

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Modulación de la sinapsis y su papel en patologías del sistema
nervioso**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Almudena Saiz Madera

Directora

Alicia Mansilla Aparicio

Madrid

© Almudena Saiz Madera, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN DE LA SINAPSI Y SU PAPEL EN PATOLOGÍAS DEL SISTEMA
NERVIOSO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

ALMUDENA SAIZ MADERA

DIRECTORA

ALICIA MANSILLA APARICIO

ABSTRACT

Synaptopathies are those diseases of the nervous system that occur as a result of an imbalance in the normal functioning of synapses. These abnormalities may be due to an excess in the number of synapses, as in autism spectrum disorders (ASD), or they may be by default, such as synaptic loss produced before neuronal death in neurodegenerative diseases. Thus, the study of the mechanisms that control the number of synapses and their activity is key to the development of effective therapies in a wide range of nervous system disorders of different etiology.

Previously in the laboratory, the interaction of the neuronal calcium sensor NCS1 with the guanine exchange factor *Ric8a* was identified as a possible therapeutic target for synaptopathies. In this doctoral thesis, the use of *NCS-1 / Ric8a* complex stabilizing compounds has been validated in neurodegenerative models to reverse synaptic dysfunction.

I₂ Imidazole receptors are widely distributed in the brain. Its selective ligands have shown that I₂s are involved in analgesia, inflammation, and other aspects of human brain pathologies. Dysregulation of I₂ levels is a hallmark of diseases such as glial tumors, Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and depression among others. This work evaluates the neuroprotective role of I₂ analogs at the synapse level in diseases models of different etiology, such as Alzheimer's disease or Huntington's disease.

The difficulty of standardizing clinical protocols is already known due to the differences that make up the sexual condition, female or male. For example, in diseases such as Alzheimer's the number of affected women is much greater than the number of men and the pathological development is also different. Our results in the fly animal model, show that males and females develop different responses at the synaptic level by modifying the expression levels of the ecdysone receptor (steroid receptor). These data suggest the importance of sex-dependent synaptic modulation.

In summary, two main ideas are concluded from this thesis work: the first based on the validation of molecules related to the *NCS1 / Ric8a* complex and the Imidazole I₂ receptors to correct synaptic dysfunction. The second conclusion supports the idea that synaptic modulation is finely regulated and, in this regulation, hormonal signaling has a

differential impact depending on the gender context and this has a direct repercussion on the treatment of nervous system pathologies.

RESUMEN

Las sinaptopatías son aquellas enfermedades del sistema nervioso que se producen como consecuencia de un desequilibrio en el funcionamiento normal de las sinapsis. Estas anomalías pueden deberse a un exceso en el número de sinapsis, como en los trastornos del espectro autista (TEA), o pueden ser por defecto, como la pérdida sináptica producida antes de la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas. Así, el estudio de los mecanismos que controlan el número de sinapsis y su actividad es clave para el desarrollo de terapias eficaces en una amplia gama de trastornos del sistema nervioso de diferente etiología.

Previamente en el laboratorio, se identificó la interacción del complejo formado por el sensor de calcio *NCS1* y el intercambiador de nucleótido de guanina *Ric8a* como posible diana terapéutica para sinaptopatías. En este trabajo de tesis doctoral se han validado el uso de compuestos estabilizadores del complejo *NCS1/ Ric8a* en modelos experimentales de neurodegeneración para revertir la disfunción sináptica.

Los receptores imidazólicos I₂ están ampliamente distribuidos en el cerebro. Sus ligandos selectivos han demostrado que los I₂ están implicados en analgesia, inflamación y otros aspectos de las patologías cerebrales humanas. La desregulación de los niveles de I₂ es un sello distintivo en enfermedades como los tumores gliales, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la depresión entre otros. En este trabajo se ha evaluado el papel neuroprotector de análogos I₂ a nivel de las sinapsis en enfermedades de etiología distinta, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington.

Ya se conoce la dificultad de estandarizar los protocolos clínicos debido a las diferencias que integra la condición sexual, femenina o masculina. Por ejemplo, en enfermedades como el Alzheimer el número de mujeres afectadas es mucho mayor que el número de hombres y el desarrollo patológico también es diferente. Nuestros resultados en el modelo animal de la mosca muestran que machos y hembras desarrollan diferentes respuestas a nivel sináptico al modificar el nivel de expresión del receptor de ecdisona (receptor de esteroideo). Estos datos sugieren la importancia de caracterizar la modulación sináptica dependiente del sexo.

En resumen, de este trabajo de tesis se concluyen dos ideas principales: la primera basada en la validación de moléculas relacionadas con el complejo *NCS1/Ric8a* y los receptores Imidazólicos I2, para corregir la disfunción sináptica, la segunda conclusión afianza la idea de que la modulación sináptica esta finamente regulada y en esa regulación la señalización hormonal tiene un impacto diferencial dependiendo del género, esto repercute directamente en el enfoque terapéutico de las patologías del sistema nervioso.

INDICE	Páginas
RESUMEN	3-6
INDICE	8-12
ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	15-51
I.- LA IMPORTANCIA DE LA REGULACIÓN SINÁPTICA	15-28
1.1 La Sinapsis	15
1.2 Transmisión del impulso nervioso	16
1.3 Regulación Sináptica	20
1.4 Trastornos neurológicos: Enfermedad de Alzheimer	22
1.5 Trastornos Neurológicos: Enfermedad de Huntington	24
1.6 Interacción <i>NCS1</i> y <i>Ric8a</i> como diana terapéutica	26
1.7 Receptores Imidazólicos como diana para disfunciones sinápticas	28
II.-DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO EXPERIMENTAL EN NEUROCIENCIA	29-32
2.1 La investigación en mosca	29
2.2 <i>Drosophila Melanogaster</i> como herramienta de estudio del sistema nervioso	30
III. EL PAPEL DEL SEXO BIOLÓGICO EN LA REGULACIÓN SINÁPTICA	33-59
3.1 Sexo y género en desarrollos patológicos	33
3.2 Influencia del sexo en la enfermedad de Alzheimer	34
3.3 Influencia del sexo en la enfermedad de Huntington	35
3.4 Impacto del dimorfismo sexual en nuestra comprensión de los trastornos cerebrales: papel de las hormonas	36

3.4.1 Hormonas esteroideas	36
3.5.- La importancia de los esteroides en el desarrollo de patología neurológicas	38
4. Circuitos dimórficos y regulación hormonal de la mosca	42
4.1 Genes de determinación sexual	42
4.2 Circuitos dimórficos: Neuronas <i>dsx</i>	43
5. La hormona ecdisona y el desarrollo de la mosca	44
5.1 El receptor de ecdisona	47
5.2 Hormonas esteroideas y regulación de la apoptosis	48
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	55-72
1. Sistema GAL4/UAS. Sistema de expresión binaria en <i>Drosophila melanogaster</i>	55
2. Líneas transgénicas de <i>Drosophila melanogaster</i>	63
3. Extracción de ARN, transcripción inversa y ensayos de PCR en tiempo real	57
4. Obtención de compuestos farmacológicos	58
5. Ensayos de locomoción	58
6. Ensayos de geotropismo o "escalada"	59
7. Experimentos de supervivencia	60
8. Inmunofluorescencia	61
9.- Ensayos farmacológicos en ratones	62
9.1 Mantenimiento líneas de ratón	62
9.2 Ensayos de comportamiento	63

9.2.1 Ensayos de comportamiento: Test ROTAROD	63
9.2.2 Ensayos de comportamiento: Estudios de la zancada	65
10. Análisis estadístico	71
RESULTADOS	68-102
I.- GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE MODULADORES SINÁPTICOS PARA SU APLICACIÓN EN PATOLOGÍAS DEL SISTEMA NERVIOSO	68-82
1.1 Caracterización modelo Alzheimer de mosca	68
1.2 Estudio de un estabilizador de la unión <i>NCS1/RIC8</i> en modelo de patología sináptica	79
1.3 Ensayos de escalada o geotaxis negativa	71
1.4 Efectos del tratamiento con 3b en la actividad locomotora de la mosca	73
1.5 Ensayos de comportamiento con ratones	79
1.5.1 Estudios del peso en animales tratados	79
1.5.2 Efectos del tratamiento 3b en la capacidad locomotora en ratones HD.	75
1.5.3 Estudio de la zancada en animales HD	76
2. Ensayos farmacológicos con compuestos reguladores de receptores imidazólicos en <i>Drosophila melanogaster</i>	77
2.1 Caracterización modelo HD de mosca	77
2.2 Efectos de los ligandos imidazólicos sobre la actividad locomotora de la mosca	79
2.2.1 Efectos del tratamiento con Comp3 en dos modelos de neurodegeneración en <i>Drosophila</i>	81
II.- EL CONTEXTO SEXUAL Y EL DIMORFISMO EN PATOLOGÍAS SINÁPTICAS	83-101
2.1 Papel de los receptores esteroideos: Esquema de trabajo	83

2.2 Efectos de la sobreexpresión de las isoformas de <i>EcR</i> en el ala de la mosca adulta	83
2.3 Papel del receptor de ecdisona en el control del número de sinapsis	85
2.3.1 Diferencias basales en la expresión de <i>GAL4</i> y <i>EcRA</i>	85
2.3.2 Diferencias basales en el número de sinapsis en motoneuronas de larva y adulto	86
2.3.3 Efectos de las isoformas de <i>EcR</i> en la sinapsis de la larva	86
2.3.4 Efecto de la sobreexpresión de <i>EcRA</i> en la sinapsis de adulto	87
2.3.5 Efecto de la isoforma <i>EcRA</i> y dependencia de ligando	88
2.4 El efecto dimórfico sobre las sinapsis tiene una consecuencia funcional en la actividad diaria y la supervivencia.	89
2.5 La sobreexpresión de <i>EcRA</i> alteró la neuritogenesis de una manera dependiente del sexo	91
2.6 Estudio del papel de la determinación sexual en el fenotipo de <i>EcRA</i> sobre la sinapsis	93
2.7 Papel de la señalización esteroidea en la neurodegeneración	95
2.8 Regulación esteroidea y cascadas de señalización de muerte celular	99
2.8.1 Regulación esteroidea y su interacción con el gen proapoptótico Reaper	100
DISCUSIÓN	103
I.- GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE MODULADORES SINÁPTICOS: DIANAS FARMACOLÓGICAS	104-108
1.1. La interacción entre <i>NCS-1</i> y <i>Ric8a</i> como diana terapéutica	104
1.2 Compuestos Imidazólicos: Comp3 como nuevo candidato farmacológico	106

II.- LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL Y EL SEXO BIOLÓGICO JUEGAN UN PAPEL EN LA MODULACIÓN SINÁPTICA	108-113
2.1 El papel de la determinación sexual en la sinapsis	108
2.2 Influencia del sexo en los modelos neurodegenerativos	110
2.3 Efecto sinérgico entre el receptor de ecdisoma y el contexto neurodegenerativo de HD y Alzheimer	111
III.- REGULACIÓN ESTEROIDEA Y APOPTOSIS	114-116
3.1 Papel de los receptores esteroideos en la neuritogénesis a través del control de gener apoptóticos	114
CONCLUSIONES	118
BIBLIOGRAFÍA	120-130
AGRADECIMIENTOS	132

ABREVIATURAS

ABREVIATURA

SIGNIFICADO

<i>APP</i>	Proteína precursora B-amiloide
<i>CaMK</i>	Proteínas Quinasas dependientes de Calmodulina
<i>CNV</i>	Cordón Nervioso Ventral
<i>CSP</i>	Proteínas sensores de Calcio
<i>DCL</i>	Déficit Cognitivo Leve
<i>EA</i>	Enfermedad de Alzheimer
<i>EH</i>	Enfermedad de Huntigton
<i>Frq 1</i>	Frequenina 1
<i>Frq 2</i>	Frequenina 2
<i>MLCK</i>	Quinasa de la cadena ligera de Miosina
<i>NCS1</i>	Sensor de Calcio Neuronal 1
<i>NM</i>	Neuronas motoras
<i>NMDA</i>	Receptores glutamatérgicos de N-metil-D-aspartato
<i>NMJ</i>	Unión neuromuscular
<i>Pr</i>	Probabilidad de liberación
<i>PSEN1</i>	Presenilina 1
<i>PSEN2</i>	Presenilina 2
<i>RPR</i>	Reaper
<i>SNC</i>	Sistema nervioso central
<i>TDAH</i>	Trastorno por déficit de atención con hiperactividad
<i>TH</i>	Terapia hormonal
<i>TRH</i>	Terapia hormonal de reemplazo
<i>TRT</i>	Terapia de reemplazo de testosterona

INTRODUCCIÓN

I.- LA IMPORTANCIA DE LA REGULACIÓN SINÁPTICA

1.1- LA SINAPSIS

El término sinapsis fue introducido por primera vez en 1897 por el fisiólogo Michael Foster en su "Libro de texto de fisiología" y se deriva del griego sinapsis, que significa conjunción.

Las sinapsis son componentes esenciales de las neuronas y permiten que la información se transmita de unas neuronas a otras o de las neuronas a órganos efectores. De ellas depende nuestra sensibilidad y respuesta los estímulos ambientales, el control de las funciones corporales, los recuerdos, el aprendizaje, las emociones, etc, (Lepeta et al., 2016). Existen dos tipos de sinapsis, las eléctricas y las químicas. En las sinapsis eléctricas la comunicación entre neuronas se realiza a través de unos complejos proteicos llamados conexones; cada conexón está formado por seis conexinas. El impulso eléctrico en forma de potencial de acción se transmite de una neurona a otra, al pasar los iones de un citoplasma a otro. Son sinapsis poco abundantes en relación a las químicas, pero con un papel fundamental en sincronización del impulso nervioso en determinados grupos de neuronas.

Las sinapsis químicas son aquellas en las que el impulso eléctrico se convierte en una señal química, y son mayoritarias en nuestro sistema nervioso. En una sinapsis química encontramos siempre tres elementos clave: el terminal presináptico, la hendidura y el terminal postsináptico (Figura 1). En el elemento presináptico se encuentran las proteínas reguladoras de la liberación de los neurotransmisores (NTs). Los NTs se encuentran almacenados dentro de vesículas, preparados para liberarse en la hendidura sináptica ante la llegada de la señal eléctrica en forma de potencial de acción. Al ser liberados, difunden por la hendidura hasta el terminal postsináptico donde se encuentran los receptores específicos de NTs.

Las sinapsis químicas son unidireccionales, la información sólo se transmite desde el terminal presináptico al postsináptico. La otra propiedad a destacar es que la fuerza del efecto sobre la célula postsináptica es variable y es dependiente de la cantidad de neurotransmisor liberado por el terminal presináptico y la cantidad y tipo de receptores del terminal postsináptico.

Las sinapsis son estructuras muy dinámicas que pueden verse modificadas (Roo et al., 2008), (Jordán-Álvarez et al., 2017), por ciclos de luz/ oscuridad, por el aprendizaje, por la edad o por el sexo del individuo además de otros procesos fisiológicos. El período de tiempo en el que pueden tener lugar los cambios sinápticos abarca desde el nanosegundo, durante la fosforilación de proteínas, hasta los años, durante el envejecimiento normal (Mansilla et al., 2018). La regulación en el número y en la fuerza de las sinapsis define toda la actividad cerebral y su desregulación es clave en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades del sistema nervioso. Sin embargo, las vías de señalización que controlan el número de sinapsis y su actividad no son del todo conocidas.

La pérdida de sinapsis es uno de los primeros eventos que suceden en enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer o de Parkinson (Matuskey et al., 2020). En el campo de la psiquiatría, los pacientes con esquizofrenia presentan una leve pérdida de las sinapsis inhibitorias (Osimo et al., 2019). Pero no sólo la pérdida de sinapsis produce alteraciones en la función neuronal. Las modificaciones en los circuitos glutamatérgicos, que derivan en el aumento del número de sinapsis, pueden provocar episodios de epilepsia (Scharfman, 2007). Un exceso de sinapsis y la falta de maduración, es la consecuencia de enfermedades del neurodesarrollo como el síndrome del X frágil o el síndrome de Down (DICTENBERG et al., 2008), (Weitzdoerfer et al., 2001).

Entendiendo la sinapsis como la unidad mínima del cerebro, todas estas patologías donde se vean afectadas las sinapsis en su número y/o actividad pueden agruparse con el término de sinaptopatías. Comprender las causas comunes y las diferencias en la disfunción sináptica asociada a patologías, podría ofrecer nuevas pistas sobre la intervención terapéutica basada en la sinapsis para los trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos.

1.2 TRANSMISIÓN DEL IMPULSO NERVIOSO

Las dendritas son como raíces fibrosas que se ramifican desde el cuerpo celular de la neurona. Al igual que unas antenas, las dendritas reciben y procesan señales de los axones de otras neuronas. Las neuronas pueden tener más de un conjunto de dendritas, conocidas como árboles dendríticos. Un axón es una estructura larga, en forma de cola,

que se une al cuerpo celular en una unión especializada llamada cono de axón. Cuando la neurona recibe la señal sináptica de entrada a través de las dendritas, los potenciales de membrana se transmiten a través del soma hasta llegar al cono axónico donde los potenciales se suman e integran y de donde partirán los potenciales de acción que se transmitirán a lo largo del axón. Muchos axones están aislados con una sustancia grasa llamada mielina. La mielina ayuda a los axones a conducir la señal eléctrica. El axón se origina del soma como una estructura triangular llamada cono axónico; se continúa con el segmento inicial que no posee vaina de mielina y luego con el segmento principal que puede o no tener vaina de mielina, lo que determina la formación de axones mielínicos (de conducción rápida) o axones amielínicos (de conducción lenta).

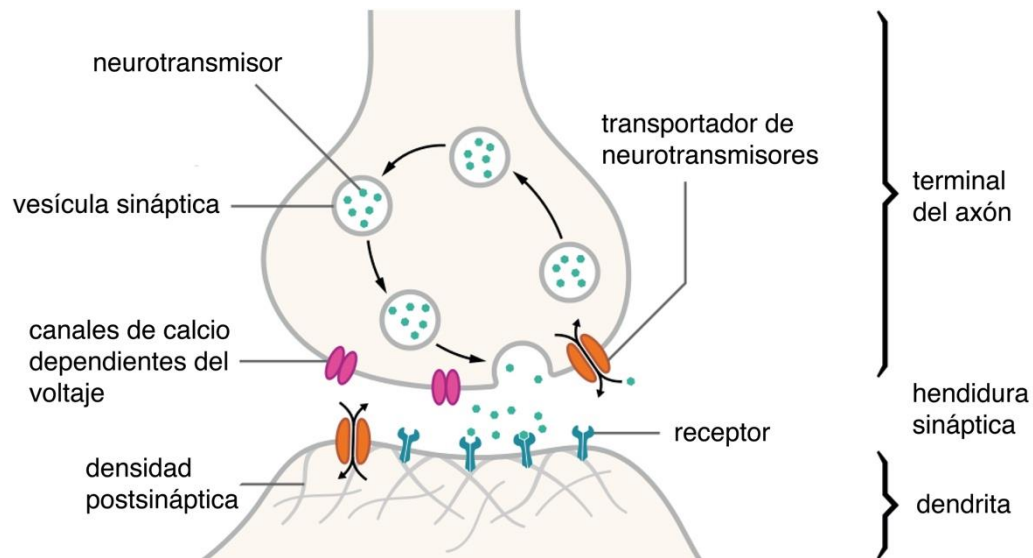


Figura 1. Esquema de los elementos de la sinapsis. El potencial de acción hace que se liberen neurotransmisores a través de la hendidura sináptica, provocando una señal eléctrica en la neurona postsináptica. (Imagen: Por Thomas Spletstoeser)

SINAPSIS QUÍMICA	SINAPSIS ELÉCTRICA
Hendidura: 20 nanómetros	Espacio entre: 3,5 nanómetros
Velocidad: 120m/s	Velocidad: casi instantánea
Sin pérdida de intensidad de la señal	La fuerza de la señal disminuye
Excita o inhibitoria	Sólo excitatoria

Tabla 1. Tabla donde se representan las principales diferencias entre la sinapsis química y la sinapsis eléctrica

La llegada del potencial de acción al botón presináptico supone la entrada del Ca^{2+} , el cual desencadena la liberación de neurotransmisor desde el terminal presináptico hacia el postsináptico. Este trabajo se ha desarrollado en la mosca y el ratón, así bien, la sinapsis debe verse como un dispositivo conservado para la comunicación entre las células neurales de todos los animales; en esencia, la sinapsis consiste en una forma de exocitosis localizada dependiente de Ca^{2+} que constituye la unidad funcional de todos los sistemas nerviosos (Körber&Kuner, 2016).

El Ca^{+2} intracelular modula la unión de vesículas, que contienen los neurotransmisores, a la membrana plasmática del terminal presináptico gracias a la acción del complejo proteico SNARE. Esta interacción es necesaria para acoplar las vesículas sinápticas listas para la exocitosis (Z. Zhang et al., 2013) y favorece la liberación de NTs a la hendidura sináptica (Figura 2). Finalmente, los neurotransmisores se unen al receptor ubicado en la membrana del lado postsináptico, y desencadenan cascadas de señalización que provocan cambios a corto o largo plazo en la célula receptora.

La entrada de calcio en el terminal presináptico requiere un ajuste fino para garantizar el equilibrio correcto en la activación de los procesos dependientes del calcio, este control depende de dos tipos de señales, las señales intracelulares que controlan la entrada de calcio en el terminal presináptico y las proteínas de unión al calcio que responden de manera diferente dependiendo de los niveles intracelulares de calcio.

Sinápsis Química

Pasos de la transmisión sináptica

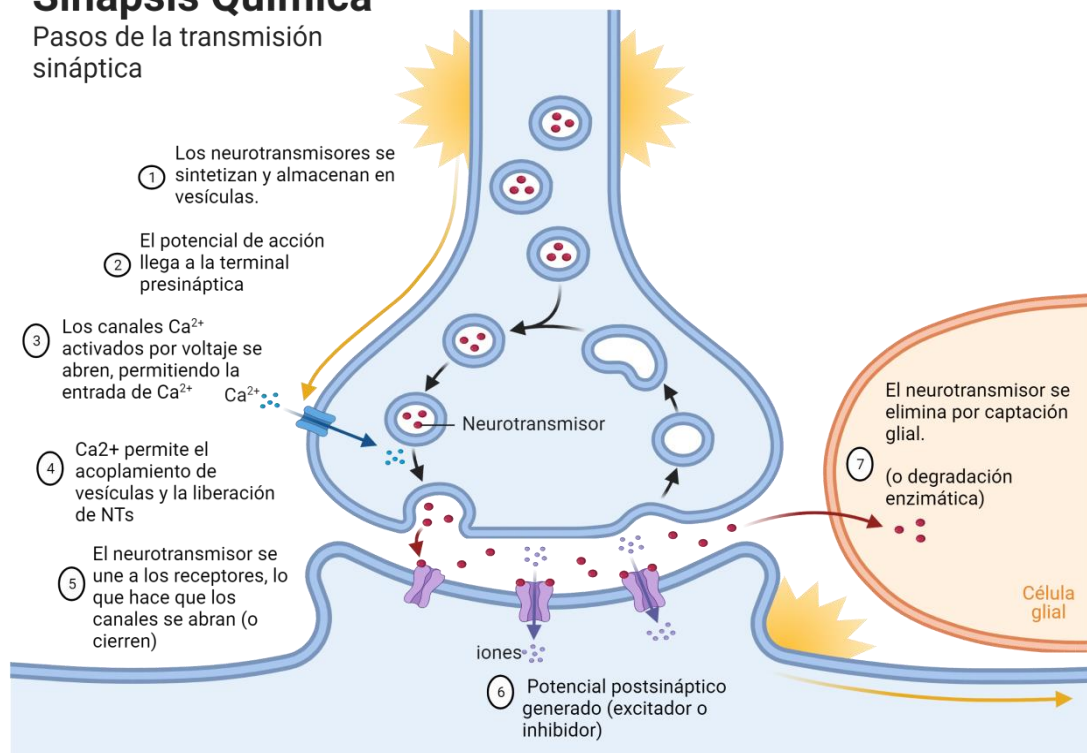


Figura 2. Dibujo que explica las distintas etapas que se suceden en una sinapsis química y la relevancia del ion Calcio. Figura generada con BioRender.

