura, Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching. *Development* **144**, 63-73 (2017).
61. J. Clough, D. Whittingham, Metabolism of [14C] glucose by postimplantation mouse embryos in vitro. *Development* **74**, 133-142 (1983).
62. T. Tanimura, T. Shepard, Glucose metabolism by rat embryos in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **135**, 51-54 (1970).
63. L. Esteban-Martínez, E. Sierra-Filardi, R. S. McGreal, M. Salazar-Roa, G. Mariño, E. Seco, S. Durand, D. Enot, O. Graña, M. Malumbres, Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *The EMBO Journal* **36**, 1688-1706 (2017).
64. M. F. Forni, J. Peloggia, K. Trudeau, O. Shirihai, A. J. Kowaltowski, Murine mesenchymal stem cell commitment to differentiation is regulated by mitochondrial dynamics. *Stem Cells* **34**, 743-755 (2016).
65. M. J. Rodríguez-Colman, M. Schewe, M. Meerlo, E. Stigter, J. Gerrits, M. Pras-Raves, A. Sacchetti, M. Hornsveld, K. C. Oost, H. J. Snippert, Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* **543**, 424-427 (2017).
66. E. Araldi, E. Schipani, Hypoxia, HIFs and bone development. *Bone* **47**, 190-196 (2010).
67. T. Suda, K. Takubo, G. L. Semenza, Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell* **9**, 298-310 (2011).
68. J. Liu, J. Kim, P. Oberdoerffer, Metabolic modulation of chromatin: implications for DNA repair and genomic integrity. *Frontiers in genetics* **4**, 182 (2013).
69. B. Martinez-Pastor, C. Cosentino, R. Mostoslavsky, A tale of metabolites: the cross-talk between chromatin and energy metabolism. *Cancer discovery* **3**, 497-501 (2013).
70. D. Anastasiou, Y. Yu, W. J. Israelsen, J.-K. Jiang, M. B. Boxer, B. S. Hong, W. Tempel, S. Dimov, M. Shen, A. Jha, Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nature chemical biology* **8**, 839 (2012).
71. K. E. Wellen, G. Hatzivassiliou, U. M. Sachdeva, T. V. Bui, J. R. Cross, C. B. Thompson, ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* **324**, 1076-1080 (2009).
72. J. G. Ryall, S. Dell'Orso, A. Derfoul, A. Juan, H. Zare, X. Feng, D. Clermont, M. Koulnis, G. Gutierrez-Cruz, M. Fulco, The NAD+-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell stem cell* **16**, 171-183 (2015).
73. R. Teperino, K. Schoonjans, J. Auwerx, Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell metabolism* **12**, 321-327 (2010).
74. E.-P. I. Chiang, Y.-C. Wang, W.-W. Chen, F.-Y. Tang, Effects of insulin and glucose on cellular metabolic fluxes in homocysteine transsulfuration, remethylation, S-adenosylmethionine synthesis, and global deoxyribonucleic acid methylation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94**, 1017-1025 (2009).
75. Y. G. Shi, Y.-i. Tsukada, The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, a017947 (2013).
76. C. Loenarz, C. J. Schofield, Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nature chemical biology* **4**, 152 (2008).

77. W. Xu, H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S.-H. Kim, S. Ito, C. Yang, P. Wang, M.-T. Xiao, Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell* **19**, 17-30 (2011).
78. A. D. Panopoulos, O. Yanes, S. Ruiz, Y. S. Kida, D. Diep, R. Tautenhahn, A. Herrerías, E. M. Batchelder, N. Plongthongkum, M. Lutz, The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell research* **22**, 168 (2012).
79. S. Melcer, H. Hezroni, E. Rand, M. Nissim-Rafinia, A. Skoultchi, C. L. Stewart, M. Bustin, E. Meshorer, Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation. *Nature communications* **3**, 910 (2012).
80. A. Moussaieff, M. Rouleau, D. Kitsberg, M. Cohen, G. Levy, D. Barasch, A. Nemirovski, S. Shen-Orr, I. Laevsky, M. Amit, Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell metabolism* **21**, 392-402 (2015).
81. T. TeSlaa, A. C. Chaikovsky, I. Lipchina, S. L. Escobar, K. Hochedlinger, J. Huang, T. G. Graeber, D. Braas, M. A. Teitell, α-Ketoglutarate accelerates the initial differentiation of primed human pluripotent stem cells. *Cell metabolism* **24**, 485-493 (2016).