Las proteínas de unión a calcio son un grupo de proteínas que participan en las vías de señalización y almacenamiento de calcio. Aunque las proteínas de unión a calcio son heterogéneas en propiedades y estructura, una característica común es la capacidad de unir Ca^{+2} en dominios específicos.

Un tipo de proteína de unión a calcio son los sensores de Calcio, se caracterizan por su capacidad de cambiar de conformación en función de los niveles de calcio y con ello unirse a dianas específicas y modificar su función. Una vía bien estudiada involucra a la Calmodulina. La unión de calcio a la Calmodulina desencadena una cascada de señalización a través de las proteínas quinasas dependientes de Calmodulina. La activación de esta cascada mejora la eficacia de la transmisión sináptica y, participa en el fenómeno de consolidación de la memoria (Lisman et al., 2002).

Otro sensor de calcio es el sensor de calcio neuronal (*NCS-1*). Fue descubierto por primera vez en *Drosophila melanogaster* con el nombre de Frecuenin (*Frq*) (Pongs et al., 1993) y su secuencia y función se conservan en vertebrados (Nef et al., 1995). La *Frq* / *NCS-1* a través de las proteínas dianas a las que se une, participa en el crecimiento del

terminal sináptico (Dason et al., 2009), en el aprendizaje y la adquisición de memoria. Además es capaz de regular el número de sinapsis y la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Romero-Pozuelo et al., 2007)(Dason et al., 2009).

1.3 REGULACIÓN SINÁPTICA

La complejidad de las funciones del cerebro humano está relacionada con la evolución acelerada de las sinapsis en primates. Las sinapsis pueden operar también independiente del cuerpo celular y su destacada complejidad da como resultado una gran variedad de posibles alteraciones. La disfunción sináptica puede deberse a alteraciones en sus mecanismos moleculares intrínsecos o derivarse de cambios bioquímicos adicionales en el entorno circundante.

Para mantener una función cerebral adecuada es necesaria una buena regulación del número de sinapsis, la actividad de cada sinapsis y un balance adecuado de transmisión sináptica (excitatoria o inhibitoria). Cuando el equilibrio se rompe, puede derivar en patologías aparentemente tan diferentes como ansiedad, depresión, esquizofrenia, trastorno bipolar, espectro autista, además de otras más caracterizadas molecularmente como son las enfermedades neurodegenerativas.

La sinapsis también puede verse afectada por la regulación hormonal. El cerebro contiene receptores para diversas hormonas siendo los mayoritarios los de las hormonas tiroideas (las producidas por la tiroides) y las seis clases de hormonas esteroides, que se sintetizan a partir del colesterol: andrógenos, estrógenos, progestinas, glucocorticoides, mineralocorticoides y vitamina D. Los receptores se encuentran en poblaciones específicas de neuronas en el cerebro. Las hormonas tiroideas y hormonas esteroides se unen a proteínas receptoras que, a su vez, se unen al ADN y actúan como factores de transcripción regulando la expresión de una variedad de genes. Esto puede resultar en cambios a corto plazo o en cambios duraderos en la estructura y función celular. Como resultado, los circuitos del cerebro y su capacidad de neurotransmisión cambian en el transcurso de horas a días. De esta manera, el cerebro ajusta su desempeño y control del comportamiento en respuesta a un entorno cambiante.

El término "sinaptopatía", cada vez más utilizado, se refiere a trastornos del cerebro que han surgido por disfunción sináptica. El término se remonta a una revisión del

laboratorio del Dr. Patrik Brundin (Universidad de Lund, Suecia) al discutir la enfermedad de Huntington como resultado de un fallo sináptico (Li et al., 2003). En su definición más amplia, resume cualquier perturbación en la que mecanismos aberrantes se correlacionan con disfunción sináptica independientemente de su fisiopatología origen. Este hecho pone de manifiesto la importancia de la regulación en el nivel y la función de proteínas sinápticas en el progreso de los trastornos neurológicos. Además, la disfunción sináptica es una característica de varios trastornos neurológicos que no se encuentran explicados por mutaciones genéticas, como son la enfermedad de Alzheimer o la Enfermedad de Parkinson. En el desarrollo patológico de estas enfermedades, la disminución de la densidad de sinapsis y la disfunción sináptica ocurren antes de la muerte neuronal. Por lo tanto, es tentador especular que los elementos moleculares intrínsecos de las sinapsis son candidatos clave para contribuir o incluso causar un funcionamiento defectuoso en el cerebro. A continuación, revisaremos aspectos clave de la disfunción sináptica en los trastornos neurodegenerativos que serán estudiados durante este trabajo.

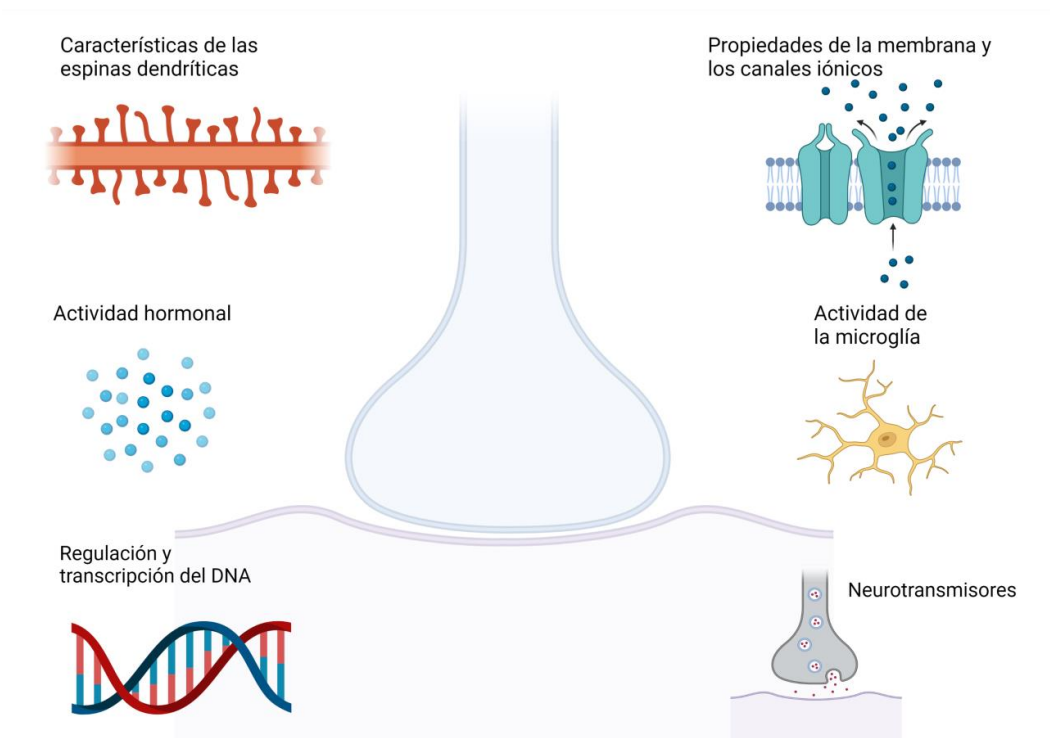


Figura 4. Dibujo que representa los estímulos endógenos y exógenos que pueden modificar la función sináptica. Durante la vida del individuo se suceden cambios fisiológicos en la función sináptica debido a fluctuaciones hormonales, o cambios neurológicos como la variación del número de espinas dendríticas ante una situación patológica, o cambios en la liberación de neurotransmisor. Todos estos cambios conforman la plasticidad sináptica.

1.4 TRASTORNOS NEUROLÓGICOS: ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que representa alrededor del 60% de todos los casos de demencia (Barker et al., 2014)(Ferri et al., 2005). Los signos tempranos de la enfermedad incluyen la pérdida de memoria de eventos o conversaciones recientes. A medida que la enfermedad progresa, una persona con EA presentará un grave deterioro de la memoria y perderá la capacidad para llevar a cabo las tareas cotidianas. La EA es principalmente esporádica. Existen variantes alélicas de determinados genes, como el transportador de colesterol mayoritario en cerebro, conocido como apolipoproteína E (*ApoE*). El tipo *ApoE4* es el mayor factor de riesgo, aparte del envejecimiento, hoy en día, para la aparición de la EA de tipo esporádico. Sólo una pequeña fracción de casos (1-5%) es claramente atribuible a mutaciones familiares. Las mutaciones más comunes ligadas a EA se encuentran en el de la proteína precursora del-amiloide (*APP*) y en las regiones que codifican para el gen de la presenilina1 (*PSEN1*) o presenilina 2 (*PSEN2*) que codifican para las proteasas que cortan la APP (Goate et al., 1991) (Sherrington et al., 1995).

La APP es la molécula precursora del amiloide, cuya proteólisis genera el péptido beta amiloide ($A\beta$), un polipéptido que contiene de 37 a 49 aminoácidos, cuya forma fibrilar es el componente principal de las placas amiloides que se encuentran en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (Figura 5). Los cerebros con EA pueden contener, además, ovillos neurofibrilares, un conglomerado anormal de proteínas compuesto por pequeñas fibrillas entrelazadas dentro de las neuronas, y compuestos principalmente de proteína tau agregada (Mucke & Selkoe, 2012) (D. Selkoe et al., 2012).

La APP es una proteína de membrana que se expresa en muchos tejidos pero que se concentra en las sinapsis de las neuronas. Esta proteína funciona como un receptor de la superficie celular y parte de sus funciones se relacionan con la formación de sinapsis, plasticidad neural, actividad antimicrobiana, y exportación de hierro. En la clínica, observaciones derivadas de dos ensayos clínicos antiamiloides de fase III, han reforzado la idea de que la lucha contra el amiloide depositado no representa la estrategia más eficaz hacia la terapia de la EA (Doody et al., 2014)(Salloway et al., 2014).

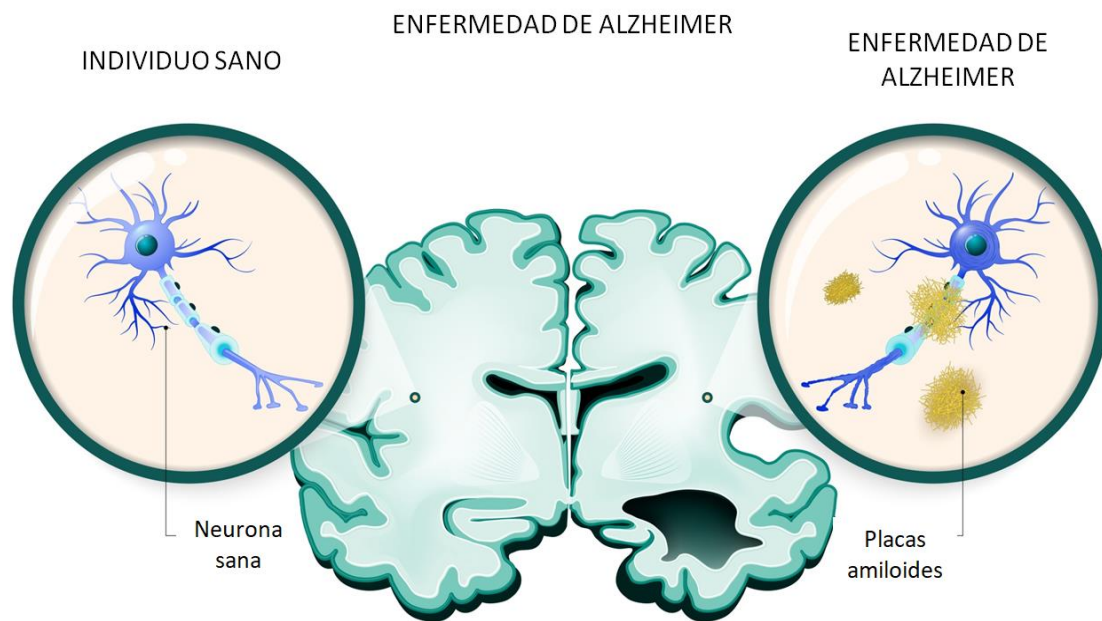


Figura 5. Dibujo que representa la diferencia entre una neurona sana y otra afectada por la acumulación de placas amiloides que deriva en el desarrollo patológico de la enfermedad de Alzheimer

El paradigma acerca del desarrollo patológico de la enfermedad de Alzheimer ha mejorado sustancialmente a lo largo de los años después de descubrir que ni las placas de β -amiloide, ni el volumen de ovillos neurofibrilares se correlacionan con la gravedad del cuadro clínico de demencia asociada a la enfermedad, mientras que sí hay relación directa con la pérdida de terminaciones nerviosas y la disfunción sináptica presente en el deterioro cognitivo (Terry et al., 1991), (Nagy et al., 1995), (Kril et al., 2002).

Los tratamientos farmacológicos actuales, basados en gran medida en mejorar la señalización colinérgica, (que se pierde derivado de la disfunción sináptica), o atenuar la funcionalidad de los receptores NMDA de las sinapsis glutamatérgicas, sólo proporcionan un modesto alivio sintomático de la patología, y no trata la causa subyacente o retrasa de forma significativa la progresión de la enfermedad (D. J. Selkoe, 2011).

A pesar de que las sinapsis no parecen ser el punto de partida para la patología de la EA, se postula la noción de que varios mecanismos patogénicos implicados en el progreso de la enfermedad pueden actuar sinérgicamente para promover la disfunción/pérdida

de sinapsis. Es por ello que las estrategias destinadas a prevenir el fallo sináptico podrían proporcionar un mayor beneficio terapéutico en el declive de los procesos cognitivos de la EA.

1.5 TRASTORNOS NEUROLÓGICOS: ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno cerebral progresivo causado por un solo gen defectuoso. La EH se caracteriza por la muerte prematura particularmente de las neuronas estriatales (principalmente GABA-érgicas), la pérdida de la sustancia gris es extensa y da como resultado el agrandamiento de los ventrículos cerebrales laterales. Debido a la atrofia general, el peso del cerebro puede disminuir en un 40%.

La enfermedad de Huntington se clasifica dentro de las 7.000 enfermedades raras que existen en el mundo, esto es una enfermedad minoritaria que afecta a uno de cada 10.000 habitantes en el mundo. La enfermedad de Huntington, también conocida "corea de Huntington", afecta en España a más 4.000 personas (Rawlins et al., 2016).

El trastorno lleva el nombre de George Huntington, M.D., el médico que lo describió por primera vez a fines del siglo XIX. El gen codifica una proteína llamada huntingtina. La función normal de esta proteína aún no se conoce, pero se llama "huntingtina" porque los científicos identificaron su forma defectuosa como la causa de la enfermedad de Huntington. Este gen se encuentra en el cromosoma 4 y su defecto implica repeticiones adicionales patológicas del triplete CAG conforme al gen de la huntingtina normal, que incluye de 17 a 20 repeticiones. De los 67 exones que tiene este gen, la alteración ocurre en el primero. Este defecto es "dominante", lo que significa que cualquier persona que lo herede de un padre o madre con Huntington eventualmente desarrollará la enfermedad.

La prevalencia de la EH varía más de diez veces entre diferentes regiones geográficas, siendo la población asiática la que presenta menor incidencia. Esta variación puede atribuirse en parte a diferencias en la determinación de casos y / o criterios de diagnóstico.

Los síntomas de la enfermedad de Huntington generalmente se desarrollan entre los 30 y los 50 años. Es de destacar que la forma juvenil de HD representa el 6% de los pacientes en HD. El síntoma distintivo de la enfermedad de Huntington es el movimiento incontrolado de brazos, piernas, cabeza, cara y parte superior del cuerpo. Esta

enfermedad también causa una disminución en las habilidades de pensamiento y razonamiento, incluida la memoria, la concentración, el juicio y la capacidad para planificar y organizar.

La expansión de poliglutaminas impide que la proteína se pliegue correctamente y los mecanismos de proteostasis fallan al intentar eliminar la proteína mal plegada. La huntingtina mutada y los fragmentos derivados pueden entrar al núcleo donde agregan formando las características inclusiones intranucleares, las cuales interfieren con la expresión génica. Este agregado intranuclear secuestra un conjunto de proteínas activadoras o represoras de la expresión génica, afectando a la expresión de diversos genes críticos para la supervivencia neuronal. En esta enfermedad, la disfunción sináptica de nuevo precede a la muerte de la neurona, por lo que conocer los mecanismos implicados en la regulación sináptica puede arrojar luz para mitigar los efectos derivados de la patología de la enfermedad de Huntington.

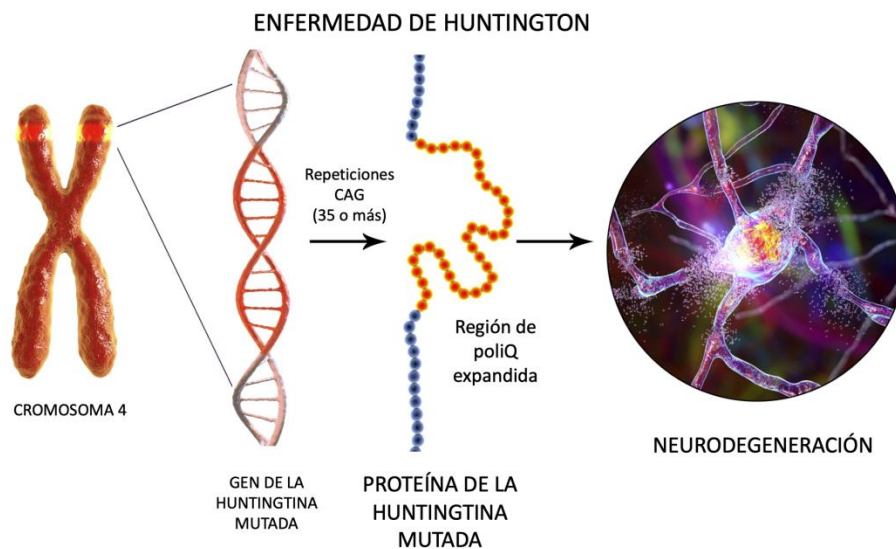


Figura 6. Dibujo esquematizado de la proteína Huntingtina mutada. La expansión patológica de poliglutaminas (tripleto CAG) impiden que la proteína se pliegue correctamente causando degeneración neuronal.

En capítulos anteriores se ha comentado la disfunción sináptica como un evento previo a la muerte neuronal en diversas patologías neurológicas. Por ello, en investigaciones recientes se han descrito diversas estrategias terapéuticas centradas en la posibilidad de corregir esta disfunción. Muchas de ellas, son terapias farmacológicas que residen en la interacción de pequeñas moléculas con proteínas involucrados en la homeostasis

sináptica. En este trabajo describimos algunos de los ejemplos más recientes de dianas farmacológicas que pueden ayudar a revertir el fenómeno de disfunción sináptica.

1.6 INTERACCIÓN NCS1 (Frq2) Y Ric8a COMO DIANA TERAPÉUTICA

Para un correcto funcionamiento de la transmisión nerviosa, es necesario un balance adecuado entre el número de sitios liberadores y la probabilidad de liberación de neurotransmisor, características que se regulan de forma antagónica. En nuestro laboratorio se ha identificado por primera vez, un elemento clave para esta regulación, el sensor de calcio *NCS-1* (*Frq2* en mosca). Los mutantes de mosca con pérdida de función en el gen *Frq2* tienen aumentado el número de sinapsis al tiempo que reducen su probabilidad de liberación. A su vez, mutantes con exceso de función de *Frq2* mostraron el efecto contrario (Dason et al., 2009), (Romero-Pozuelo et al., 2007), (Figura 8). El gen *NCS-1* es un sensor de calcio, que interacciona con otras proteínas modificando su actividad. Previamente en el laboratorio se identificó el complejo formado con la proteína *Ric8a*, (activador de proteínas G independiente de receptor), como una proteína clave para explicar los efectos de *NCS-1* sobre el número y la actividad sináptica. *Ric8a* se une a *NCS-1* (*Frq2* en mosca) con una gran especificidad de unión por los aminoácidos diferenciales R94 y T138 de la *Frq2*. Las proteínas humanas *NCS-1* y *Ric8a* reproducen la unión y mantienen los requisitos estructurales en estas posiciones clave, que se establecieron con los ortólogos de *Drosophila*.

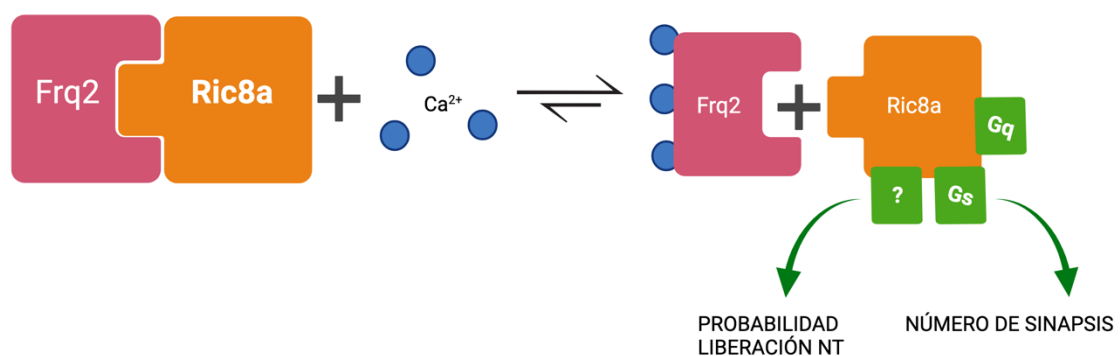


Figura 7. Diagrama resumen con los roles funcionales de las proteínas analizadas. En condiciones normales, *Frq2* (*NCS-1* en humanos) se une a *Ric8a*, impidiendo la señalización a través de las proteínas G. Después de la oleada de Ca²⁺, *Frq2* se une a Ca²⁺, cambiando su conformación. Este cambio libera *Ric8a*, que desencadena la cascada de señalización a través de Gs y Gq para regular el número de sinapsis.

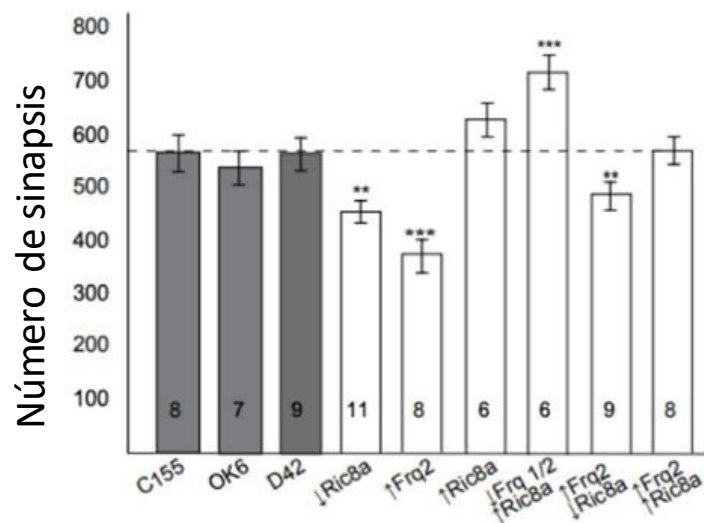


Figura 8. Gráfica de experimentos previos del laboratorio dónde se muestra el equilibrio entre *Ric8* y *Frq2* en la regulación del número de sinapsis (Romero-pozuelo et. al 2014). En gris se muestran los tres promotores *Gal4* (C155, OK6, D42) utilizados en el estudio para mostrar controles con un número de sinapsis equivalentes. La reducción del número de sinapsis se produce al modular la expresión de las construcciones que reducen la expresión de *Ric8a* como en las que sobreexpresan *Frq2*. A pesar de que la sobreexpresión de *Ric8a* ($\uparrow Ric8a$) no produce efectos significativos, en combinación con la eliminación de *Frq2* ($\downarrow Frq2$) da como resultado un fuerte aumento en el número de sinapsis. De acuerdo con esto, la combinación de sobreexpresión de *Frq2* y caída de *Ric8a* ($\uparrow Frq2 \downarrow Ric8a$) muestra una disminución significativa en el número de sinapsis, y la sobreexpresión de *Frq2* y *Ric8a* ($\uparrow Frq2 \uparrow Ric8a$) suprime este efecto. Estos datos indican que *Frq2* actúa como regulador negativo de *Ric8a* en el control del número de sinapsis.

Estas investigaciones llevaron a proponer al complejo *NCS-1/ Ric8a* como una diana terapéutica para las sinaptopatías. Se realizaron experimentos de rastreo virtual con una librería de pequeñas moléculas y se pudieron identificar moléculas inhibitoras de la formación del complejo. Después, Se demostró que inhibiendo la interacción entre *NCS-1* y *Ric8a*, se restaura el número normal de sinapsis en un modelo animal de síndrome de X frágil (Mansilla et al., 2017). Una vez validado el complejo *NCS-1/Ric8a* como diana terapéutica se amplió la búsqueda de moduladores del complejo. Se identificaron un grupo de moléculas de tipo acilhidrazonas que en este caso no inhibían el complejo, sino que lo potenciaban por lo que su aplicación terapéutica podría dirigirse a restablecer la

función sináptica en enfermedades neurodegenerativas. Parte del trabajo de esta tesis ha sido la validación en modelos *in vivo* de uno de estos compuestos.

1.7 RECEPTORES IMIDAZÓLICOS COMO DIANA PARA DISFUNCIONES SINÁPTICAS

Los receptores imidazólicos se identificaron originalmente por su capacidad de unir ligandos adrenérgicos radiomarcados como [3H] Clonidinao [3H] Idazoxan, aunque no actúan como receptores adrenérgicos y su mecanismo de acción no es del todo conocido (Bousquet et al., 1999).

Pueden ser de tres tipos: I1, I2 e I3. Los receptores de interés para esta Tesis son los llamados I2, estos receptores se localizan en las mitocondrias de las neuronas del núcleo arcuato, putamen, glóbulo pálido, glándula pineal (en estos en gran proporción), corteza cerebral, tálamo, hipocampo y amígdala (en estos últimos en una proporción inferior (Bektas et al., 2015). Los receptores I2 no están acoplados a proteínas G, pero actúan como moduladores alostéricos modificando los niveles de monoaminas, siendo una potencial diana farmacológica en el tratamiento de enfermedades mentales, enfermedades neurodegenerativas. Del mismo modo, se conoce, además, que estos receptores están involucrados en la reducción de la temperatura corporal, en la antinocicepción (tanto en dolores agudos como crónicos), en el control central noradrenérgico, en el control del eje hipotálamo adrenal, así como en la regulación de la motilidad del intestino delgado (Bektas et al., 2015).

Recientemente, se ha comprobado que los niveles de receptores imidazólicos I2 estaban aumentados en los cerebros de pacientes que habían fallecido a causa de la enfermedad de Alzheimer (Vasilopoulou, Griñán-Ferré, et al., 2021). Por lo tanto, existe la hipótesis de que estos receptores desempeñan un papel importante en la enfermedad.

En esta tesis doctoral hemos estudiado el papel de compuestos ligando de receptores I₂ de nueva síntesis, en la regulación de patologías sinápticas.

II.-DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO EXPERIMENTAL EN NEUROCIENCIA

2.1 LA INVESTIGACIÓN EN MOSCA

Los animales tienen requisitos fisiológicos fundamentales, al igual que nosotros, las moscas pueden moverse, aprender, respirar o reproducirse. Compartimos historia evolutiva, y muchos de nuestros órganos y funciones tienen orígenes y propósitos comunes, a menudo regulados incluso, por los mismos genes (Figura 9). Además, aproximadamente el 70% de todos los genes conocidos relacionados con enfermedades humanas tienen descritos ortólogos funcionales en *Drosophila melanogaster* (Reiter & Bier, 2002). Debido a su sencilla manipulación, abundante progenie y mantenimiento, la mosca se convierte en una magnífica herramienta para el estudio de las funciones fisiológicas. La investigación con *Drosophila melanogaster* ha contribuido durante décadas a nuestra comprensión tanto de la neurociencia fundamental (Bellen et al., 2010), como de los trastornos neurológicos (Ozdowski et al., 2015); (Tan & Azzam, 2017); (Xiong & Yu, 2018).

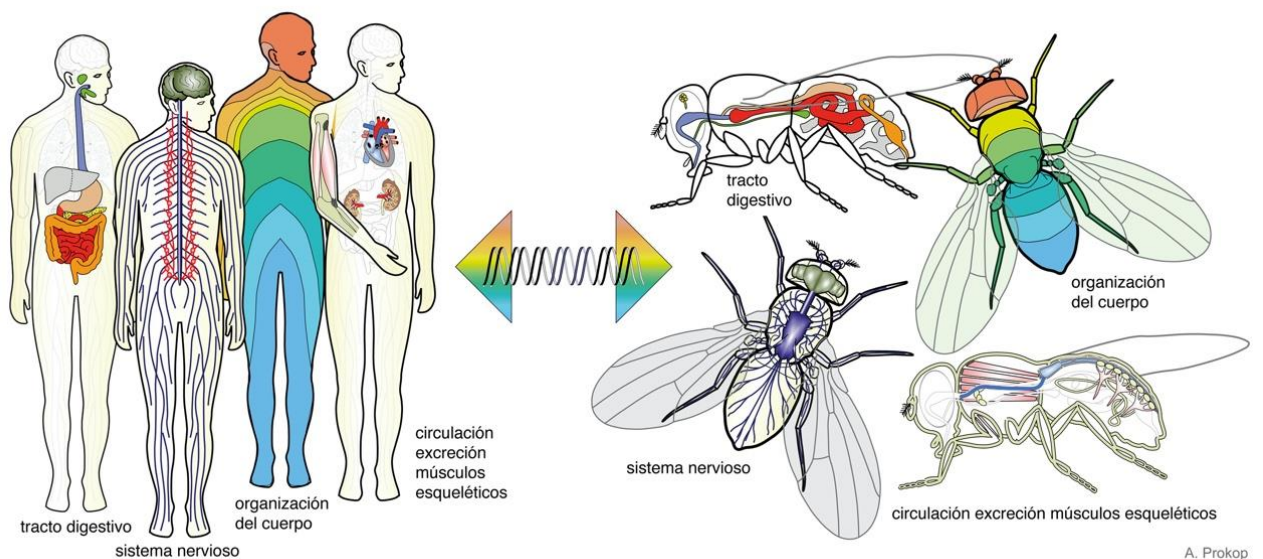


Figura 9. Representación gráfica de las similitudes en la organización anatómica entre el humano y la mosca. (Adaptado de A. Prokop).

2.2 DROSOPHILA MELANOGASTER COMO HERRAMIENTA DE ESTUDIO DEL SISTEMA NERVIOSO

Drosophila melanogaster pertenece al grupo de animales modelo no-mamíferos, dónde se ha podido caracterizar con gran detalle el funcionamiento del sistema nervioso. Su principal ventaja en neurobiología reside en su relativa simplicidad con un número reducido y cuantificable de células y centros neuronales de menor complejidad.

Al hablar del sistema nervioso central (SNC) tanto en moscas, como en humanos encontramos, por un lado, el cerebro (en la región de la cabeza) y por otro, la médula espinal (en el caso de los humanos), o la médula ventral en el caso de la mosca (Figura 10).

El sistema nervioso periférico de ambos organismos se, subdivide en dos segmentos: los nervios motores que conducen información desde el SNC a los músculos y los nervios sensoriales, los cuales conducen información desde los órganos sensoriales al SNC. En ambos organismos, las neuronas sensoriales (o cuerpos celulares de las células nerviosas) se encuentran fuera del SNC. En los humanos, en los ganglios de la raíz dorsal, y en la mosca en la superficie del cuerpo. Igualmente, para ambos organismos los órganos sensoriales están implicados en funciones como el equilibrio, termorregulación o recepción de estímulos nocivos.

Además, los mismos genes dotan de sinapsis y de la capacidad de generar potenciales de acción a las células nerviosas. Este hecho ha llevado a la ciencia a descubrir mecanismos fundamentales en el establecimiento de la sinapsis, incluidos los eventos implicados en patologías neurodegenerativas.

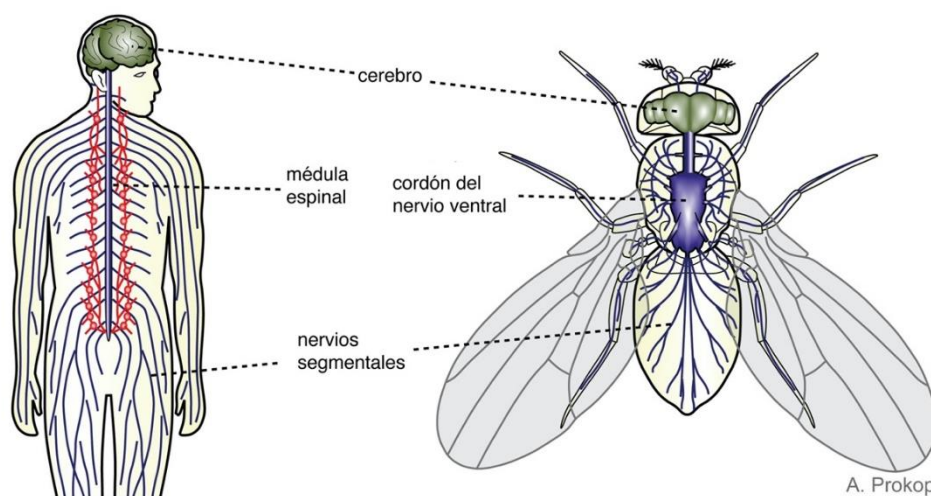


Figura 10. El sistema nervioso, estructuralmente hablando, se encuentra conservado entre los humanos y la mosca. (Adaptado de A. Prokop).

Las uniones neuromusculares (NMJs) de *Drosophila melanogaster* han sido ampliamente utilizadas como modelo de estudio de la fisiología sináptica (J.-Y. Lee et al., 2009). Durante el desarrollo y consecución de las etapas embrionarias, las neuronas motoras extienden sus axones hacia sus correspondientes dianas musculares. Cada axón motor sigue una vía determinada específica para un músculo o grupo de músculos. Una vez en el músculo, las neuronas motoras se ramifican con un patrón característico. Las motoneuronas de vertebrados son colinérgicas, mientras que, en la mosca, las neuronas motoras son glutamatérgicas.

El sistema neuromuscular larvario de la mosca, tiene un patrón relativamente simple que consiste en hemisegmentos abdominales de A2 a A7, de alrededor de 36 neuronas motoras y 30 músculos, similar al abdomen de mosca adulta con hemisegmentos de I a VII (Landgraf & Thor, 2006) (Figura 11) .

En este trabajo usaremos la unión neuromuscular (NMJ) de larva y de adulto de *Drosophila melanogaster* para estudiar los mecanismos de regulación sinápticos en modelos de AD y EH.

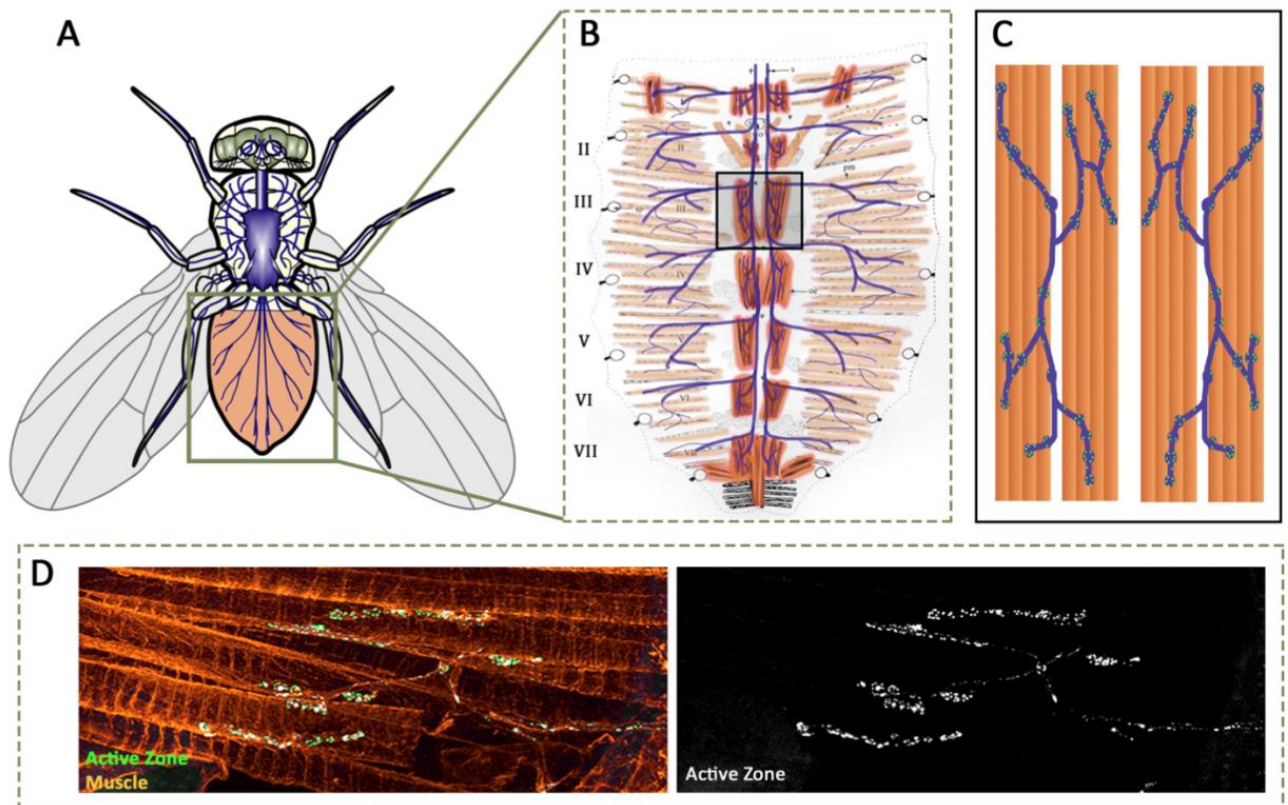


Figura 11. Esquema representativo de la zona ventral anterior del abdomen de la mosca adulta. **(A-C)** Dibujos esquemáticos que muestran el abdomen de *Drosophila melanogaster* y la unión neuromuscular ubicada en el tercer segmento abdominal. **(D)** A la izquierda, imagen de microscopio que muestra las zonas activas (verde) y los músculos (naranja) de la unión neuromuscular. En la imagen de la derecha sólo las zonas activas. Barra de escala = 20 μm Modificado de la tesis doctoral de la Dra. Arnés (Adaptado de A. Prokop y Lawrence y Johnston, 1982).

III. EL PAPEL DEL SEXO BIOLÓGICO EN LA REGULACIÓN SINÁPTICA

3.1 SEXO Y GÉNERO EN DESARROLLOS PATOLÓGICOS

El estudio del sexo en neurobiología está siendo tan relevante como controvertido. Artículos recientes muestran que el sexo influye en la expresión génica en todos los tejidos humanos y condiciona, entre otros aspectos, la respuesta a tratamientos farmacológicos (Oliva et al., 2020).

Todos los animales han desarrollado un repertorio de comportamientos innatos que dan como resultado respuestas sociales y sexuales estereotipadas al medio ambiente. Los esteroides, el genoma o los mecanismos epigenéticos entre otros, están implicados en la presencia de circuitos neuronales sexualmente dimórficos (Shah et al., 2004). Muchas funciones neuronales y conductuales se ven afectadas por diferencias sexuales que incluyen el estado de ánimo, la función cognitiva, la coordinación motora o el dolor, entre otras (Panzica & Melcangi, 2016)(McEwen & Milner, 2017).

Los trastornos y las enfermedades se investigan considerando a los humanos como una población homogénea de individuos, o como una población binaria dicotomizada en dos sexos. Se han observado diferencias sexuales en trastornos psiquiátricos (p. Ej., epilepsia, esquizofrenia, autismo, ansiedad y depresión) trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés y trastornos adictivos), trastornos del neurodesarrollo, enfermedades autoinmunes, trastornos neurodegenerativos (p. Ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple (Young & Pfaff, 2014)(Figura 12). Las razones adscritas al efecto del sexo no se comprenden bien, pero las hormonas sexuales, así como los factores ambientales, se han estudiado ampliamente para explicar este fenómeno (Kodama & Gan, 2019).

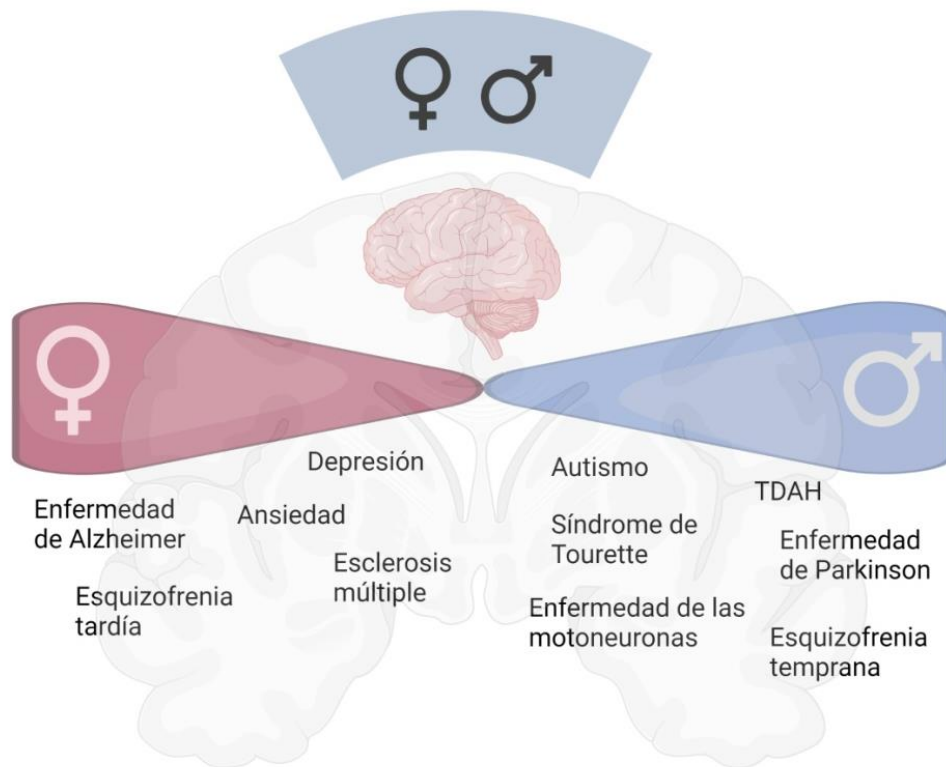


Figura 12. Diferencias de sexo en la prevalencia de trastornos neurodegenerativos y neuropsiquiátricos. Abreviaturas: TDAH, trastorno por déficit de atención con hiperactividad. Ilustración generada con BioRender.

A pesar del conocimiento bien establecido de que los hombres y las mujeres difieren en su predisposición a las enfermedades neurológicas, rara vez se considera el género al tomar decisiones de diagnóstico o tratamiento. Por lo tanto, una mejor comprensión de los fundamentos moleculares detrás de estas diferencias sexuales podría ayudar a desarrollar terapias más dirigidas con mayores tasas de éxito, especialmente en enfermedades donde las diferencias sexuales son más prominentes.

3.2 INFLUENCIA DEL SEXO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Un número sustancialmente mayor de mujeres que de hombres padece la enfermedad de Alzheimer (EA) en todo el mundo (proporción 2: 1 mujeres: hombres).

Una opinión común es que las diferencias de sexo en la frecuencia de la EA se explican en gran medida por la esperanza de vida más larga en mujeres, incluso después del diagnóstico de EA, y por la supervivencia selectiva de los hombres con mejor salud

cardiovascular hasta la vejez. Pero, se ha observado que en los países de ingresos bajos con esperanzas de vida más corta existe una mayor incidencia también en mujeres. Estos resultados sugieren que factores socioeconómicos, como la educación y la ocupación, además de los mecanismos biológicos, están en juego para determinarse como auténticos factores de riesgo.

Además, numerosos estudios han identificado diferencias entre sexos en el espectro completo de manifestaciones clínicas de la EA y a lo largo del continuo de la enfermedad, desde la EA preclínica hasta la demencia grave. En enfermos diagnosticados con déficit cognitivo leve para la EA, se ha descrito que el deterioro cognitivo es más rápido en mujeres que en hombres a lo largo del primer año y se vuelve dos veces más rápido en 8 años (Ferretti et al., 2018). La evidencia disponible indica que los hombres que son diagnosticados con EA tienen más probabilidades que las mujeres de mostrar apatía, agitación y comportamiento abusivo y socialmente inapropiado, mientras que las mujeres presentan con mayor frecuencia depresión, reclusión, inestabilidad emocional, delirios, y deterioro en síntomas afectivos y maníacos (Ferretti et al., 2018). Por otro lado, los niveles de péptido β -amiloide medido con imágenes cerebrales basadas en PET y análisis bioquímicos del líquido cefalorraquídeo no difieren entre los sexos.

Se ha propuesto que el déficit hormonal en mujeres posmenopáusicas, caracterizado por una caída repentina en los niveles de estrógenos circulantes, es un factor de riesgo en la EA (Vest & Pike, 2013). Las hormonas esteroides sexuales también pueden impulsar las diferencias sexuales en la EA a través de sus efectos organizativos durante la diferenciación sexual del desarrollo del cerebro (Pike, 2017).

El estudio y la notificación sistemáticos de las diferencias de sexo en la sintomatología de la enfermedad, los biomarcadores, la progresión, los factores de riesgo y las respuestas al tratamiento serán cruciales para el desarrollo y la implementación de la medicina de precisión en la EA.

3.3 INFLUENCIA DEL SEXO EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La influencia del sexo en la enfermedad de Huntington (EH) no ha sido tan ampliamente estudiado como con la EA, pero varios trabajos muestran que también hay un efecto de género en la presentación fenotípica y la tasa de progresión de la enfermedad en la EH. Algunos trabajos muestran un fenotipo ligeramente más grave y una tasa de progresión

más rápida en las mujeres (Zielonka et al., 2013). Otros estudios, muestran que los pacientes presentan diferencias significativas, y dependientes del sexo, en los síntomas motores, cognitivos y conductuales (Turcano & Savica, 2020). Ambos sexos empeoran los síntomas motores progresivamente, pero hay una disparidad significativa entre los sexos, siendo las mujeres las que presentan sistemáticamente síntomas de mayor gravedad que los hombres. Para los defectos de comportamiento, las mujeres tienen significativamente más síntomas con cuadros depresivos, aunque los síntomas en ambos sexos se volvieron menos severos con el tiempo (Hentosh et al., 2021).

3.4 IMPACTO DEL DIMORFISMO SEXUAL EN NUESTRA COMPRESIÓN DE LOS TRASTORNOS CEREBRALES: PAPEL DE LAS HORMONAS

Durante años el cerebro no fue considerado como una de las dianas principales de la actividad hormonal, excepto el hipotálamo, relacionado con la regulación reproductiva. Ahora sabemos que el cerebro es una diana de la señalización de toda la actividad hormonal.

Ya sea que el criterio final sea lograr diferencias funcionales (para el éxito reproductivo) o similitudes (como la cognición), está claro que algunos circuitos de los cerebros masculinos / femeninos operan bajo restricciones diferentes que pueden manifestarse a nivel genético, molecular, celular y de sistemas. Si el sistema se ve desafiado por factores externos, como el estrés, o internos como la enfermedad, las diferentes organizaciones en los circuitos de los cerebros masculinos y femeninos responderán de manera diferente a los desafíos ambientales (endógenos o exógenos) y emergen como diferentes vulnerabilidades a los trastornos neurológicos y del comportamiento.

3.4.1 HORMONAS ESTEROIDEAS

Los distintos tipos de hormonas se liberan en los vasos sanguíneos o en el espacio intersticial donde circulan solas (biodisponibles), o bien son asociadas a ciertas proteínas hasta alcanzar los órganos o tejidos diana donde actúan.

Dependiendo de su naturaleza química encontramos varios tipos de hormonas:

Hormonas esteroideas: Estas hormonas provienen del colesterol y son producidas principalmente en los ovarios y testículos, además de en la placenta y la corteza adrenal.

Algunos ejemplos son: los andrógenos y la testosterona, producidos en los testículos; y la progesterona y el estrógeno, que se producen en los ovarios.

Hormonas proteicas y peptídicas: Son hormonas formadas por cadenas de aminoácidos como la insulina o el glucagón producidos por el páncreas.

Hormonas derivadas de aminoácidos: Se sintetizan por reacciones enzimáticas a partir de tirosina o triptófano. Ejemplos son la adrenalina de la corteza adrenal o la melatonina de la glándula pineal.