82. R. Nagaraj, M. S. Sharpley, F. Chi, D. Braas, Y. Zhou, R. Kim, A. T. Clark, U. Banerjee, Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes as a critical step in mammalian zygotic genome activation. *Cell* **168**, 210-223. e211 (2017).
83. J. R. Weaver, M. Susiarjo, M. S. Bartolomei, Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mammalian Genome* **20**, 532-543 (2009).
84. C. Pegoraro, A. L. Figueiredo, F. Maczkowiak, C. Pouponnot, A. Eychène, A. H. Monsoro-Burq, PFKFB4 controls embryonic patterning via Akt signalling independently of glycolysis. *Nature communications* **6**, 5953 (2015).
85. M. H. Rider, L. Bertrand, D. Vertommen, P. A. Michels, G. G. Rousseau, H. Louis, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal* **381**, 561-579 (2004).
86. A. L. Figueiredo, F. Maczkowiak, C. Borday, P. Pla, M. Sittewelle, C. Pegoraro, A. H. Monsoro-Burq, PFKFB4 control of AKT signaling is essential for premigratory and migratory neural crest formation. *Development*, dev. 157644 (2017).
87. V. Bulusu, N. Prior, M. T. Snaebjornsson, A. Kuehne, K. F. Sonnen, J. Kress, F. Stein, C. Schultz, U. Sauer, A. Aulehla, Spatiotemporal analysis of a glycolytic activity gradient linked to mouse embryo mesoderm development. *Developmental cell* **40**, 331-341. e334 (2017).
88. C. Gomez, E. M. Özbudak, J. Wunderlich, D. Baumann, J. Lewis, O. Pourquié, Control of segment number in vertebrate embryos. *Nature* **454**, 335 (2008).
89. S. J. Venters, M. L. Hultner, C. P. Ordahl, Somite cell cycle analysis using somite-staging to measure intrinsic developmental time. *Developmental Dynamics* **237**, 377-392 (2008).
90. M. Oginuma, P. Moncuquet, F. Xiong, E. Karoly, J. Chal, K. Guevorkian, O. Pourquié, A gradient of glycolytic activity coordinates FGF and Wnt signaling during elongation of the body axis in amniote embryos. *Developmental cell* **40**, 342-353. e310 (2017).
91. S. K. Parks, J. Chiche, J. Pouysségur, Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **13**, 611 (2013).
92. J. Roote, A. Prokop, How to design a genetic mating scheme: a basic training package for Drosophila genetics. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **3**, 353-358 (2013).
93. P. A. Lawrence, *The making of a fly: the genetics of animal design*. (Blackwell Scientific Publications Ltd, 1992).
94. K. M. Cadigan, M. Peifer, Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a002881 (2009).

95. L. A. Lee, T. L. Orr-Weaver, Regulation of cell cycles in Drosophila development: intrinsic and extrinsic cues. *Annual review of genetics* **37**, 545-578 (2003).
96. H. J. Bellen, C. Tong, H. Tsuda, 100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nature Reviews Neuroscience* **11**, 514 (2010).
97. E. Bier, Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Reviews Genetics* **6**, 9 (2005).
98. B. A. Edgar, How flies get their size: genetics meets physiology. *Nature Reviews Genetics* **7**, 907 (2006).
99. T. L. Orr-Weaver, When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis. *Trends in Genetics* **31**, 307-315 (2015).
100. M. Ashburner, *Drosophila. A laboratory handbook*. (Cold spring harbor laboratory press, 1989).
101. J. M. Tennessen, K. D. Baker, G. Lam, J. Evans, C. S. Thummel, The Drosophila estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell metabolism* **13**, 139-148 (2011).
102. J. M. Tennessen, N. M. Bertagnolli, J. Evans, M. H. Sieber, J. Cox, C. S. Thummel, Coordinated metabolic transitions during Drosophila embryogenesis and the onset of aerobic glycolysis. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **4**, 839-850 (2014).
103. C. C. Homem, V. Steinmann, T. R. Burkard, A. Jais, H. Esterbauer, J. A. Knoblich, Ecdysone and mediator change energy metabolism to terminate proliferation in Drosophila neural stem cells. *Cell* **158**, 874-888 (2014).