Las hormonas esteroides, pueden ser agrupadas en cinco grupos teniendo en cuenta el tipo de receptor al que se unen: glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos, y progestágenos. Ya que los esteroides son solubles en los lípidos, pueden entrar con bastante libertad desde la sangre a través de la membrana celular al citoplasma de las células diana. En el citoplasma, el esteroide se une a receptores específicos, son receptores nucleares porque actuarán como factores de transcripción. Con la unión del esteroide, muchos tipos de receptores esteroideos dimerizan: Dos subunidades receptoras se unen para formar una unidad funcional que se pueda unir al ADN y que pueda entrar al núcleo celular. Una vez en el núcleo, el complejo ligando esteroide-receptor se une a secuencias específicas del ADN, que generalmente se encuentran a cierta distancia aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, e induce la transcripción de sus genes diana (Figura 13).

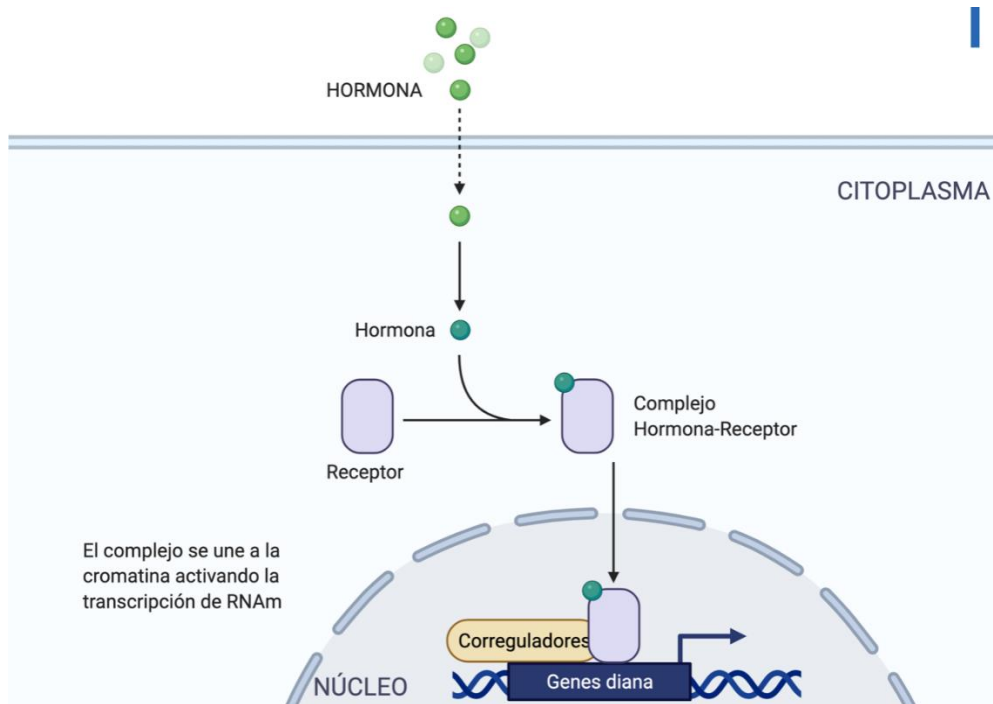


Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de una hormona esteroidea sobre las células diana. Algunos esteroides se unen a un receptor citoplásmico, que luego se traslada al núcleo. Otras hormonas esteroides ingresan al núcleo y luego se unen a su receptor. En ambos casos, el complejo esteroide-receptor puede unirse a un área específica del ADN y activar genes específicos. Imagen generada con BioRender.

3.5.- LA IMPORTANCIA DE LOS ESTEROIDES EN EL DESARROLLO DE PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS

Las hormonas esteroides con actividad en el sistema nervioso se denominan "neuroesteroides" o "esteroides neuroactivos". Pueden ser sintetizados de novo en los sistemas nerviosos central y periférico por neuronas y células gliales o, periféricamente y luego atravesar la barrera hematoencefálica. Aunque se ha demostrado que los niveles de hormonas esteroides en sangre periférica difieren de los que se obtienen en el líquido cefalorraquídeo, la medición de sus niveles plasmáticos será importante para comprender la función cerebral, ya que las hormonas esteroides atraviesan la barrera hematoencefálica.

Las hormonas esteroideas actúan sobre la actividad neuronal de manera no permanente a través de varias vías como, por ejemplo: modulación de las sinapsis glutamatérgicas, GABAérgicas, serotoninérgicas o dopaminérgicas. Pero además los

esteroides tienen la capacidad de alterar permanentemente la estructura del sistema nervioso a través de una variedad de mecanismos, como la mielinización, poda neural, remodelación de la columna dendrítica o la apoptosis.

Los neuroesteroides regulan diferentes áreas del cerebro involucradas en la modulación del estado de ánimo, el comportamiento y la cognición (Pinares-García et al., 2018) (Figura 14).

Concretamente, y hablando de hormonas sexuales, las fluctuaciones hormonales femeninas durante las etapas reproductivas específicas de la vida de una mujer están relacionadas con una mayor susceptibilidad a desarrollar trastornos del estado de ánimo, como trastorno disfórico premenstrual, depresión posparto y depresión perimenopáusicas. La testosterona en varones también fluctúa, pero a lo largo del día, las concentraciones matutinas son aproximadamente un 20-30 % más altas que los valores vespertinos. Aunque está demostrado que los niveles de testosterona influyen en el estado de ánimo y habilidades cognitivas, se ha referido a los niveles globales a lo largo de la vida y no a las fluctuaciones diarias (Zitzmann & Nieschlag, 2001).

Además, los niveles de estrógeno y progesterona también pueden afectar diferentes procesos cognitivos como la toma de decisiones, el reconocimiento de emociones, la consolidación de la memoria emocional y la extinción del miedo (Figura 14) tanto en mujeres como en hombres. Durante el ciclo menstrual, cuando los niveles de estradiol y progesterona son altos, las mujeres muestran mejores habilidades verbales y disminuciones visuales-espaciales. Además, los niveles bajos de estradiol y progesterona en primates no humanos ovariectomizados, inducen déficits de memoria espacial, que se revierten con el tratamiento cíclico de estrógenos en dosis bajas (Rapp et al., 2003).

Sin duda, el estrógeno ha sido señalado como un factor protector crítico en las mujeres que les da la ventaja en enfermedades prevalentes en los hombres, mientras que su rápida disminución después de la menopausia puede perder esta ventaja. Aunque existe un acalorado debate en la literatura sobre los efectos protectores de la terapia con estrógenos para las mujeres posmenopáusicas, en teoría, los estrógenos se contemplan como un gran potencial clínico para los trastornos del SNC debido a sus probadas propiedades neuroprotectoras y neuroactivadoras (Tapia-González et al., 2008) (Spence & Voskuhl, 2012) (Barreto et al., 2021) (Figura 15).

Uno de los estudios más importantes acerca del uso clínico de la terapia hormonal fue realizado por la organización Women's Health Initiative (WHI), que tenía como objetivo prevenir las enfermedades cardíacas, el cáncer de mama y colorrectal y la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. El estudio WHI comenzó en 1992, casi la mitad de las más de 27.000 mujeres posmenopáusicas que participaron en el estudio recibieron una TRH (terapia hormonal de reemplazo) combinada. El estudio WHI se interrumpió antes de lo previsto, en 2002, debido a una cantidad significativamente mayor de eventos adversos no cognitivos asociados con la TRH en comparación con el placebo. Un grupo importante de las participantes se habían sometido a un seguimiento de funciones cognitivas, que revelaron que la TRH tenía un impacto negativo en la memoria verbal, aunque otros dominios cognitivos no se vieron afectados. La TRH no influyó en el riesgo de padecer demencia.

En contraste con los ensayos clínicos, múltiples estudios observacionales han indicado una asociación protectora entre la terapia hormonal y el riesgo de enfermedades neurodegenerativas. Los datos de estudios observacionales se basan en registros de prescripciones médicas de TRH, en los que se ajusta la dosis, el tipo y la duración en función de las comorbilidades de la mujer y se modifican en función del perfil de respuesta individual, lo que podría influir en la diferencia de resultados entre los ensayos clínicos y los resultados de los estudios observacionales (Y. J. Kim et al., 2021). La concentración sérica de testosterona disminuye con la edad tanto en humanos como roedores. Niveles más bajos de testosterona debido a la edad (andropausia) están asociados con una disminución de la función cognitiva y trastornos del sueño, así como un mayor riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Carroll & Rosario, 2012). La terapia de reemplazo de testosterona TRT se está utilizando cada vez más para aliviar la disminución en las funciones físicas en hombres mayores. Aunque los beneficios clínicos de la TRT en los hombres mayores también siguen siendo un tema a debate (Kaufman & Lapauw, 2020).

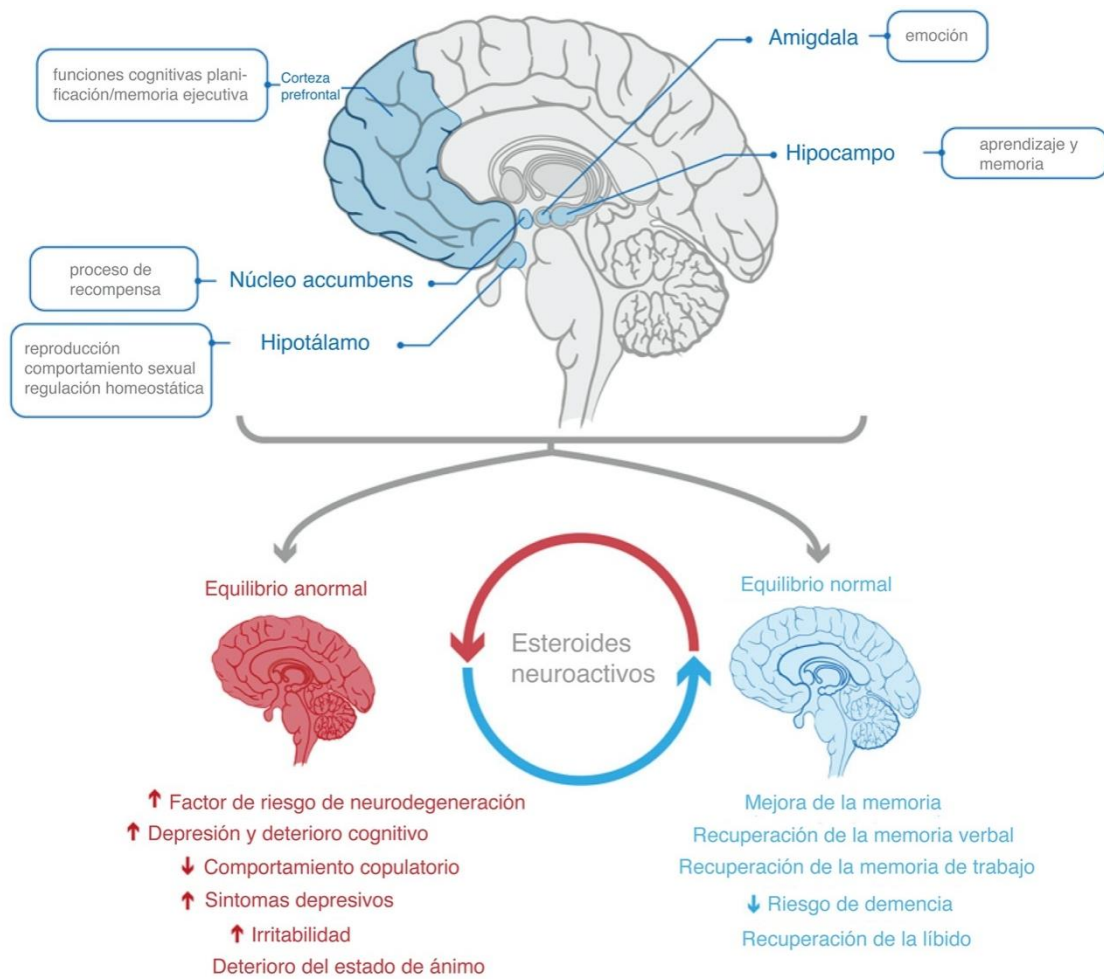


Figura 14. Efecto de los neuroesteroides en la función cerebral. La figura muestra áreas del cerebro reguladas por hormonas esteroides (arriba) y algunos de los efectos que se encuentran cuando está presente un equilibrio normal o anormal entre estrógeno y progesterona (abajo) PFC, corteza prefrontal.

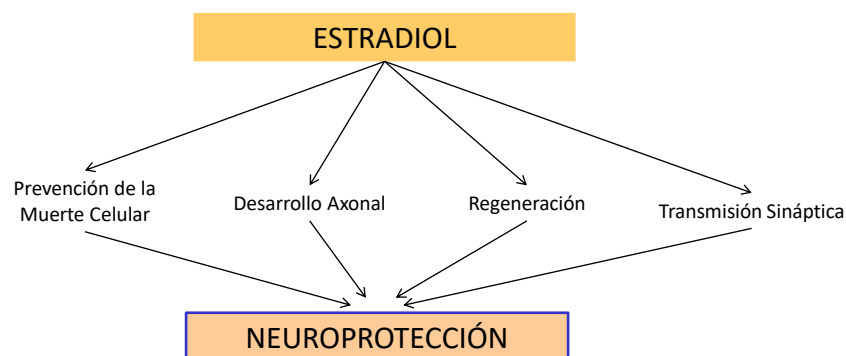


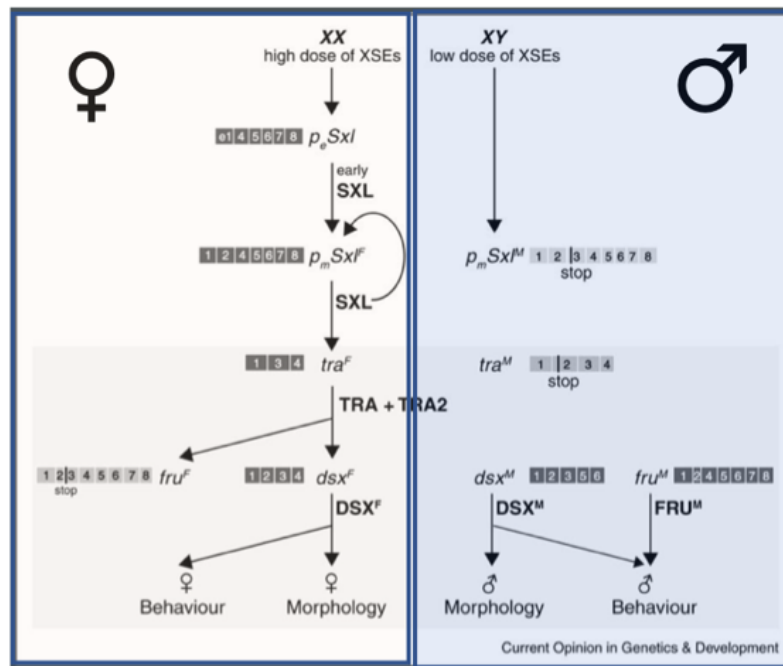
Figura 15. Esquema de varias de las actuaciones del estradiol sobre la neuroprotección, como puede ser la prevención de la muerte celular, la regeneración celular y la mejora de las transmisiones sinápticas promoviendo la formación axonal (Modificado de Garcia-Segura et al., 2001).

Los efectos combinados organizacionales y de activación de los esteroides sexuales producen diferencias sexuales en la patogénesis del cerebro, una variable significativa que debe ser considerada más rigurosamente en futuras investigaciones.

4. CIRCUITOS DIMÓRFICOS Y REGULACIÓN HORMONAL DE LA MOSCA

4.1 GENES DE DETERMINACIÓN SEXUAL

En *Drosophila melanogaster*, los genes de determinación del sexo orquestan el desarrollo y la diferenciación de tejidos específicos estableciendo la fisiología y los circuitos neuronales. Los genes *doublesex (dsx)* y *fruitless (fru)* son dos factores de transcripción fundamentales en la cascada de determinación del sexo. Estos genes establecen la mayoría de los aspectos de "masculinidad" y "feminidad". El control de la expresión de estos genes depende en primera instancia de la proporción de cromosomas X que determina el estado activado / desactivado del gen *Sex-lethal (Sxl)*. En las hembras, donde la relación X: A es 1, se produce la proteína SXL su presencia provoca el corte y empalme del pre-ARNm del gen "*transformer*" (*tra*) de modo que se produce la proteína TRA activa. Cuando *tra* está presente con el producto proteico del gen "*transformer-2 (tra-2)*", el pre-mRNA del gen "*doublesex (dsx)*" se corta y empalma en su forma femenina específica, que codifica para la proteína *doublesex1 femenino (dsxF)*. De manera similar, los pre-ARNm del gen "*fruitless*" (*fru*) se empalman de una manera específica para hembras y no producen ninguna proteína detectable (Figura 15). *Dsx F* interactúa con los genes *hermafrodita (her)* e *intersexual (ix)* para activar la diferenciación femenina y reprimen la diferenciación masculina. En los machos, donde la relación X: A es 0,5, no se produce *Sxl* activo, por lo que el pre-ARNm de *tra* se empalma en una forma específica del macho (*TraM*), que no produce la proteína *tra* activa. Aunque está presente en los machos, *tra-2* no puede actuar sin TRA activo, en consecuencia, los pre-mRNA de *dsx* y *fru* se codifican para su correspondiente forma específica de machos. La proteína *dsxM* específica del macho activa la diferenciación terminal masculina y reprime la diferenciación terminal femenina. La proteína *fruM* específica del macho activa el comportamiento de cortejo masculino (Figura 15).



♀
↓
♂

♀
↓
♂

Comportamiento y morfología Hembra **Comportamiento y morfología Macho**

Figura 15. La cascada de determinación del sexo en *Drosophila melanogaster*. Los recuadros con números indican los transcritos con el número de exón y el tamaño relativo del exón. Los transcritos de color gris oscuro son ORFs de longitud completa y producen una proteína funcional. Los transcritos de color gris claro contienen codones de “stop” y dan lugar a proteínas truncadas no funcionales. Los transcritos se designan con el nombre del gen en cursiva. Las proteínas se designan por su nombre genético en mayúscula. Los superíndices F y M significan transcripción o proteína específica de la hembra o transcripción o proteína específica del macho, respectivamente.

4.2 CIRCUITOS DIMÓRFICOS: NEURONAS DSX

En *Drosophila*, los circuitos sexualmente dimórficos están presentes en muchas partes del sistema nervioso, como las neuronas del circuito double-sex (*dsx*), precisamente caracterizado por la alta expresión del gen *dsx*. Las proteínas *dsx* son parte de la familia *Dmrt* (factor de transcripción relacionado con *mab-3* y *doublesex*), un grupo conservado estructural y funcionalmente de factores de transcripción con dedos de zinc con

funciones importantes en la determinación del sexo en todo el reino animal (Rideout et al., 2010). En *Drosophila melanogaster*, *dsx* dirige la mayoría de los aspectos de la diferenciación sexual somática fuera del SNC. Muchas de estas diferencias están implicadas en el desempeño o el éxito de los comportamientos sexuales y reproductivos (Millington & Rideout, 2018).

El gen *dsx* se expresa en aproximadamente 50 neuronas en el cerebro y en torno a 310 neuronas en el cordón nervioso ventral de las hembras (producen la forma proteica *Dsx F*), mientras que los machos muestran alrededor de 150 neuronas en el cerebro y otras 300 en el cordón nervioso central (forma proteica *Dsx M*) (Rideout et al.,2010) (Rezával et al., 2016).

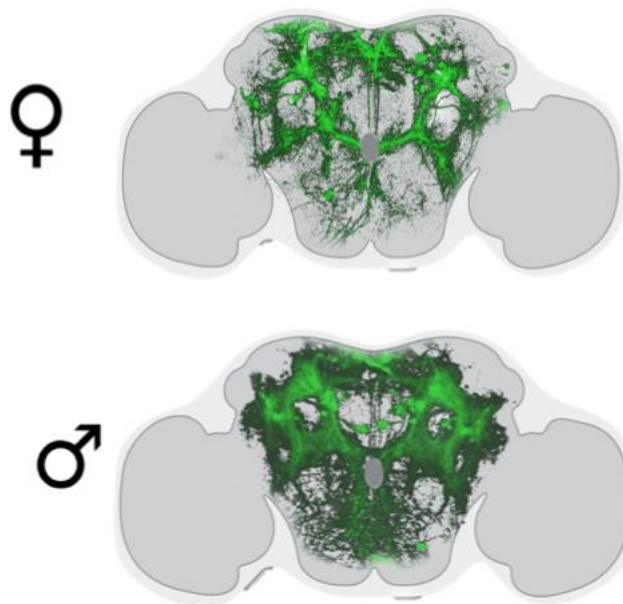


Figura 16. Esquema representativo del patrón dimórfico de expresión en las neuronas DSX por sexo femenino (arriba) o masculino (abajo) en el cerebro adulto de *Drosophila melanogaster*.

5.-LA HORMONA ECDISONA Y EL DESARROLLO DE LA MOSCA

Desde la larva, suceden diversos procesos para la transformación del sistema nervioso para finalmente establecerse el sistema nervioso adulto. El contenido de ecdisona en adultos es relativamente bajo pero dinámico. La señalización de ecdisona promueve la

maduración del SNC e influye en muchos aspectos de la fisiología del adulto como la regulación del sueño o el aprendizaje y la memoria.

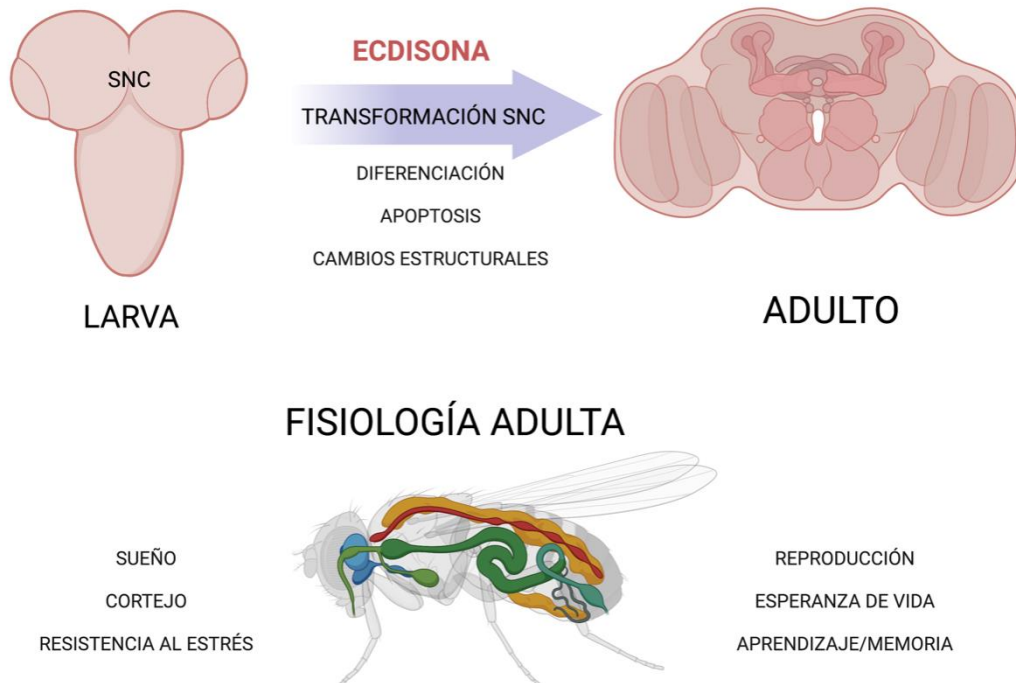


Figura 17. La señalización mediada por ecdisona promueve la maduración del SNC. La señalización hormonal regula cascadas de señalización como la diferenciación o la apoptosis para dar lugar a los cambios estructurales requeridos para el establecimiento del adulto. En la mosca adulta encontramos una fisiología compleja con procesos fisiológicos complejos como la reproducción, el sueño, la resistencia al estrés o el aprendizaje y memoria.

La veinte-hidroxiecdisona (comúnmente conocida como "ecdisona") es una de varias moléculas de señalización de esteroides polihidroxilados conocidas colectivamente como ecdisteroides que funcionan como coordinadores cruciales de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis durante el desarrollo de artrópodos.

En las moscas, la cascada de ecdisona es la principal vía de hormonas esteroides implicada en el desarrollo (Handler, 1982). En el sistema nervioso central, la señalización de ecdisona parece regular la formación de la memoria de cortejo a largo plazo en adultos (Ishimoto et al., 2009) y el sueño (Ishimoto & Kitamoto, 2010) (Figura 17), pero, en las moscas adultas, el papel de la cascada de ecdisona no está bien entendido.

Se produce un pulso de ecdisona justo antes de cada muda larvaria, y estos pulsos desencadenan la expresión de los genes necesarios para que ocurran las mudas. También se producen tres pulsos adicionales de ecdisona dentro del tercer estadio larvario, el último de los cuales controla el inicio de la pupación, lo que indica el comienzo del desarrollo prepupa y luego el proceso pupal. Si no hay pulso de ecdisona o se produce incorrectamente, el animal sufre defectos de desarrollo, que pueden ir acompañados de cambios en el tamaño corporal final o incluso letalidad. Esto demuestra la importancia de esta hormona en la regulación de estas transiciones del desarrollo y para el crecimiento general (Kannangara et al., 2021).

En varias especies, el momento preciso para iniciar la transición de juvenil a adulto está determinado por un aumento de la producción y secreción de hormonas esteroideas en el cerebro. La secreción pulsátil del neuropéptido hipotalámico hormona liberadora de gonadotropina (*GnRH*) induce la producción de hormona luteinizante (*LH*) y hormona estimulante del folículo (*FSH*) en la glándula pituitaria. La *LH* y la *FSH*, a través del sistema circulatorio, llegan a las gónadas para estimular la producción de hormonas sexuales esteroideas. En consecuencia, los niveles crecientes de esteroides sexuales circulantes promueven el proceso puberal para adquirir morfología y fisiología adulta. En *Drosophila* La producción de ecdisona es estimulada por un neuropéptido denominado hormona protoracicotrópica (*PTTH*) (Figura 18). En consecuencia, la ecdisona induce el desarrollo de la transición orquestando los cambios descritos.

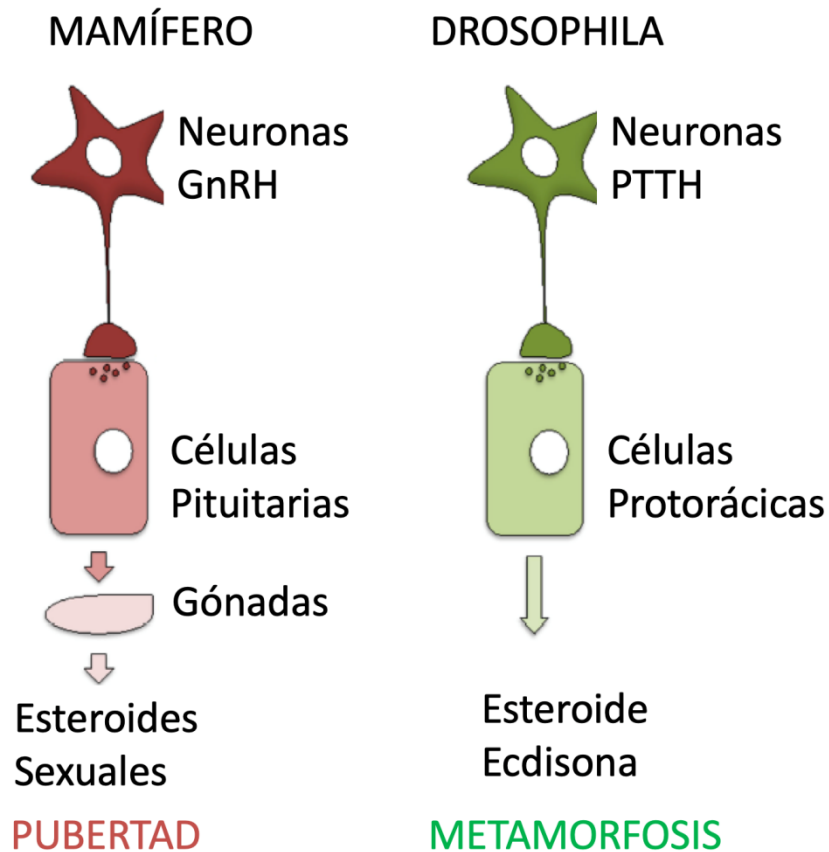


Figura 18. La *GnRH* de mamíferos y la *PTTH* de insectos desempeñan papeles cruciales similares en el inicio de la transición de la maduración juvenil a la adulta. Además, las neuronas *PTTH* en *Drosophila* y las neuronas hipotalámicas *GnRH* en los mamíferos controlan la liberación de hormonas en la PG o la glándula pituitaria a través de la comunicación axonal. (Modificado de C. Schwedes et al., 2011).

5.1 EL RECEPTOR DE ECDISONA

La ecdisona activa un complejo de receptor de hormonas nucleares heterodimérico compuesto por proteínas codificadas por los genes del receptor de ecdisona (*EcR*) y del ultraespiráculo (*usp*) (Koelle et al., 1991), Yao et al., 1992, Yao et al., 1993, Thomas et al., 1993, Thomas et al., 1993). *EcR* es un receptor esteroideo nuclear y actúa como factor de transcripción. Su homólogo en humanos es el receptor Beta del hígado (LXR-Beta) (Figura 19). *EcR* forman heterodímeros con USP, el homólogo humano de USP es el receptor retinoide X (*RXR*). Pero hablando de funcionalidad, el receptor de ecdisona aún el funcionamiento de todos los receptores esteroideos.

Este heterodímero *EcR/USP* regula la expresión de genes que responden a ecdisona mediante la unión a secuencias promotoras específicas denominadas elementos de respuesta a ecdisona (*EcRE*). En el organismo modelo *Drosophila melanogaster*, *EcR* codifica las variantes de *EcRA*, *EcRB1* y *EcRB2*. Las tres isoformas derivan de un solo gen tanto por el uso de promotores alternativos como por corte y empalme alternativo (Ishimoto et al., 2009). Las tres isoformas son capaces de heterodimerizar *USP* y comparten el mismo extremo C-terminal, que incluye los dominios de unión a ligando y de unión a ADN, mientras que los extremos amino son únicos para cada isoforma. Se plantea la hipótesis de que las tres isoformas de *EcR* desempeñan funciones específicas sobre la base de sus distintos patrones de expresión temporal y espacial y las distintas propiedades bioquímicas de sus dominios amino terminales específicos (A. J. Kim et al., 1997).

Durante la metamorfosis, la expresión relativa de las formas de *EcR* influye en el destino celular (C. Schwedes et al., 2011)(Robinow et al., 1993)(Talbot et al., 1993), (Bender et al., 1997)(Kraft et al., 1998), (Schubiger et al., 1998), Rusten et al., 2004), y la interrupción de la función de *EcR* durante el desarrollo conduce a defectos morfológicos graves y letalidad (Davis et al., 2005). Este sistema de señalización está activo en adultos (Schwedes et al., 2011), sin embargo, las funciones adultas de estas moléculas han recibido una atención considerablemente menor, con solo un puñado de estudios que evalúan fenotipos de niveles disminuidos de ecdisona o actividad *EcR*. Sin embargo, estudios en *Drosophila melanogaster* indican que la hormona y el receptor están presentes y activos en adultos y que las mutaciones que disminuyen los niveles de hormonas o receptores afectan diversos procesos como la reproducción, el comportamiento, la resistencia al estrés y la esperanza de vida (C. C. Schwedes & Carney, 2012).

5.2 HORMONAS ESTEROIDEAS Y REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

En este trabajo exploramos la señalización mediada por las vías de muerte celular y su relación con la expresión del receptor de ecdisona, para arrojar luz sobre la implicación de la apoptosis en la disfunción sináptica de las neuronas

La muerte celular programada o apoptosis es uno de los eventos celulares clave para el control preciso de la población neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central. La muerte celular programada es ejecutada por una familia de proteínas conocidas como caspasas. Las caspasas efectoras son el objetivo final en la vía de señalización denominada "cascada de caspasas". Cuando las caspasas efectoras se activan, la célula sufrirá apoptosis, ya que la función de estas proteínas incluye mediar la ruptura nuclear y la degradación celular. Las caspasas efectoras se activan mediante caspasas inductoras, que están estrechamente reguladas por una red compleja de proteínas de señalización. La cascada de muerte celular está conservada entre especies y la activación de las caspasas efectoras funciona de manera similar. Trabajos previos han demostrado que la actividad de la caspasa-6 y la caspasa 3 son mediadores clave de la apoptosis neuronal (LeBlanc et al., 1999; Zhang et al., 2000). La activación de la caspasa-3, es un evento crucial en la programación de muerte de células neuronales durante el desarrollo temprano, aunque también la aparición de neuronas caspasa 3 positivas es una característica de muchas enfermedades neurodegenerativas crónicas (D'Amelio et al., 2012).

La modulación de la apoptosis por los receptores esteroideos está principalmente asociada con el control de la expresión de genes pro-apoptóticos versus anti-apoptóticos, e incluye tanto la inducción como la prevención de la apoptosis según el tipo de célula. Sin embargo, no está claro cómo los receptores esteroideos pueden controlar la expresión del mismo gen, pero en sentidos opuesto dependiendo del tipo celular. Los niveles de hormona, la presencia de co-represores o co-activadores se ha sugerido como uno de los mecanismos de este control dual de la apoptosis (Kaufman & Lapauw, 2020).

Para conocer el papel de las hormonas esteroideas en la regulación de la apoptosis en el sistema nervioso central se han realizado diversas investigaciones centradas en la hormona estradiol. Ensayos con neuronas humanas mostraron que el compuesto esteroide 17-beta-estradiol pero no 17-alfa-estradiol previene la muerte de células

neuronales mediada por caspasa-6 (Y. Zhang et al., 2001). Además, se ha demostrado que el 17-beta-estradiol induce un factor inhibidor de caspasa (*CIF*) que previene la apoptosis neuronal (Y. Zhang et al., 2001).

En la mosca, la apoptosis es inducida por las proteínas proapoptóticas *Grim*, *Reaper* y *Hid*, que antagonizan la función de *DIAP1*, evitando así que inhiba *Dronc*. Cuando *Dronc* está activo, *Drice*, la principal caspasa efectora de la apoptosis en las moscas se activa. Es conocido que la hormona esteroide ecdisona dirige la destrucción masiva de tejidos larvarios obsoletos durante la metamorfosis de *Drosophila*, proporcionando un sistema modelo para definir los mecanismos moleculares de la muerte celular programada regulada por esteroides. La expresión inducida por la ecdisona de los genes activadores de la muerte *Reaper* (*rpr*) y (*hid*) es necesaria para la destrucción del intestino medio larval y las glándulas salivales durante la metamorfosis (Figura 20). (Yin & Thummel, 2004). Existe numerosos trabajos en estadios juveniles de *Drosophila* que demuestran el papel de la regulación por ecdisona en la apoptosis relacionada con el establecimiento de la identidad neuronal (Choi et al., 2006) (Wang et al., 2019) (G. Lee & Park, 2021).

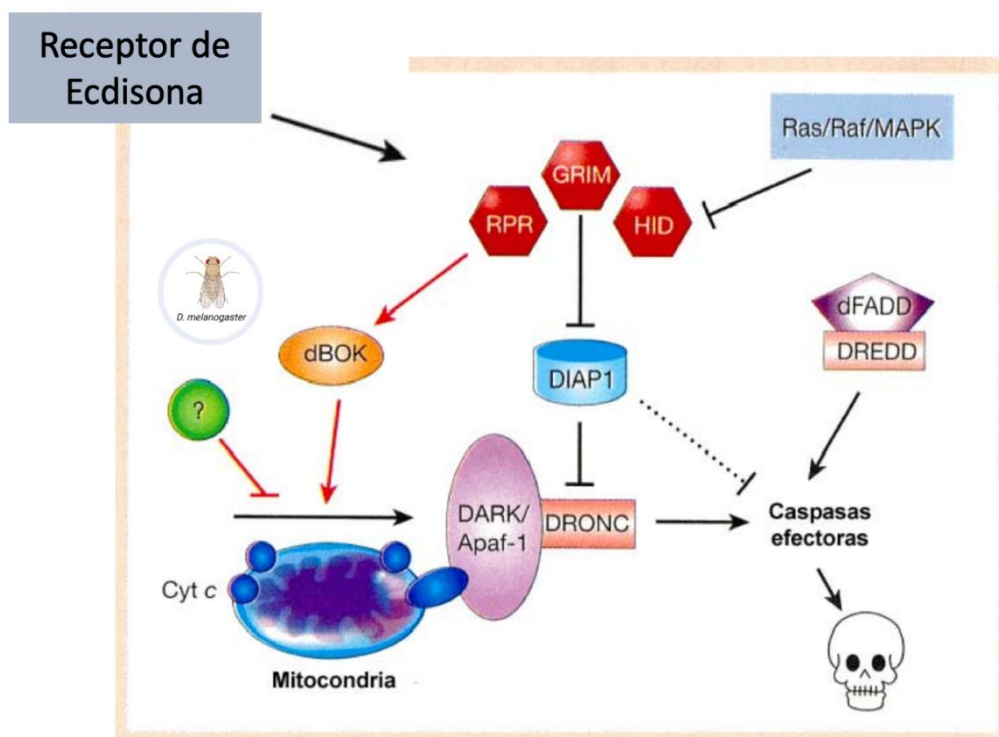


Figura 20. El receptor de ecdisona señala a genes preapoptóticos en la cascada de muerte celular. Los genes proapoptóticos descritos de la mosca son *Reaper*, *Hid* y *Grim* y son los encargados de señalar a *DIAP1*, un regulador de la señalización final efectora de la cascada de muerte (Modificado de (Choi et al., 2006)

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La modulación sináptica es una nueva aproximación terapéutica para las patologías del sistema nervioso independientemente de su etiología. Para una mejor comprensión de la modulación sináptica hay que tener en cuenta el sexo, además de la regulación por parte de receptores esteroideos.

Los objetivos específicos son:

1. Estudiar la modulación de la sinapsis y su papel en las sinaptopatías.
2. Conocer el papel de la señalización esteroidea en el establecimiento sináptico.
3. Definir la implicación del dimorfismo sexual en el desarrollo de las patologías sinápticas.
4. Conocer el papel de la muerte celular y su interacción con la actividad hormonal en el establecimiento sináptico

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- SISTEMA GAL4/UAS. SISTEMA DE EXPRESIÓN BINARIA EN DROSOPHILA MELANOGASTER.

Los sistemas de expresión binaria son las principales herramientas para el silenciamiento y expresión ectópica de genes específicos en *Drosophila*. Están compuestos por un elemento activador de la transcripción que reconoce una secuencia reguladora y activa la transcripción de los genes fusionados a esta secuencia.

El sistema *Gal4 / UAS* se descubrió en *Saccharomyces cerevisiae*. Fue el primer sistema de expresión binaria desarrollado en *Drosophila melanogaster* (Brand & Perrimon, 1993) y constan de dos componentes: el activador transcripcional de levadura, *Gal4*; y un transgén que contiene la secuencia reguladora *UAS* (del inglés *upstream activation sequence*) el cual se coloca por encima de la secuencia del gen de interés. Si ambos componentes del sistema están presentes el factor de transcripción *Gal4* se unirá a la secuencia *UAS* activando la expresión del gen aguas abajo (Figura 1M).

Usando las secuencias promotoras apropiadas es posible modular la expresión de manera espacial y temporal. Además, es también posible reprimir la actividad *Gal4* con la proteína *Gal80* y su isoforma termosensible (*Gal80TS*) (McGuire et al., 2003). *Gal80TS* inhibe la actividad *Gal4* a 18°C, mientras que se inactiva a 30°C, lo que permite que el *Gal4* se una a las secuencias *UAS* y se pueda activar la transcripción. Por lo tanto, los experimentos que utilizan *Gal80TS* permiten regular de una manera muy fina el control de expresión (Figura. 1M)

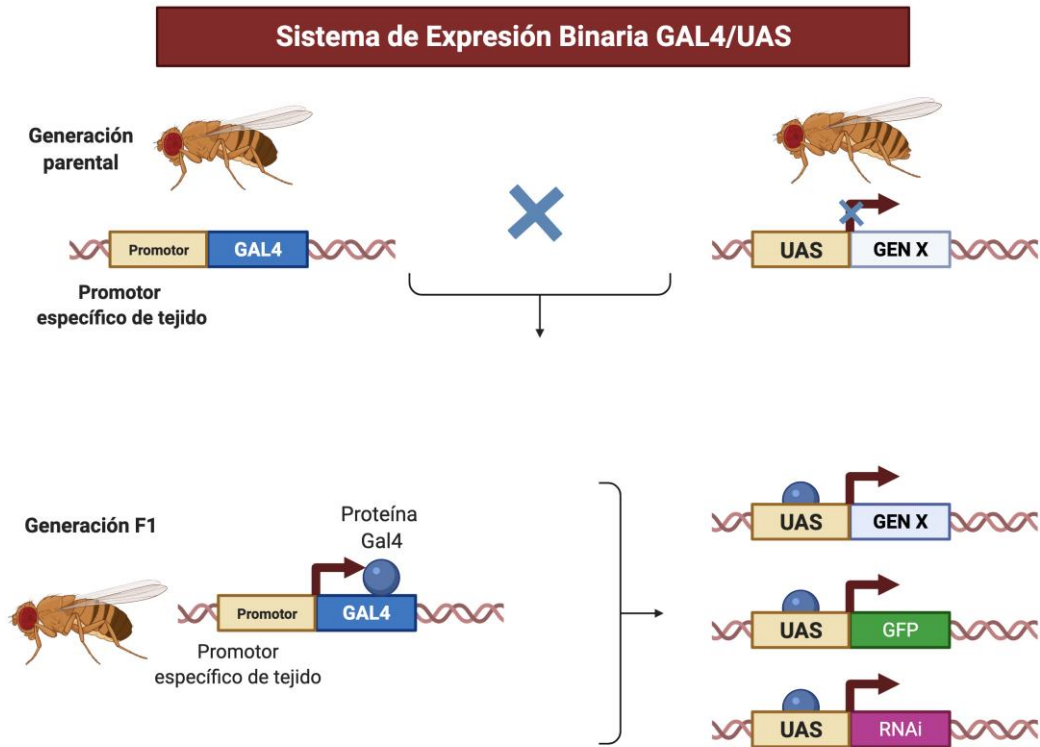


Figura 1M. El sistema *GAL4 / UAS* se puede utilizar para la expresión génica dirigida. Para obtener moscas que expresen un gen de interés ("Gene X") en un patrón específico de tejido, las moscas deben contener un transgén que exprese la proteína activadora de la transcripción *Gal4* bajo el control de un potenciador específico de tejido y un transgén que contenga la secuencia de unión al ADN de *Gal4* (llamada secuencia de activación ascendente o *UAS*) adyacente al gen X. Típicamente, esta combinación se logra mediante el apareamiento de las moscas parentales que contienen cada una un transgén y la selección de la progenie F1 que contiene ambos. En la generación F1 resultante, *Gal4* se expresará y se unirá al *UAS* para activar la transcripción del Gene X de una manera específica de tejido. Es importante destacar que se pueden usar diferentes transgenes que contienen *UAS* en combinación con el mismo promotor *Gal4*. Por ejemplo, un transgén que expresa *Gal4* en el "mushroom body" (MB) o seta del cuerpo de la mosca (conjunto neuronal ubicado en el cerebro de *Drosophila*), se puede combinar con un transgén que contiene un *UAS* para expresar *GFP*, un transgén que anula la expresión de un gen de interés mediante la interferencia de ARN, o un transgén *UAS* que produce un reportero.

2.- LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE DROSOPHILA MELANOGASTER

Todas las cepas de *Drosophila* utilizadas en este trabajo se mantienen de acuerdo con los procedimientos estándares de laboratorio. La gran mayoría de nuestras líneas de

mosca fueron obtenidas de la colección del laboratorio del Prof. Alberto Ferrús del Instituto Cajal (CSIC, Madrid), además de otros centros como el de Bloomington (<http://flystocks.bio.indiana.edu>), o el centro de stocks de Viena (<https://stockcenter.vdrc.at>) excepto donde se indique. Las moscas son mantenidas a 25°C o 17°C según el experimento, en tubos con medio estándar (4% de glucosa, 55 g / l de levadura, 0,65% de agar, 28 g / l de harina de trigo y 4 ml / l de ácido propiónico) en un ciclo de 12 horas de luz / oscuridad con humedad relativa constante del 60%.

Líneas Gal4	Referencia	Lugar donde dirige la expresión
elavC155-Gal4	BL-458	Todo el sistema nervioso
elav-Gal4	BL-8765	Todo el sistema nervioso
D42-Gal4	BL-8816	Motoneuronas y otras neuronas del sistema nervioso
DSX-Gal4; UAS-CD8-GFP	Universidad de Birmingham	Circuito dsx
SalPE-Gal4	Universidad Autónoma de Madrid	Ala

Líneas UAS	Referencia
UAS-CD8-GFP	BL-5130
UAS-ECRA	BL-6470
UAS-EcRA W650A	BL-9452
UAS-ECRB1	BL-6469
UAS-ECRA RNAi	BL-9426
UAS-HTT16Q	BL-33810
UAS-HTT128Q	BL-33808
UAS-Arc2e	Universidad de Cambridge
UAS-mCherryNLS	BL-38424

Tabla 2. Relación de construcciones de mosca utilizadas durante este trabajo

3.- EXTRACCIÓN DE ARN, TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y ENSAYOS DE PCR EN TIEMPO

REAL

Para la extracción del ARN, las moscas de una semana de edad se mantienen en un ciclo luz -oscuridad durante 7 días a 29°C y después las cabezas se recogen en hielo seco. El ARN total se extrae por triplicado de 30 cabezas de adultos de los genotipos Control o sobreexpresión de *EcRA* (*elav-Gal4*). El ARN se extrae mediante columnas con el kit de extracción Total RNA Isolation kit (NZYtech). La concentración de ARN total se mide con

el NanoDrop ND-1000. El cDNA se sintetiza a partir de 1µg de ARN total utilizando la enzima RT Superscript II (ThermoFisher Scientific). Las muestras de ADN codificante (cADN) se diluyen 1:5 y se utilizan para las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real. La reacción de PCR se realiza en un volumen de 20µl mediante el Kit Taqman Universal master mix (ThermoFisher Scientific) por triplicado y utilizando sondas Taqman MGB (ThermoFisher Scientific). Como control interno denominado “housekeeping” utilizaremos *RPL32* (proteína ribosomal L32, ThermoFisher Scientific). En biología molecular, los genes *housekeeping* son típicamente genes constitutivos que se requieren para el mantenimiento de la función celular básica y que no se ven afectados por las situaciones experimentales que se están valorando.

Las PCR en tiempo real se realizan en el termociclador Step One (Applied Biosystems) donde se programan ciclos de 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 55°C durante 1 minuto. Los datos se analizan con el Step One software (Applied Biosystems). Los datos se analizan por cuantificación relativa usando el método de curva patrón

4. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FARMACOLÓGICOS

Las pequeñas moléculas relacionadas con la estabilización del compuesto *NCS-1/Ric8a* se identificaron y sintetizaron en el laboratorio de Química Médica de la Doctora Ruth Perez del Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas de Madrid. La familia de compuestos está protegida por patente y sus estructuras publicadas (Canal Martin et al 2019).

Los compuestos agonistas de los receptores imidazolicos fueron identificados, analizados y sintetizados en el laboratorio de química medica y farmacología de la Doctora Carmen Escolano en la Universidad de Barcelona, en este caso, algunos de los compuestos no se han estudiado en profundidad y los resultados están aún sin publicar por lo que se omitirá información sobre su estructura para preservar la propiedad intelectual.

5.- ENSAYOS DE LOCOMOCIÓN

Se realizaron ensayos de locomoción usando el Drosophila Activity Monitor System o también denominado, sistema de Monitoreo de la Actividad de Drosophila (DAM2) (Trikinetics, Waltham, MA, USA). En este sistema se puede estudiar la actividad y el movimiento durante varios días. El sistema DAM2 cuenta automáticamente el número

de roturas del haz láser que realiza cada mosca al caminar en un tubo horizontal sellado, durante un período de tiempo específico. Los eventos detectados en el transcurso de cada intervalo de muestreo consecutivo, se suman y registran durante el transcurso del experimento para cada mosca (Pfeiffenberger et al., 2010). Esta configuración permite la caracterización de los ritmos circadianos y de la actividad locomotora *Drosophila*. Se registró la actividad diurna de 15 moscas individuales durante 4 días en los monitores DAM2. Las condiciones fueron temperatura de 25°C en ciclos de 12 h de luz / 12 h de oscuridad. Los tubos contenían alimento para moscas con 100 μ M del compuesto a estudiar o el mismo volumen de DMSO. En los 2 primeros días se habituaron las moscas y en los 2 días siguientes se cuantificó la actividad locomotora. Los machos de quince días de edad se colocaron individualmente en tubos para monitorizar la actividad locomotora (DAM2, TriKinetics Inc.).