104. K. Ito, Y. Hotta, Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of Drosophila melanogaster. *Developmental biology* **149**, 134-148 (1992).
105. I. Fernández-Hernández, C. Rhiner, E. Moreno, Adult neurogenesis in Drosophila. *Cell reports* **3**, 1857-1865 (2013).
106. Q. Ou, K. King-Jones, in *Current topics in developmental biology*. (Elsevier, 2013), vol. 103, pp. 35-71.
107. H. Li, G. Chawla, A. J. Hurlburt, M. C. Sterrett, O. Zaslaver, J. Cox, J. A. Karty, A. P. Rosebrock, A. A. Caudy, J. M. Tennessen, Drosophila larvae synthesize the putative oncometabolite L-2-hydroxyglutarate during normal developmental growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 1353-1358 (2017).
108. E.-H. Shim, C. B. Livi, D. Rakheja, J. Tan, D. Benson, V. Parekh, E.-Y. Kho, A. P. Ghosh, R. Kirkman, S. Velu, L-2-Hydroxyglutarate: an epigenetic modifier and putative oncometabolite in renal cancer. *Cancer discovery*, (2014).
109. A. San Martín, S. Ceballo, I. Ruminot, R. Lerchundi, W. B. Frommer, L. F. Barros, A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. *PloS one* **8**, e57712 (2013).
110. A. San Martín, S. Ceballo, F. Baeza-Lehnert, R. Lerchundi, R. Valdebenito, Y. Contreras-Baeza, K. Alegría, L. F. Barros, Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate. *PloS one* **9**, e85780 (2014).
111. C. Zhang, Z.-H. Wei, B.-C. Ye, Quantitative monitoring of 2-oxoglutarate in Escherichia coli cells by a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor. *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 8307-8316 (2013).
112. T. Förster, Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik* **437**, 55-75 (1948).
113. H. Grecco, P. Bastiaens, Imaging protein states in cells. *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual Vol* **6**, (2008).
114. P. Wu, Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Advances in enzyme regulation* **42**, 249 (2002).

115. H. Hur, Y. Xuan, Y. B. Kim, G. Lee, W. Shim, J. Yun, I.-H. Ham, S.-U. Han, Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. *International journal of oncology* **42**, 44-54 (2013).
116. J.-w. Kim, P. Gao, Y.-C. Liu, G. L. Semenza, C. V. Dang, Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Molecular and cellular biology* **27**, 7381-7393 (2007).
117. M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, E. Sivridis, K. C. Gatter, A. L. Harris, Tumor, A. R. Group, Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. *Neoplasia* **7**, 1-6 (2005).
118. C. Sebastián, B. M. Zwaans, D. M. Silberman, M. Gymrek, A. Goren, L. Zhong, O. Ram, J. Truelove, A. R. Guimaraes, D. Toiber, The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* **151**, 1185-1199 (2012).
119. M. Fessenden. (Nature Publishing Group, 2016).
120. T. Zimmermann, in *Microscopy Techniques*. (Springer, 2005), pp. 245-265.
121. B. Phypers, J. T. Pierce, Lactate physiology in health and disease. *Continuing education in Anaesthesia, critical care & pain* **6**, 128-132 (2006).
122. M. Willenborg, U. Panten, I. Rustenbeck, Triggering and amplification of insulin secretion by dimethyl α-ketoglutarate, a membrane permeable α-ketoglutarate analogue. *European journal of pharmacology* **607**, 41-46 (2009).
123. M. Dombrovski, L. Poussard, K. Moalem, L. Kmecova, N. Hogan, E. Schott, A. Vaccari, S. Acton, B. Condron, Cooperative behavior emerges among Drosophila larvae. *Current Biology* **27**, 2821-2826. e2822 (2017).
124. L. Centanin, A. Dekanty, N. Romero, M. Irisarri, T. A. Gorr, P. Wappner, Cell autonomy of HIF effects in Drosophila: tracheal cells sense hypoxia and induce terminal branch sprouting. *Developmental cell* **14**, 547-558 (2008).
125. V. Callier, S. C. Hand, J. B. Campbell, T. Biddulph, J. F. Harrison, Developmental changes in hypoxic exposure and responses to anoxia in Drosophila melanogaster. *Journal of Experimental Biology*, jeb. 125849 (2015).