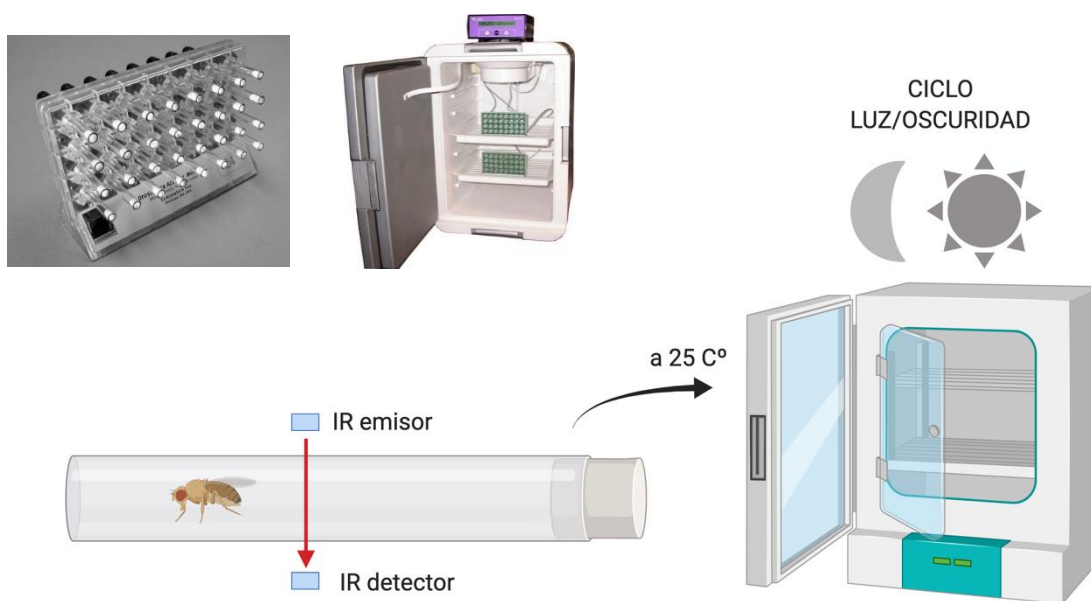


Figura 2M. Montaje experimental del sistema de Trikinetiks, basado en la monitorización de actividad de las moscas. Las moscas se introducen en tubos de manera individual y se mantienen en un incubador conectado a un ordenador a una temperatura determinada y con ciclos de luz/oscuridad programados. A través de cada tubo cruza un sensor infrarrojo que permite monitorizar el número de veces que la mosca cruza el umbral del láser.

6.- ENSAYOS DE GEOTROPISMO O “ESCALADA”

El ensayo de escalada está basado en el comportamiento de geotaxis negativa de las moscas. Este ensayo permite la detección temprana de defectos más leves en la

actividad locomotora y cognitiva, además de poder evaluar estos defectos a lo largo del tiempo. El ensayo se realiza en un cilindro graduado de vidrio, que está sellado con una película de plástico o cera en la parte superior. El ensayo es rentable y no requiere un entrenamiento extenso para obtener resultados altamente reproducibles. Las moscas a partir de un día de edad alcanzan rápidamente la distancia objetivo, determinada al final del tubo, mientras que las moscas mutantes presentan un rango de rendimiento desde leve (o retardado) hasta una incapacidad total para trepar al objetivo. Se colocan 10 tubos por mosca, al golpear el tubo contra una superficie plana, es cómo se origina el experimento, siendo el instante 0 de inicio de tiempo de conteo (Madabattula et al., 2015)



Figura 3M. Representación esquemática del montaje experimental. Se introducen 20 moscas en un cilindro de vidrio y luego se tapan con una película de barrera de cera o papel film. A continuación, se golpean las moscas hasta el fondo para que salgan desde la base del tubo y se indica el número de moscas que cruzan el umbral de 17,5cm. Esto se realiza durante un tiempo de 10 segundos.

7.- EXPERIMENTOS DE SUPERVIVENCIA

Se realizaron 3 réplicas por experimento. Se seleccionaron grupos de 15 moscas macho o hembra dependiendo del genotipo en los experimentos de dimorfismo sexual. Se colocan en viales de comida y son mantenidos a 25°C en humedad constante. Cada 2-3

días, las moscas muertas se cuantifican y los animales vivos se transfieren a un nuevo vial con alimento fresco.

8.- INMUNOFLUORESCENCIA

Como ya se ha comentado anteriormente, se ha utilizado la unión neuromuscular (NMJ) como sistema experimental (Budnik & Ruiz-Canada, 2006).

Los botones de la unión neuromuscular se han utilizado en estudios cuantitativos de la sinaptogénesis. Sin embargo, nuestros años de experiencia nos han mostrado que las sinapsis no se limitan sólo a estos botones, e incluso algunos pueden estar desprovistos de sinapsis. Para solventar este hecho, adoptamos el criterio de contar el número total de zonas activas maduras por unión neuromuscular, independientemente del botón dónde se encuentren.

Las manipulaciones genéticas se dirigieron a neuronas motoras seleccionadas utilizando el sistema binario sistema *GAL4/UAS*. Las larvas se recogen en el tercer estadio y los adultos entre 1-5 días de edad, y tanto los abdómenes de larva, como de adultos, se transfieren a una placa y se inmovilizan con unos alfileres de tungsteno. Durante la disección de la larva, se requiere abrir a través del área ventral para dar luz a los paquetes musculares, dónde se encuentran las motoneuronas. Para visualizar las NMJ del músculo longitudinal ventral abdominal adulto, las moscas adultas se inmovilizan con alfileres a nivel del tórax. Después de la extracción del segmento final, se realiza un corte sagital a través de la pared dorsal. A partir de este punto, se sigue el mismo protocolo que para las NMJ de larva.

Para obtener cerebros adultos, las moscas se colocan en una placa de disección cubierta con PBS e inmovilizados con alfileres de tungsteno. Se quita la probóscide y se abre la cabeza, dejando libre el cerebro del que se extrae el sistema traqueal. Todas las disecciones se realizan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) evitando la deshidratación del tejido. Finalmente, se retira el PBS para cubrir la larva con solución fijadora (formaldehído al 4%).

A continuación, las muestras sean cerebros o abdómenes adultos o pared muscular larvaria, se incuban en solución de bloqueo (PBS, BSA al 5% y Tritón X-100 al 0.4%) para después proceder a la inmunotinción. Primero se incuba durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario. Después de los lavados con PBT (PBS + triton 0.4%), se incuban con

el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron lavados con PBT y las muestras se montaron en un portaobjetos utilizando medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Inc.), se cubre la preparación con cubreobjetos y se conserva a 4 °C.

Las sinapsis se visualizaron bajo microscopía confocal por el anticuerpo monoclonal *nc82* (hecho en ratón, 1:10, DSHB, IA) que identifica la proteína Bruchpilot, homóloga de la proteína *CAST* de mamíferos (Wagh et al., 2006), y que sirve como un marcador específico de zona activa de sinapsis ya que se ubica en el borde de la característica barra en T de la sinapsis de moscas. La membrana neuronal se marcó con anti-*HRP* (del inglés *horseradish peroxidase*) (hecho en conejo, 1: 200, Jackson ImmunoResearch). *HRP* es una glicoproteína de plantas, pero los anticuerpos que reconocen HRP también reconocen una glicoproteína de la membrana de las neuronas de insectos. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa 488 (cabra anti-ratón, 1: 500, Invitrogen) y Alexa 568 (cabra anti-conejo, 1: 500, Molecular Probes). Las larvas se montaron en Vectashield (Vector Labs).

Otro anticuerpo utilizado fue el anti-Caspasa 3 activada (Cleaved Caspase-3, Asp175) anticuerpo #9661 de Cell Signaling. Se obtuvieron imágenes de las preparaciones en un microscopio confocal Leica SP5 (Instituto Cajal, CSIC) y las imágenes se procesaron con ImageJ. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software Imaris (Bitplane).

9.- ENSAYOS FARMACOLÓGICOS EN RATONES

9.1.- MANTENIMIENTO LÍNEAS DE RATÓN

Los ratones de experimentación se han usado de acuerdo con la ley de protección animal para fines experimentales y otros fines científicos (Directiva 2010/63, Real Decreto 53/2013 y Ley 6/2013). Los procedimientos se llevaron a cabo en el animalario del hospital Ramón y Cajal y han sido aprobados por la Dirección General de Agricultura Ganadería y Alimentación de la Comunidad de Madrid. En este trabajo se utilizaron ratones transgénicos mutantes para huntingtina (R6/1) y ratones controles (WT) comerciales B6CBA/Ola (Harlan Laboratorios Models S.L. Barcelona, Spain). Los ratones R6/1 (HD) (50) expresan el exón 1 del gen humano de la huntingtina con 115 repeticiones CAG. Los animales fueron alojados en cubetas con acceso a comida y agua

y en condiciones adecuadas para minimizar el estrés. Se mantuvieron a los ratones a temperatura y humedad controlada y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

9.2.- ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO

Para realizar los ensayos de comportamiento, se separaron cuatro grupos experimentales de ratones procedentes de las mismas camadas cada grupo experimental está formado por 10 ratones, o bien ratones salvajes o ratones HD con el tratamiento farmacológico o con vehículo. El compuesto fue suministrado en el agua de bebida desde los 3 meses de edad y hasta los 4.5 meses la dosis promedio ingerida por los ratones fue de 12,5 mg/Kg/día. La cantidad de agua bebida, de comida ingerida y el peso de los ratones durante las semanas de tratamiento fueron cuantificados cada 3 días

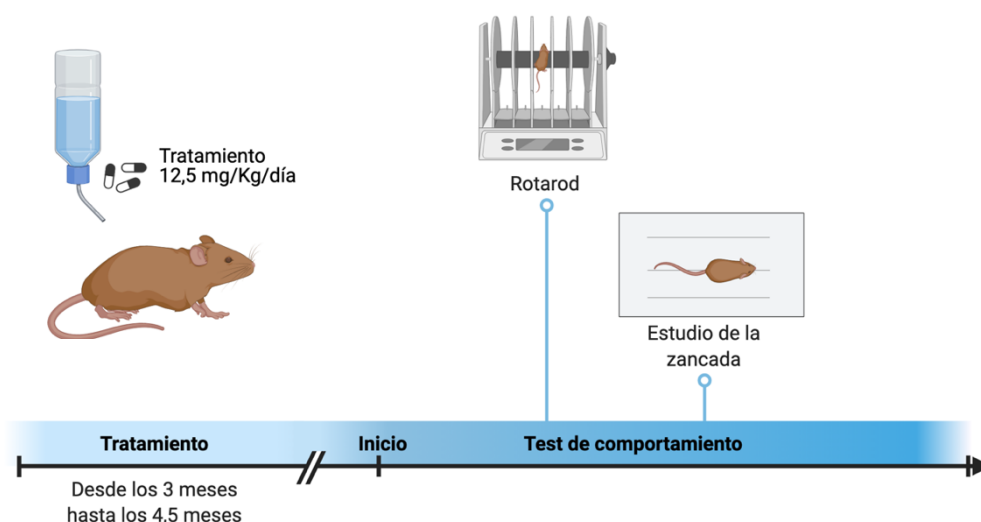


Figura 4M. Los 10 ratones de cada grupo fueron testados en los ensayos de ROTAROD y estudio de la zancada. Tanto grupos control como grupo de prueba fueron tratados con 12,5mg/Kg/día suministrado en el agua de bebida.

9.2.1.- ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO EN RATÓN: TEST ROTAROD

La coordinación locomotora se determinó utilizando un ROTAROD (LE 8200, Panlab S.L). que consiste en un tambor con un eje central estriado (para que el animal pueda sujetarse) de 25 mm de diámetro, y dividido en secciones (una por animal). El eje central se pone en movimiento y permite evaluar el equilibrio, la coordinación o la resistencia de los animales.

En el ROTAROD los ratones realizaron dos pruebas distintas: una a velocidad constante y otra en aceleración. A velocidad constante (4 r.p.m) los ratones tenían que caminar un máximo de 3 minutos y se anotaba el tiempo que aguantaban sin caerse. Esta prueba fue repetida 3 veces con un tiempo de descanso entre cada repetición de 1 minuto. El valor anotado como tiempo sin caerse es la media de las 3 repeticiones.

A continuación, se puso a los ratones a caminar en el ROTAROD a una velocidad que aumentaba gradualmente (de 4 r.p.m a 40 r.p.m en 2 min), se anotaba el tiempo que permanecían sin caerse, y se repitió la prueba 3 veces, dejando un descanso de 1 minuto. El valor anotado como tiempo que aguantaban sin caerse era la media de las 3 repeticiones.

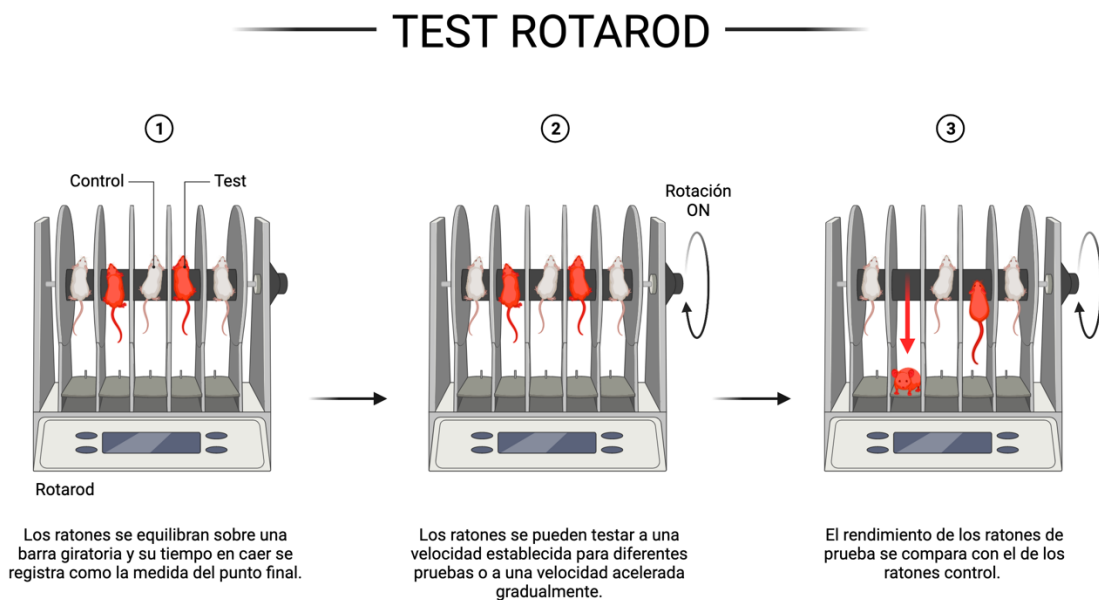


Figura 5M. Dibujo explicativo del funcionamiento del test de comportamiento ROTAROD dónde está representada la varilla giratoria que se mantiene en rotación mientras los individuos se mantienen o van cayendo.

9.2.2.- ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO EN RATÓN: ESTUDIO DE LA ZANCADA

La disminución de la longitud de la zancada es uno de los síntomas típicos de enfermedades neurodegenerativas que cursan con alteraciones motoras, por eso se diseñó un método sencillo para medirla. Este método consta de un corredor iluminado de 7 cm de ancho por 60 cm de largo, que termina en una caja, todo ello colocado sobre un papel de filtro intercambiable. Se tiñeron las patas de 10 ratones de cada grupo

experimental con tinta para tatuaje y se colocaron en el extremo iluminado. Los ratones tienden a ir hacia la caja, dejando sus huellas tintadas en el papel, pudiendo así medirse, posteriormente, la longitud de la zancada de cada ratón con una regla milimetrada. Si en algún tramo el ratón se queda quieto o salta, dicho tramo se excluye del análisis.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizan utilizando el software GraphPad Prism 5 (www.graphpad.com) y el software FaasX (M. Boudinot y F. Rouyer, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette Cedex, Francia) para analizar los datos derivados del ensayo de locomoción de *Drosophila* (TriKinetics Inc, Waltham, MA EE. UU.).

La prueba de normalidad y las varianzas se analizan con la prueba Prueba t de Student y prueba ANOVA con post-hoc de Bonferroni, que se usa para test paramétricos, usando la corrección de Welch cuando es necesario. Los ensayos de supervivencia se analizan con la prueba de Mantel-Cox.

El valor límite p para rechazar la hipótesis nula y considerar las diferencias como estadísticamente significativo es $p < 0.05$ (*). Otros valores de p se indican como ** cuando $p < 0,01$ y *** cuando $p < 0,001$.

RESULTADOS

I.- GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE MODULADORES SINÁPTICOS PARA SU APLICACIÓN EN PATOLOGÍAS DEL SISTEMA NERVIOSO

1.1.- CARACTERIZACIÓN MODELO DE ALZHEIMER DE MOSCA

Para realizar los ensayos farmacológicos en un contexto neurodegenerativo como la enfermedad de Alzheimer elegimos la construcción *UAS* $\alpha\beta$ 42-Arc2E en *Drosophila melanogaster*. Esta construcción permite expresar el péptido beta amiloide de 42 aminoácidos con la mutación Ártica (*Glu22Gly*), en el tejido elegido, en nuestro caso. Expresaremos la construcción en todo el tejido neuronal gracias al *elav-Gal4* que abarca dominio de expresión pan-neural. Utilizando un enfoque similar, trabajos anteriores expresando $\alpha\beta$ 42-Arc2E en el tejido neural de *Drosophila melanogaster*, y mostraron que la disfunción neuronal y la degeneración inducidas por el $\alpha\beta$ 42-Arc2E con la mutación ártica eran más graves que las inducidas por $\alpha\beta$ 42 de tipo salvaje (Crowther et al., 2005). Estos cambios histológicos están asociados con el desarrollo progresivo de déficit en el aparato locomotor, vacuolización del cerebro y muerte prematura de las moscas. La gravedad de la neurodegeneración es proporcional a la propensión del péptido A β 42 a formar oligómeros. Con estos datos hemos realizado ensayos de conteo de sinapsis y actividad locomotora para la validación del modelo de mosca.

Encontramos que las moscas que expresaban $\alpha\beta$ 42-Arc2E ven reducido su número de sinapsis sustancialmente en comparación con mosca control (Figura 1R). Al trasladar el resultado anterior a un experimento de locomoción medido con el monitor de actividad Trikinetics, para constatar el efecto funcional de la pérdida sináptica, vemos que las moscas mutadas tienen un defecto en la capacidad locomotora que no se aprecia en los individuos control (Figura 2R).

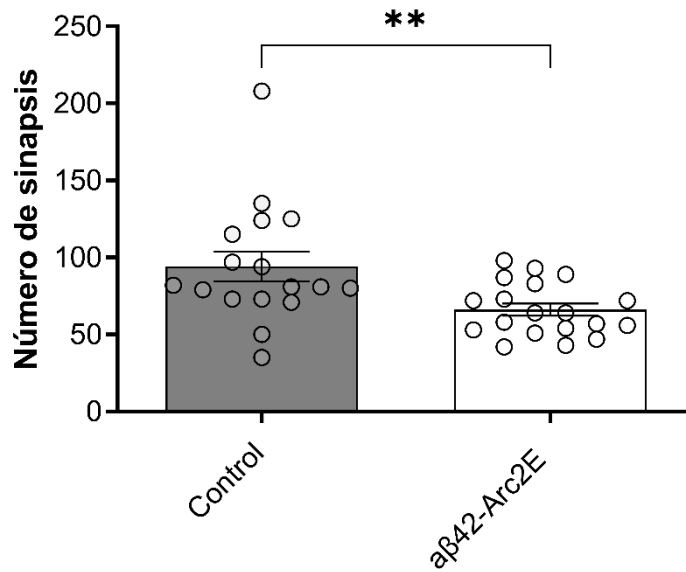


Figura 1R. Efecto de la sobreexpresión de aβ42-Arc2E en el número de sinapsis. Las moscas aβ42-Arc2E están representadas en blanco mientras que las moscas control aparecen en gris. Las moscas aβ42-Arc2E ven reducido su número de sinapsis de manera significativa. Se ha utilizado el promotor *elav-Gal4* que dirige la expresión de aβ42-Arc2E a todas las neuronas. La media ± SEM engloba tres experimentos independientes (T de Student, post-hoc Bonferroni **p -value<0,01)

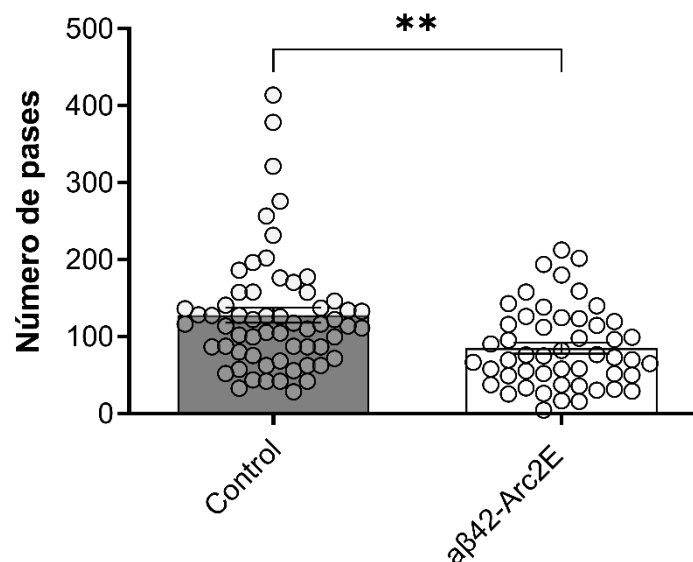


Figura 2R. Efecto de la sobreexpresión de aβ42-Arc2E en la actividad locomotora. Se representa el número de veces que la mosca pasa a través del láser infrarrojo en 72hrs, llamado “número de pases”. Las moscas aβ42-Arc2E están representadas en blanco mientras que las moscas control aparecen en gris. Las moscas aβ42-Arc2E ven reducida su actividad locomotora de manera significativa. Se ha utilizado el promotor *D42-Gal4* que dirige la expresión de aβ42 a la unión neuromuscular. La media ± SEM engloba tres experimentos independientes (T de Student, post-hoc Bonferroni **p -value<0,01)

1.2 ESTUDIO DE UN ESTABILIZADOR DE LA UNIÓN NCS1/RIC8 EN MODELO DE PATOLOGÍA SINÁPTICA

En experimentos previos del laboratorio se probaron un total de 21 compuestos relacionados con la interacción *NCS1/Ric8* obtenidos por la técnica de química combinatoria dinámica. Para que alguno fuese considerado estabilizador, se requirió que al menos en 3 ensayos de co-inmunoprecipitación independientes, se viese un aumento en la cantidad de *Ric8a* unido a *NCS-1* (Canal-Martín et al., 2019). Al final de estos ensayos, solamente los compuestos 3b y A3H18, demostraron tener un efecto significativo estabilizando la interacción de *NCS-1* con *Ric8a*. El compuesto 3b fue el primero en ser identificado como estabilizador y se decidió caracterizarlo más en detalle.

Como se estableció que el compuesto 3b estabiliza la interacción *NCS-1 / Ric8a* y dados los efectos reportados de la interacción de estas proteínas en la regulación del número de sinapsis, y la función sináptica (Romero-Pozuelo et al., 2007 y 2014), analizamos 3b en un modelo *in vivo* de sinaptopatía, donde la pérdida sináptica es una característica principal debido a la expresión de $\alpha\beta 42$ -Arc2E.

Ese modelo se refiere a moscas que expresan $\alpha\beta 42$ -Arc2E o el control correspondiente (LacZ) bajo el promotor *D42-Gal4* (expresión en todas las motoneuronas y algunas áreas cerebrales). Las moscas se alimentaron con el compuesto 3b a una concentración de 100 μM (disuelto en DMSO) o el disolvente, DMSO, durante todo el ciclo de vida. Los datos confirmaron que el recuento de sinapsis se redujo en las moscas $\alpha\beta 42$ -Arc2E, pero este fenotipo patológico se suprimió en gran medida en las moscas que fueron tratadas con el compuesto 3b. Por el contrario, 3b y su disolvente DMSO, no mostraron ningún efecto en las moscas control (Figura 3R). En definitiva, el tratamiento permite a las moscas revertir el fenotipo derivado de la acumulación de péptido amiloide (Canal-Martín et al., 2019) pero sin afectar a las moscas control (Figura 3R).

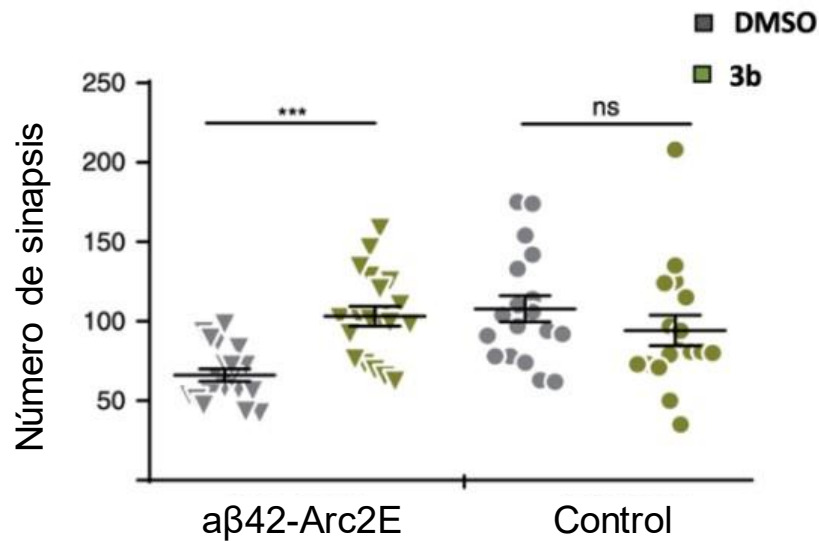


Figura 3R. En este experimento se ha utilizado el promotor *D42-Gal4* que dirige la expresión de aβ42-Arc2E o LacZ a la unión neuromuscular de *Drosophila melanogaster*. Tenemos dos grupos de 20 individuos, por un lado, las moscas con sobreexpresión del aβ42-Arc2E humano (mutación ártica) en las motoneuronas (*D42Gal4*> aβ42-Arc2E). Por otro las que actúan de control, con expresión LacZ, sin cambios en la fisiología de la mosca (*D42Gal4*>LacZ). Ambos grupos se alimentaron con 3b disuelto en vehículo (100 μM) o alimentadas con el mismo volumen de vehículo DMSO. Se analizaron las motoneuronas de individuos adultos de veinte días de edad y se determinó el número de sinapsis (puntos positivos para el anticuerpo *nc82*) de la misma motoneurona, pero en diferentes moscas. Con el software GraphPad fueron analizados los resultados estadísticos. Se tomaron imágenes de microscopía confocal de 1 μm de grosor. Los datos se representan en gráficas, donde cada triángulo gris representa: moscas aβ42-Arc2E alimentadas con vehículo, y triángulo verde moscas aβ42-Arc2E alimentadas con 3b. En el siguiente experimento, cada círculo gris representa moscas de control alimentadas con vehículo, y círculo verde, moscas de control alimentadas con 3b. La media ± SEM engloba tres experimentos independientes. Los datos se analizan estadísticamente con la prueba t de Student dónde*** P <0,001

1.3.- ENSAYOS DE ESCALADA O GEOTAXIS

El ensayo de escalada aprovecha la tendencia natural de *Drosophila* a trepar hacia arriba contra la gravedad, un comportamiento llamado geotaxis negativa. Este ensayo es cuantitativo y mide cuántas moscas han pasado por un marcador en el vial durante un período de tiempo asignado. La medición de la velocidad en lugar del número total de moscas que trepan se ha convertido en un parámetro confiable y muestra diferencias en los casos en que el criterio del número de moscas no es significativo (Madabattula

et al., 2015). Por ello, quisimos comprobar si nuestras moscas de interés tenían algún cambio en su capacidad de escalada.

Las moscas que expresan $a\beta 42$ -Arc2E y el control correspondiente (*LacZ*) se alimentaron con 3b o el disolvente, DMSO, durante todo el ciclo de vida, y se procedió a realizar el experimento de geotaxis negativa cada dos días a lo largo de la vida de la mosca hasta que mueren. Desde el inicio del experimento las moscas $a\beta 42$ -Arc2E sin tratar sufren un efecto acusado de incapacidad de llegar al objetivo, sin embargo, al ser tratadas con el compuesto 3b pueden mantener niveles de subida similares a los controles hasta el día 22 dónde, de nuevo, vuelven a caer a los niveles de las moscas $a\beta 42$ -Arc2E sin tratar (Figura 4R). En controles con o sin tratamiento no encontramos ningún efecto, por lo que en individuos sanos el compuesto no produce ningún cambio. En definitiva, el compuesto 3b ayuda a las moscas $a\beta 42$ -Arc2E a poder realizar correctamente la tendencia natural de geotaxis negativa hasta la mitad de su vida, dónde los efectos de la patología se hacen dominantes (Figura 4R).

Con estos resultados, existe un fenotipo desde el nacimiento de las moscas $a\beta 42$ -Arc2E en la sinaptogénesis que impide que desarrollen su capacidad natural de geotropismo que podemos revertir con el tratamiento con 3b desde el inicio de su vida. Al llegar a la vida adulta, todas las construcciones sufren una caída natural en los valores a partir del día 22 de vida.

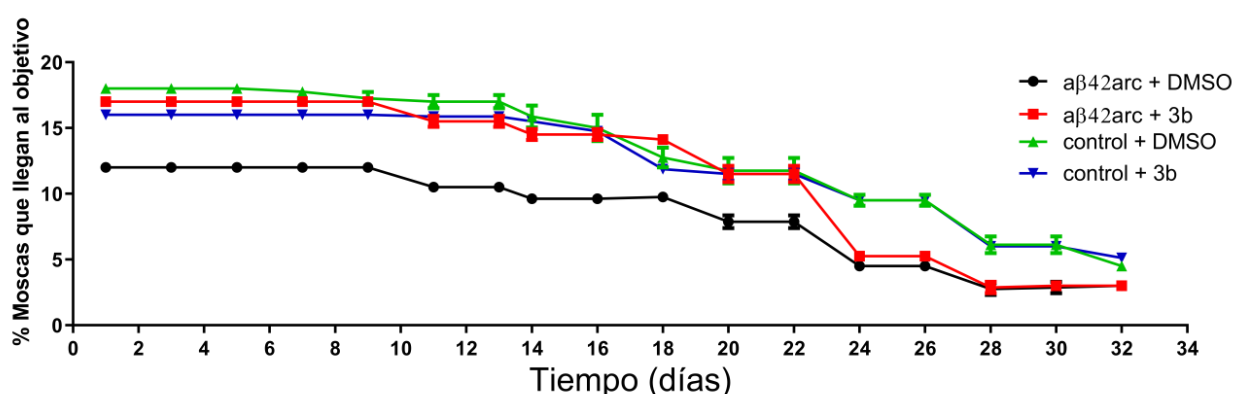


Figura 4R. Se registró el número de 20 individuos de mosca de 15 días de vida que eran capaces de pasar la distancia objetivo del tubo. En el experimento encontramos cuatro grupos, control sin tratar (verde), control tratado (azul), mutantes Ártic $a\beta 42$ -Arc2E tratadas (rojo) y mutantes sin tratar (negro). La media \pm SD engloba tres experimentos independientes.

1.4.- EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON 3b EN LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE LA MOSCA

Para profundizar en la posible recuperación funcional del modelo de sobreexpresión de $a\beta 42$ en *Drosophila* debido al tratamiento con el compuesto 3b, realizamos estudios de actividad locomotora. Las moscas fueron tratadas con el disolvente DMSO o con el compuesto 3b. En las moscas $a\beta 42$ -Arc2E tratadas, encontramos la recuperación del fenotipo de inactividad, ya que presentaban una actividad acumulada por encima de las moscas sin tratar (Figura 5R). Por otro lado, en las moscas control no encontramos diferencias entre las moscas con tratamiento de las alimentadas con el vehículo. En definitiva, el compuesto 3b es capaz de revertir el fenotipo de inactividad derivado de la expresión del péptido amiloide con la mutación Ártica (Figura 5R).

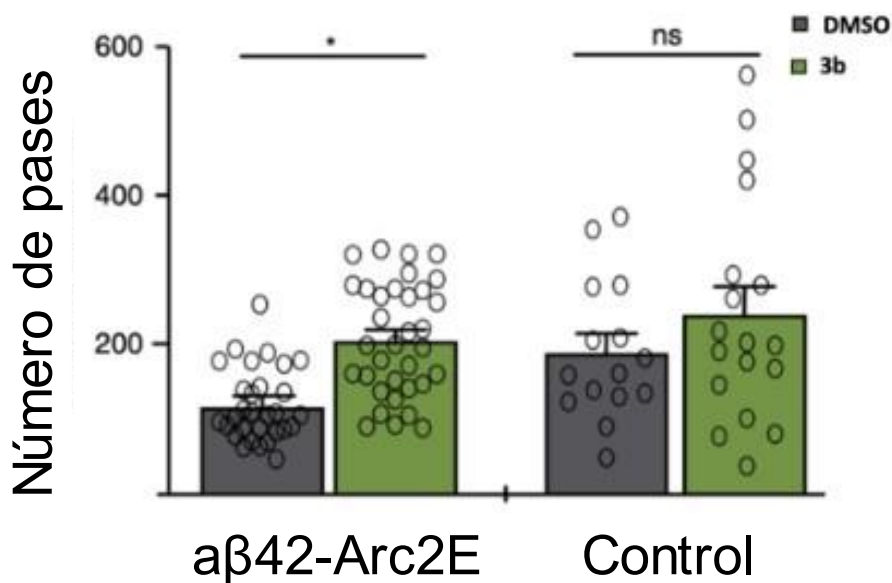


Figura 5R. Efectos del compuesto 3b en moscas tratadas. Se registró la actividad locomotora de individuos de mosca de 15 días de vida durante 48hrs en el monitor de actividad de DAM2, Trikinetics. Se analizó el número total de roturas del haz por hora (número de pases) durante dos días consecutivos (la actividad de los dos primeros días se considera el período de habituación y se descarta). La media \pm SEM engloba tres experimentos independientes que se representaron y analizaron estadísticamente con la prueba t de Student * $P < 0,05$. ns representa: no significativo. (Modificado de Canal-Martín et al., 2019)

1.5.- ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO CON RATONES

1.5.1.- ESTUDIOS DEL PESO EN ANIMALES TRATADOS

En esta tesis, por primera vez se ha probado el efecto del compuesto 3b en un modelo neurodegenerativo de ratón. El modelo utilizado ha sido el de la enfermedad de Huntington (HD). Los animales tratados fueron vigilados diariamente, no encontrándose comportamientos anormales (por ejemplo, esterotipias) ni cambios de ningún en su actividad diaria.

En primer lugar, se analizó la pérdida de peso entre los ratones HD o salvajes con o sin tratamiento. La pérdida de peso es una característica fenotípica del modelo HD de ratón y también de los pacientes que sufren esta enfermedad. Por ahora, no está muy clara la razón de este proceso patológico, existe cierta evidencia clínica de que puede estar ligado a las disfunciones gastrointestinales, además del propio efecto del deterioro cognitivo subyacente. Todos los ratones empiezan el tratamiento con un peso similar (sin diferencias significativas), así bien, los ratones HD desde la primera semana de tratamiento presentan una ligera pérdida de peso que se hizo más acusada a partir de la cuarta semana. Pero, lo interesante, es que los ratones HD tratados con el compuesto 3b experimentaban un retraso temporal en el proceso de pérdida de peso. Este hecho muestra que 3b puede contribuir a ralentizar el efecto de pérdida dramática de peso en los animales HD (Figura 6R).

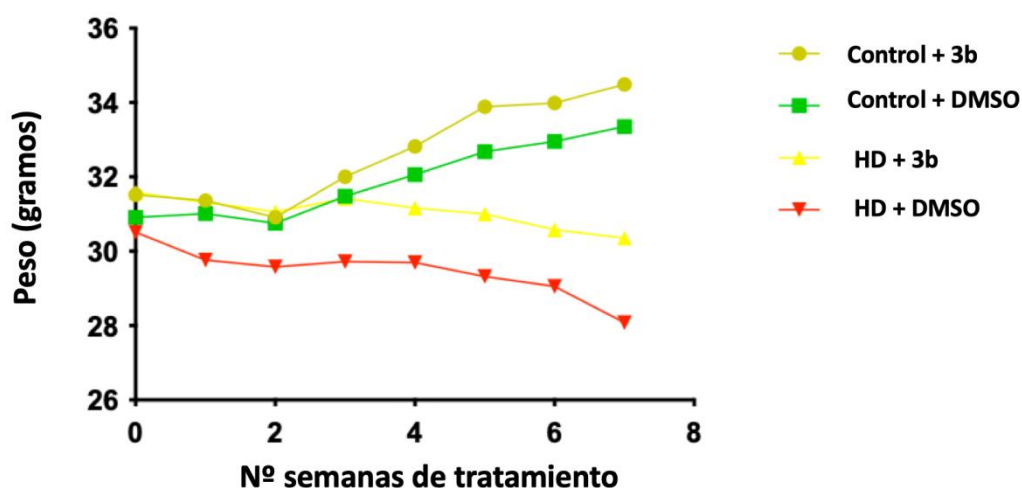


Figura 6R. Representación gráfica de la variación del peso de diez ratones HD y diez ratones control durante ocho semanas de tratamiento. El compuesto 3b puede contribuir a la mejora de la reducción de pérdida peso en los animales HD. En verde se representa el control sin tratar, en mostaza el control tratado con 3b, mientras que en rojo se representan ratones HD sin tratamiento. Los ratones HD alimentados con 3b están representados en amarillo.

1.5.2.– EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON 3b EN LA CAPACIDAD LOCOMOTORA EN RATONES HD

El test ROTAROD es una prueba estándar de comportamiento que nos permite evaluar la coordinación motora, el equilibrio y la fatiga en roedores. Como en anteriores experimentos, quisimos comprobar el efecto del compuesto 3b estabilizador del complejo *NCS1/Ric8a* en la coordinación y equilibrio de ratones con la enfermedad de Huntington. De esta forma, fueron testados cuatro grupos experimentales de 10 ratones cada uno: dos grupos controles tratados o sin tratar con el compuesto, y otros dos grupos de ratones HD, con o sin tratamiento en el agua de bebida.

Cuando comparamos los ratones control con los ratones HD, los ratones con la enfermedad ven muy mermada su capacidad de mantenerse en la varilla giratoria, sin embargo, al alimentarlos con el compuesto 3b (en verde en la figura 7R), el tiempo de permanencia en el ROTAROD aumenta. En definitiva, cuando alimentamos a los ratones HD con 3b, éstos son capaces de aumentar su tiempo de permanencia por encima de los niveles de los ratones HD sin tratar, y con relevancia estadística (Figura 7R).

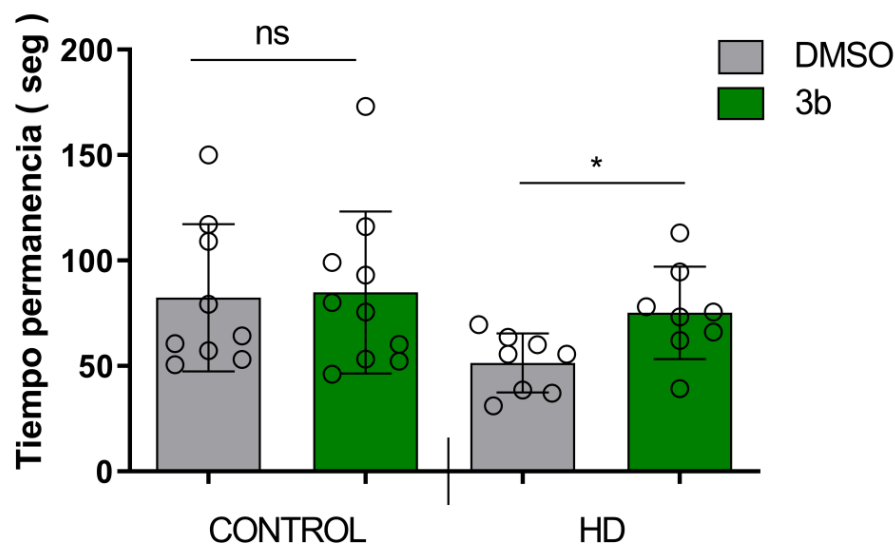


Figura 7R. Efectos del compuesto 3b en la coordinación motora de ratones HD y control. Se registró el tiempo de permanencia en el ROTAROD de 4 grupos de individuos de 10 individuos por grupo. Dos bloques de datos, en el bloque de la izquierda se representan los ratones control. El bloque de la derecha muestra los animales EH. En gris los animales sin tratar y en verde los animales tratados con el compuesto 3b. Los datos se representaron y analizaron estadísticamente (ANOVA, post-hoc Bonferroni) *P-value <0,05. ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM.

1.5.3.- ESTUDIO DE LA ZANCADA EN ANIMALES HD

Como ya hemos podido comprobar con el ROTAROD, las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington cursan con alteraciones motoras. Un estudio complementario al ROTAROD es el estudio de la zancada, que nos permite conocer la dificultad de estos animales para coordinar sus movimientos. Los animales HD ven reducida la longitud de su zancada en casi 10 milímetros menos que los animales control (Figura 8R). Mientras que nuestros animales HD alimentados con 3b parecen expresar una tendencia a revertir el efecto fenotípico de descoordinación motora propio de esta patología, pero no con significancia estadística (Figura 8R). Por lo que podemos concluir que, aunque exista una tendencia de los datos de mejora del fenotipo, el compuesto 3b puede no generar alteraciones en la longitud de la zancada.

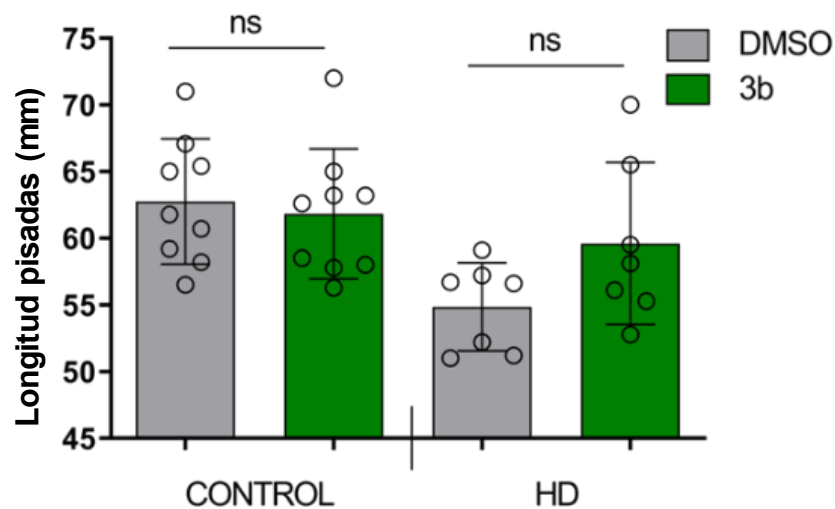


Figura 8R. Efectos del compuesto 3b en la longitud de la zancada de ratones HD y ratones control. Se la longitud de las pisadas (mm) de 4 grupos de individuos. Dos bloques de datos, en el bloque de la izquierda se representan los ratones control. El bloque de la derecha muestra los animales EH. En gris los animales sin tratar y en verde los animales tratados con el compuesto 3b. Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba (ANOVA, post-hoc Bonferroni, ns: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

2.- ENSAYOS FARMACOLÓGICOS CON COMPUESTOS REGULADORES DE RECEPTORES IMIDAZÓLICOS EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

2.1.- CARACTERIZACIÓN MODELO HD DE MOSCA

Para los ensayos farmacológicos con los compuestos agonistas imidazólicos de nueva síntesis en mosca se realizaron dos experimentos para la validación del modelo experimental. Las moscas utilizadas tenían insertado un elemento transponible que expresa la huntingtina humana (*HTT*) con 128 repeticiones del triplete *CAG* bajo control de la secuencia UAS (P{UAS-*HTT*.128Q.FL}f27b), nos referiremos a ellas como las moscas HD. Para conocer los efectos de expresión de la construcción *HTT* humana en mosca contamos el número de sinapsis de NMJ tanto en larva como en adulto (Figura 9R). El fenotipo es visible en los individuos adultos, pero no en las larvas. El resultado valida el modelo neurodegenerativo esperado de pérdida de sinapsis al menos en el adulto (Figura 9R). Al igual que para la expresión del péptido amiloide humano, el efecto deletéreo sobre las sinapsis de estas proteínas con tendencia a generar agregados y a producir toxicidad en neuronas, es patente solo en individuos adultos y tras al menos 5 días desde la eclosión (apartado 1.1). Se podría interpretar que los tiempos más cortos de vida de la larva III, apenas 3 días, no son suficientes para que estas proteínas produzcan fenotipos observables.

Igualmente se valoró la actividad locomotora durante 48 horas, usando el sistema Trikinetics y se observaron diferencias significativas siendo las moscas HD las que ven reducida la actividad locomotora (Figura 10R).

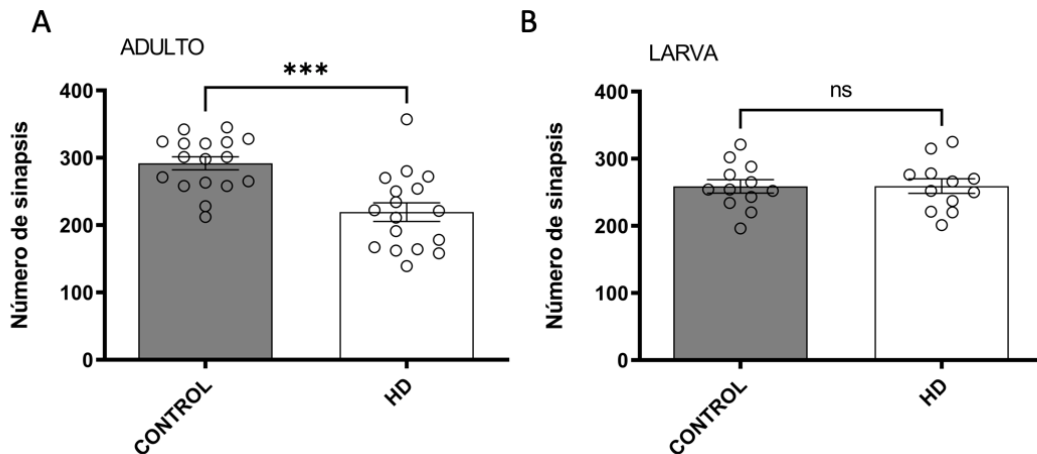


Figura 9R. Efecto de la sobreexpresión de *HD128Q* en el número de sinapsis de la NMJ de 15 moscas control o *HD128Q*. Las moscas *HD128Q* (HD) están representadas en blanco mientras que las moscas control aparecen en gris. **(A)** Las moscas HD adultas ven reducido su número de sinapsis de manera significativa. **(B)** No existen diferencias en el número de sinapsis de larva entre las moscas control y las moscas HD. Se ha utilizado el promotor *elav-Gal4* que dirige la expresión de *HD128Q* a todas las neuronas. La media \pm SEM engloba tres experimentos independientes (T de Student, post-hoc Bonferroni dónde *** $P < 0,001$ y ns: no significativo. Se representa la media \pm SEM)

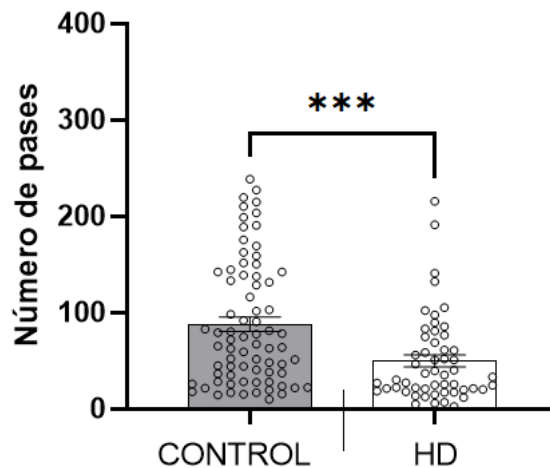


Figura 10R. Efecto de la sobreexpresión de *HD128Q* (HD) en la actividad locomotora acumulada de 15-20 moscas macho durante 48hrs. Se mide el número de veces que la mosca pasa a través del infrarrojo. Las moscas *HD128Q* (HD) están representadas en blanco mientras que las moscas control aparecen en gris. Las moscas HD (blanco) adultas ven reducida su actividad locomotora de manera significativa. Se ha utilizado el promotor *D42-Gal4* que dirige la expresión de *HD128Q* a la unión neuromuscular. (T de Student, post-hoc Bonferroni dónde *** $P < 0,001$ y ns: no significativo. Se

2.2 EFECTOS DE LOS LIGANDOS IMIDAZÓLICOS SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA DE LA MOSCA

Como hemos comentado anteriormente, los receptores imidazólicos I2 (I2-IR) están alterados en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Por ello, una hipótesis de trabajo consiste en que los ligandos I2-IR pueden tener un gran potencial terapéutico como agentes neuroprotectores.