126. I. Schneider, Differentiation of larval Drosophila eye-antennal discs in vitro. *Journal of Experimental Zoology* **156**, 91-103 (1964).
127. H. Boulahbel, R. V. Durán, E. Gottlieb. (Portland Press Limited, 2009).
128. C. J. Schofield, P. J. Ratcliffe, Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**, 343 (2004).
129. A. Ozer, R. K. Bruick, Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nature chemical biology* **3**, 144 (2007).
130. E. D. MacKenzie, M. A. Selak, D. A. Tennant, L. J. Payne, S. Crosby, C. M. Frederiksen, D. G. Watson, E. Gottlieb, Cell-permeating α-ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Molecular and cellular biology* **27**, 3282-3289 (2007).
131. L. Centanin, P. J. Ratcliffe, P. Wappner, Reversion of lethality and growth defects in Fatiga oxygen-sensor mutant flies by loss of hypoxia-inducible factor-α/Sima. *EMBO reports* **6**, 1070-1075 (2005).
132. N. M. Romero, A. Dekanty, P. Wappner, Cellular and developmental adaptations to hypoxia: a Drosophila perspective. *Methods in enzymology* **435**, 123-144 (2007).
133. T. Misra, M. Baccino-Calace, F. Meyenhofer, D. Rodriguez-Crespo, H. Akarsu, R. Armenta-Calderón, T. A. Gorr, C. Frei, R. Cantera, B. Egger, A genetically encoded biosensor for visualising hypoxia responses in vivo. *Biology open* **6**, 296-304 (2017).
134. M. A. Selak, S. M. Armour, E. D. MacKenzie, H. Boulahbel, D. G. Watson, K. D. Mansfield, Y. Pan, M. C. Simon, C. B. Thompson, E. Gottlieb, Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-α prolyl hydroxylase. *Cancer cell* **7**, 77-85 (2005).

135. T. Eichenlaub, R. Villadsen, F. C. Freitas, D. Andrejeva, B. I. Aldana, H. T. Nguyen, O. W. Petersen, J. Gorodkin, H. Herranz, S. M. Cohen, Warburg Effect Metabolism Drives Neoplasia in a Drosophila Genetic Model of Epithelial Cancer. *Current Biology*, (2018).
136. V. Slaninova, M. Krafcikova, R. Perez-Gomez, P. Steffal, L. Trantirek, S. J. Bray, A. Krejci, Notch stimulates growth by direct regulation of genes involved in the control of glycolysis and the tricarboxylic acid cycle. *Open biology* **6**, 150155 (2016).
137. M. B. Stark, An hereditary tumor in the fruit fly, Drosophila. *The Journal of Cancer Research* **3**, 279-301 (1918).
138. E. Gateff, Malignant neoplasms of genetic origin in Drosophila melanogaster. *Science* **200**, 1448-1459 (1978).
139. D. Bilder, Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors. *Genes & development* **18**, 1909-1925 (2004).
140. F. Papagiannouli, B. M. Mechler, in *Future aspects of tumor suppressor gene*. (InTech, 2013).
141. C. J. Potter, G. S. Turenchalk, T. Xu, Drosophila in cancer research: an expanding role. *Trends in Genetics* **16**, 33-39 (2000).
142. S. Artavanis-Tsakonas, K. Matsuno, M. E. Fortini, Notch signaling. *Science* **268**, 225-232 (1995).
143. O. Meurette, P. Mehlen, Notch signaling in the tumor microenvironment. *Cancer cell*, (2018).
144. M. J. Go, D. S. Eastman, S. Artavanis-Tsakonas, Cell proliferation control by Notch signaling in Drosophila development. *Development* **125**, 2031-2040 (1998).
145. Z. Meng, T. Moroishi, K.-L. Guan, Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development* **30**, 1-17 (2016).
146. B. K. Staley, K. D. Irvine, Hippo signaling in Drosophila: recent advances and insights. *Developmental dynamics* **241**, 3-15 (2012).
147. M. Freeman, Cell determination strategies in the Drosophila eye. *Development* **124**, 261-270 (1997).
148. J. Krzemien, J. Oyallon, M. Crozatier, A. Vincent, Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the Drosophila lymph gland. *Developmental biology* **346**, 310-319 (2010).
149. A. Volkenhoff, A. Weiler, M. Letzel, M. Stehling, C. Klämbt, S. Schirmeier, Glial glycolysis is essential for neuronal survival in Drosophila. *Cell metabolism* **22**, 437-447 (2015).
150. S. Takashima, M. Mkrtchyan, A. Younossi-Hartenstein, J. R. Merriam, V. Hartenstein, The behaviour of Drosophila adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling. *Nature* **454**, 651 (2008).
151. N. K. Gautam, P. Verma, M. G. Tapadia, in *Kidney Development and Disease*. (Springer, 2017), pp. 3-25.
152. E. A. Lemke, C. Schultz, Principles for designing fluorescent sensors and reporters. *Nature chemical biology* **7**, 480 (2011).
153. F. M. Zwiebel, U. Schwabe, M. S. Olson, R. Scholz, Role of pyruvate transporter in the regulation of pyruvate dehydrogenase multienzyme complex in perfused rat liver. *Biochemistry* **21**, 346-353 (1982).
154. H. P. Harding, Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell* **11**, 619-633 (2003).
155. D. T. Shaughnessy, K. McAllister, L. Worth, A. C. Haugen, J. N. Meyer, F. E. Domann, B. Van Houten, R. Mostoslavsky, S. J. Bultman, A. A. Baccarelli, Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environmental health perspectives* **122**, 1271-1278 (2014).

156. N. S. Chandel, D. S. McClintock, C. E. Feliciano, T. M. Wood, J. A. Melendez, A. M. Rodriguez, P. T. Schumacker, Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1α during hypoxia a mechanism of O2 sensing. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 25130-25138 (2000).
157. W. Ehleben, B. Bölling, E. Merten, T. Porwol, A. Strohmaier, H. Acker, Cytochromes and oxygen radicals as putative members of the oxygen sensing pathway. *Respiration physiology* **114**, 25-36 (1998).
158. A. Larhlimi, S. Blachon, J. Selbig, Z. Nikoloski, Robustness of metabolic networks: a review of existing definitions. *Biosystems* **106**, 1-8 (2011).
159. C.-W. Wang, A. Purkayastha, K. T. Jones, S. K. Thaker, U. Banerjee, In vivo genetic dissection of tumor growth and the Warburg effect. *Elife* **5**, e18126 (2016).
160. H. Herranz, R. Weng, S. M. Cohen, Crosstalk between epithelial and mesenchymal tissues in tumorigenesis and imaginal disc development. *Current Biology* **24**, 1476-1484 (2014).
161. A. Volkenhoff, J. Hirrlinger, J. M. Kappel, C. Klämbt, S. Schirmeier, Live imaging using a FRET glucose sensor reveals glucose delivery to all cell types in the Drosophila brain. *Journal of insect physiology* **106**, 55-64 (2018).
162. A. P. Halestrap, The SLC16 gene family–structure, role and regulation in health and disease. *Molecular aspects of medicine* **34**, 337-349 (2013).
163. M. G. Delgado, C. Oliva, E. López, A. Ibacache, A. Galaz, R. Delgado, L. F. Barros, J. Sierralta, Chaski, a novel Drosophila lactate/pyruvate transporter required in glia cells for survival under nutritional stress. *Scientific reports* **8**, 1186 (2018).
164. J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, E. H. Stelzer, Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* **305**, 1007-1009 (2004).
165. J. Huisken, D. Y. Stainier, Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development* **136**, 1963-1975 (2009).
166. A. Costa, A. Candeo, L. Fieramonti, G. Valentini, A. Bassi, Calcium dynamics in root cells of Arabidopsis thaliana visualized with selective plane illumination microscopy. *PLoS One* **8**, e75646 (2013).
167. M. L. Suster, L. Seugnet, M. Bate, M. B. Sokolowski, Refining GAL4-driven transgene expression in Drosophila with a GAL80 enhancer-trap. *genesis* **39**, 240-245 (2004).
168. J. A. Campos-Ortega, V. Hartenstein, *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. (Springer Science & Business Media, 2013).
169. M. Melani, A. Valko, N. M. Romero, M. O. Aguilera, J. M. Acevedo, Z. Bhujabal, J. Perez-Perri, R. V. de la Riva-Carrasco, M. J. Katz, E. Sorianello, Zonda is a novel early component of the autophagy pathway in Drosophila. *Molecular biology of the cell* **28**, 3070-3081 (2017).