Estamos interesados en el papel a nivel de la sinapsis de una nueva familia de compuestos ligando que muestran una alta afinidad por los Receptores I2-IR. Los estudios previos *in vivo* en ratones hembra *SAMP8* (modelo de ratón con senescencia acelerada, este modelo exhibe un grado moderado a severo de pérdida de actividad, caída del cabello, lordocifosis y muerte prematura), mostraron que los tratamientos con dos de estos nuevos ligandos I2-IR producen efectos beneficiosos en el comportamiento y la cognición (Vasilopoulou, Rodríguez-Arévalo, et al., 2021), (Rodríguez-Arévalo et al., 2021).

En este trabajo, se han probado diferentes moléculas pequeñas en dos contextos de neurotoxicidad en mosca el de la enfermedad de Alzheimer y el de la enfermedad de Huntington. En primer lugar, se utilizaron las moscas que expresan la huntingtina humana con un número patológico de repeticiones de glutamina (*HD128Q*) y que denominamos moscas HD y que junto con los controles *LacZ* fueron tratadas con distintos compuestos. Los compuestos se diferencian por tener distinta afinidad y mecanismo de acción para su unión a los receptores I2-IR.

Se probaron un total de 14 compuestos a través del ensayo de actividad locomotora o Trikinetiks, de los 14 se muestran sólo los resultados de los compuestos más representativos (Figura 11R). Sólo uno de ellos, el compuesto 3 (Comp3) tuvo resultados de rescate del fenotipo, es decir que las moscas HD alimentadas con este compuesto presentaban niveles normales de actividad locomotora, para el resto de compuestos no se encontraron cambios (Comp2) o incluso el tratamiento producía un efecto deletéreo en la locomoción (IDA o Comp 4), tanto en moscas HD como en moscas control (Figura 11R). Todos los tratamientos se realizaron a la misma concentración (100 μ m), cuando alguno de ellos resultó tóxico no se hicieron pruebas con dosis menores ya que la dosis elegida ya tenía en cuenta la afinidad del ligando por I2IR y dicha toxicidad podría deberse a interacciones con otras vías. La mayoría de los compuestos fueron testados

por primera vez en animales, y otros como Idazoxan, que ya había dado resultados prometedores en el modelo de Alzheimer de ratón (Rodríguez-Arévalo et al., 2021)

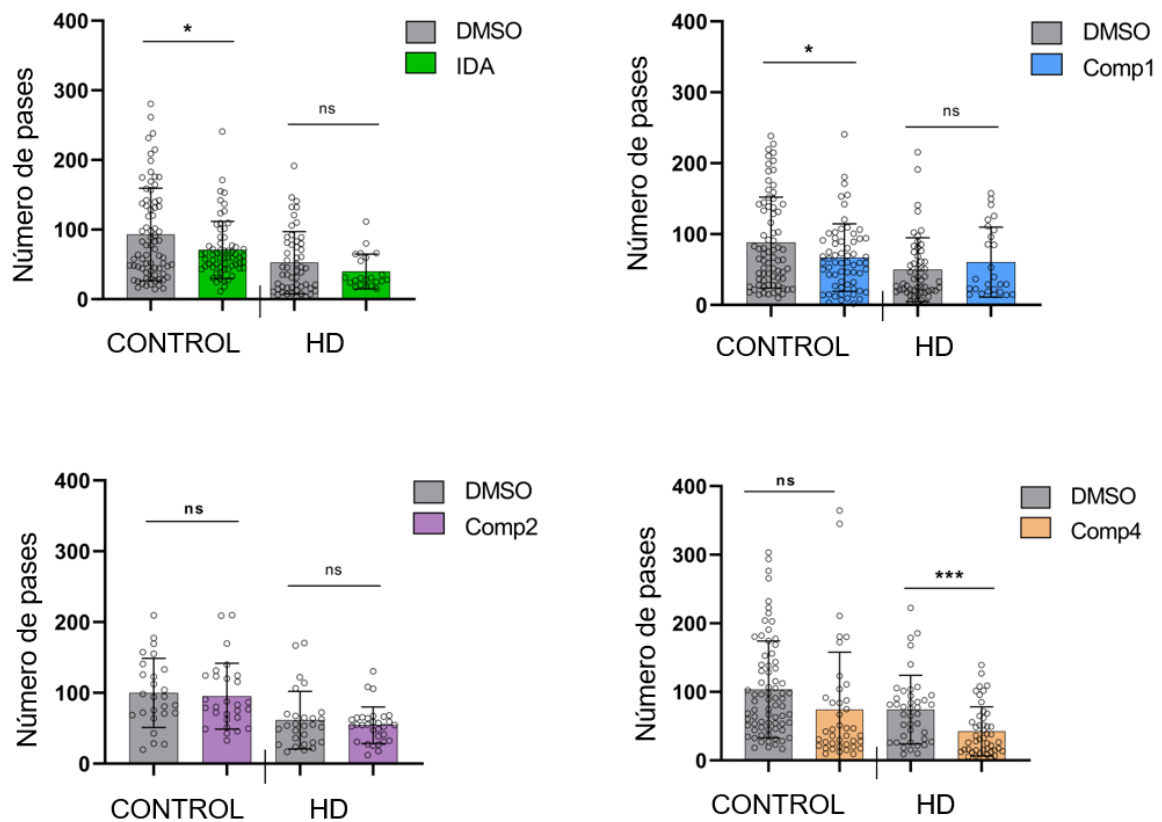


Figura 11R. Ejemplos del efecto del tratamiento con compuestos ligando de los receptores Imidazólicos en la actividad locomotora de la mosca. Durante 72hrs se midió la actividad acumulada del número de pases a través del infrarrojo de 15-20 moscas adultas alimentadas con soluciones de papilla enriquecida con los distintos compuestos. El experimento se ha realizado con 4 grupos experimentales, 2 grupos control con y sin tratamiento, y 2 grupos de moscas HD con o sin tratamiento. Los datos se agrupan en dos bloques de datos, por un lado, los relativos a las moscas control y por el otro a las moscas HD **(A)** Ensayo de actividad locomotora con el compuesto Idazoxan. En verde los animales tratados y en gris sin tratamiento. Tanto los animales control como los HD sufren un efecto tóxico al tratamiento reduciendo su actividad locomotora **(B)** Ensayo de actividad locomotora con el compuesto Comp1 en azul. Con este compuesto no encontramos un efecto reseñable derivado del tratamiento **(C)** Experimento con el compuesto Comp2 en morado. Este compuesto no produce ningún efecto **(D)** En naranja, se representan las moscas tratadas con Comp4. Este compuesto resulta especialmente tóxico para la mosca, afectando gravemente a su locomoción. Las barras grises representan a los animales que no han recibido tratamiento y han sido alimentadas con vehículo (DMSO). Los datos se analizaron estadísticamente ANOVA, post-hoc Bonferroni, donde * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

2.2.1.- EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON COMP3 EN DOS MODELOS DE NEURODEGENERACIÓN DE DROSOPHILA

Solo el compuesto 3 (Comp3) resultó proteger frente al fenotipo de pérdida de actividad locomotora en el modelo de moscas HD. Para comprobar si este efecto de protección funcional de la motoneurona es único del modelo de Huntington, realizamos el mismo experimento de locomoción en moscas $\alpha\beta 42$ -Arc2E. De acuerdo con los experimentos realizados, el Comp3 es capaz de revertir el efecto de pérdida de actividad locomotora en ambos modelos, tanto el de HD como el de $\alpha\beta 42$ -Arc2E. (Figura 12R). Al replicar los efectos en ambas construcciones, la proteína I2-IR a la que se dirige la acción del compuesto 3 (Comp3) se postula cómo una diana terapéutica ante enfermedades neurodegenerativas muy prometedora.

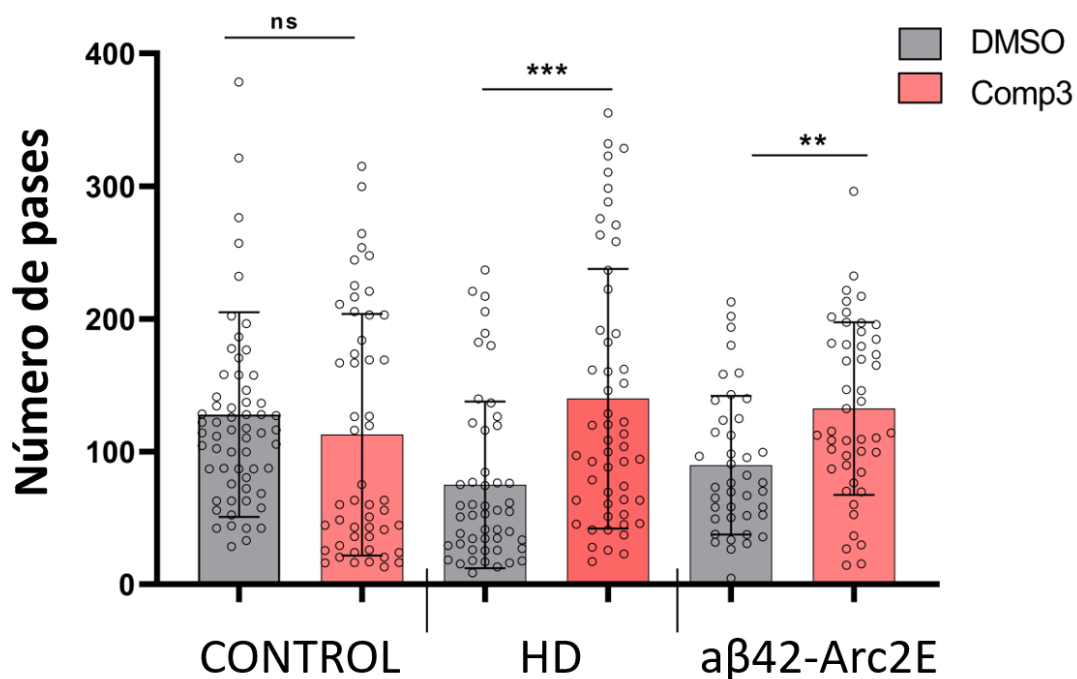


Figura 12R. Efecto del compuesto Comp3 en la capacidad locomotora acumulada de la mosca. Se midió la actividad acumulada del número de pases a través del infrarrojo durante 72hrs de 15-20 moscas adultas alimentadas con soluciones de papilla enriquecida con el Comp3 o DMSO. En rojo encontramos las moscas tratadas con Comp3 y en gris oscuro controles tratados con vehículo DMSO. El compuesto comp3 fue testado en los modelos de Alzheimer y Huntington con resultados relevantes de recuperación del fenotipo en ambos modelos. Los datos se analizaron estadísticamente (ANOVA, post-hoc Bonferroni, dónde * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$, ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

Además, quisimos relacionar el fenotipo funcional de la locomoción con el número de sinapsis de la NMJ. Al realizar un ensayo de conteo de sinapsis en moscas $\alpha\beta42$ -Arc2E, observamos que el tratamiento con el compuesto Comp3 también puede revertir la pérdida sináptica provocada por la acumulación del péptido amiloide (Figura 13R).

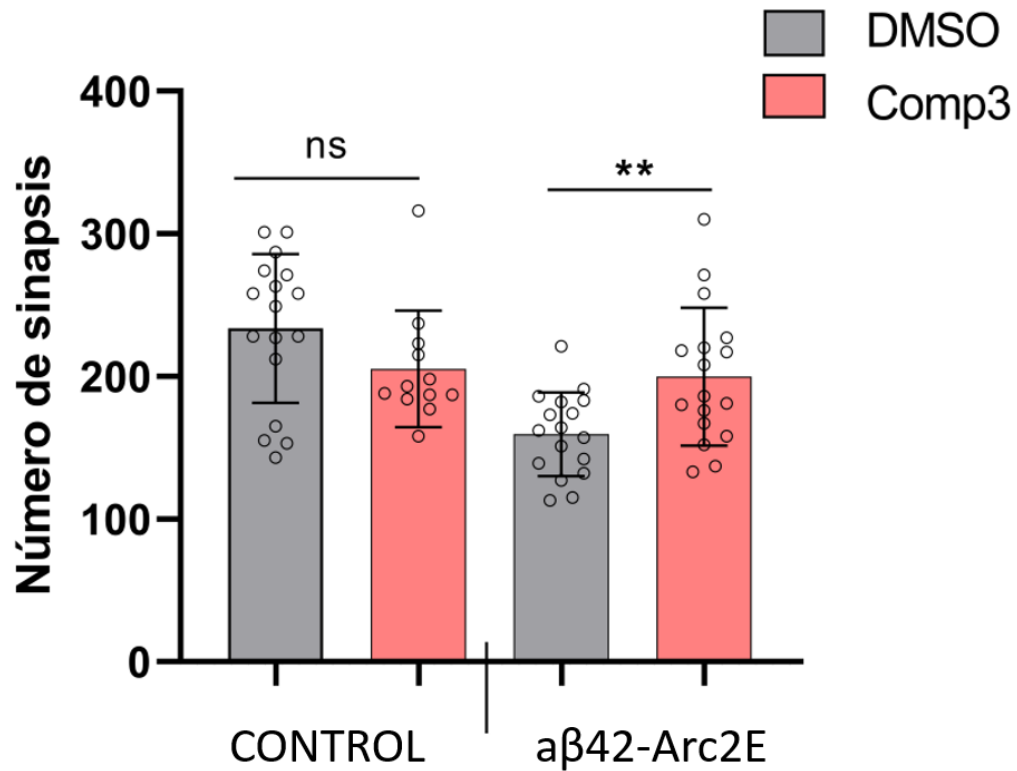


Figura 13R. Efecto del compuesto Comp3 en el número de sinapsis de la mosca. Los datos están divididos en dos genotipos, moscas control y moscas $\alpha\beta42$ -Arc2E. En rojo encontramos las moscas tratadas con Comp3 y en gris oscuro controles tratados con vehículo DMSO. El tratamiento con el compuesto comp3 es capaz de revertir el fenotipo de pérdida sináptica. La media \pm SEM engloba tres experimentos independientes. Los datos se analizaron estadísticamente (ANOVA, post-hoc Bonferroni, donde $**P < 0,01$, ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

II.- EL CONTEXTO SEXUAL Y EL DIMORFISMO EN PATOLOGÍAS SINÁPTICAS

2.1.- PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTEROIDEOS: ESQUEMA DE TRABAJO

Usaremos *Drosophila melanogaster* para investigar el papel de receptores esteroideos en la sinaptogénesis y el impacto del sexo en los posibles efectos. Para saber cuál es el efecto del receptor de ecdisona en la función sináptica hemos propuesto un esquema de trabajo dónde incluimos, además, la variable “sexo del individuo” como parámetro de interés. Estudiaremos los diferentes miembros e isoformas del receptor de ecdisona en dos contextos: en un circuito altamente dimórfico, las neuronas *dsx* y en una estructura menos dimórfica conservada, la unión neuromuscular (Figura 14R).

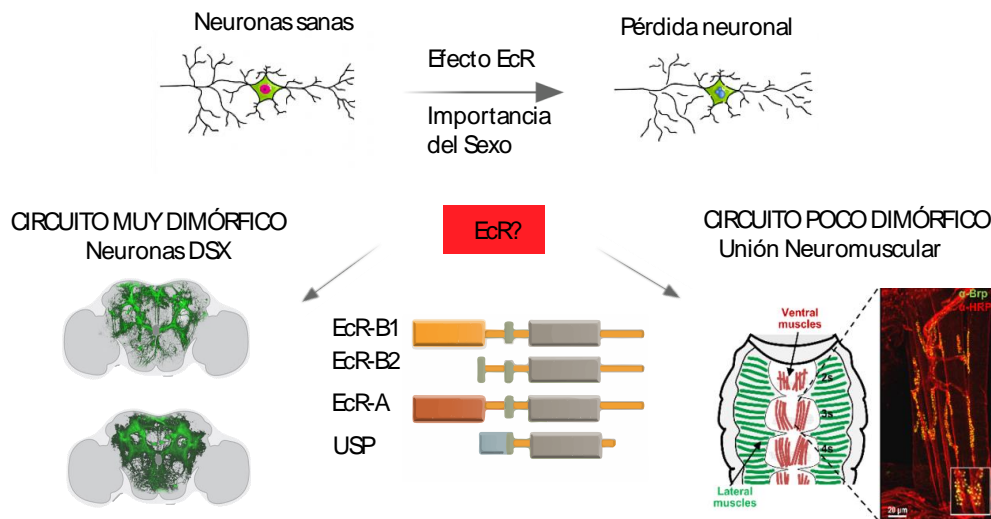


Figura 14R. Esquema de funcionamiento de trabajo en el estudio del dimorfismo sexual y la modulación sináptica. Investigaremos el papel del receptor de ecdisona en la disfunción sináptica tanto en un circuito dimórfico: neuronas *DSX*, como en un circuito no dimórfico: La unión neuromuscular.

2.2.- EFECTOS DE LA SOBREPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS EcR EN EL ALA DE LA MOSCA ADULTA

Realizamos estudios exploratorios destinados a averiguar el efecto de la sobrepresión de las isoformas del receptor de ecdisona en distintos dominios. Utilizando un promotor específico de ala (*SalPE-Gal4*), se comprobó que el exceso de *EcRA* produce un fenotipo de alas consistente en que se desarrollan plexos en las venas, sobre todo en las venas

L3 y L2, algo que no ocurre en un ala silvestre o control. De acuerdo con los resultados obtenidos, el fenotipo parece ser más grave en las alas de los machos que en la de las hembras. Al realizar el experimento con la isoforma *EcRB1*, encontramos un fenotipo letal en el estadio de pupa con necrosis en el ala. Y cuando comprobamos los efectos con la isoforma *EcRB2*, los efectos son similares que con *EcRA*, se generan plexos en las venas de carácter anormal que parecen más pronunciados en las hembras (Figura 15R). De acuerdo con los resultados obtenidos en el dominio de ala, tenemos la primera evidencia de que la sobreexpresión de isoformas distintas del receptor de ecdisona, no solo produce efectos distintos, sino que pueden afectar a cada sexo de maneras diferentes

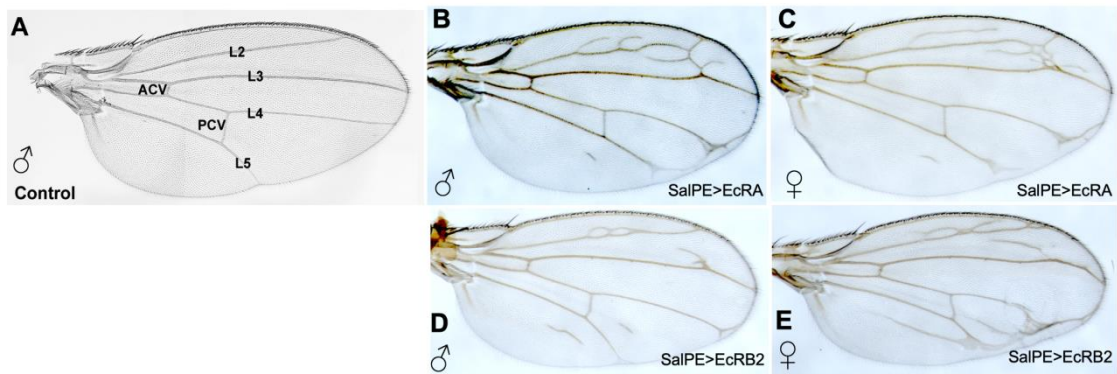


Figura 15R. Efecto de las isoformas de EcR en el ala de la mosca. **(A)** Ala de control que muestra la ubicación de las venas longitudinales 2-5 (L2-L5); vena transversal anterior (ACV); vena transversal posterior (PCV). **(B)** Ala mutante con exceso de *EcRA* de macho dónde se notan los plexos anormales en las venas L3 y L2. **(C)** Ala mutante de hembra con el efecto de exceso de plexos derivado de la sobreexpresión de *EcRA* en el dominio Sal-PE. **(D)** Ala macho con los efectos de *EcRB2* **(E)** Ala hembra mutada con *EcRB2*.

Conociendo este hecho, quisimos saber más sobre cómo podría estar actuando las distintas isoformas del receptor de ecdisona en el sistema nervioso y específicamente en el establecimiento de la sinapsis.

2.3.- PAPEL DEL RECEPTOR DE ECDISONA EN EL CONTROL DEL NÚMERO DE SINAPSIS

2.3.1.- DIFERENCIAS BASALES EN LA EXPRESIÓN DEL GAL4 Y EcRA

En primer lugar, realizamos una PCR cuantitativa (qPCR) para comprobar si los niveles de expresión del factor de transcripción *Gal4* en el cerebro de las moscas a estudio, variaba entre ambos sexos (Figura 16R). Como hemos visto en capítulos anteriores, el gen *Gal4* codifica la proteína activadora de la transcripción de la levadura *Gal4* que, uniéndose al gen *UAS* (*Upstream Activation Sequence*) elaboran el sistema *Gal4/UAS*. El promotor *Gal4* se une específicamente a *UAS* para activar la transcripción de un gen de interés. Esto resulta importante para los siguientes experimentos ya que necesitamos saber si los niveles de expresión se mantienen similares entre sexos para poder estudiar las diferencias debidas al sexo como variable experimental. Los resultados muestran que los niveles de expresión *Gal4* no difieren entre machos y hembras (Figura 16R).

A continuación, se hizo el mismo abordaje experimental para conocer los niveles basales de expresión de *EcRA* entre machos y hembras y, de nuevo, no encontramos diferencias significativas entre ambos sexos (Figura 16R). Por lo que podemos concluir que las diferencias que encontremos entre los sexos nunca se podrán achacar a distintos niveles de sobreexpresión de las construcciones.

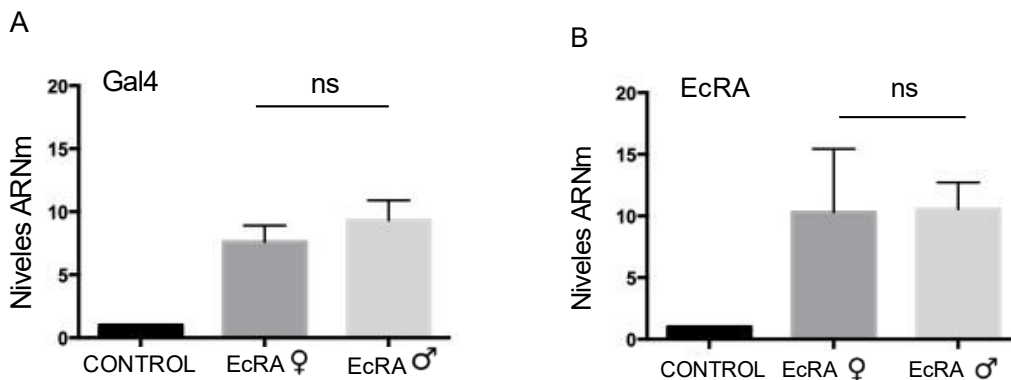


Figura 16R. Gráfica que representa los valores obtenidos por qPCR de *Gal4* y *EcRA*. Se utilizaron cabezas de 15 moscas hembra y 15 moscas macho con el genotipo control *UAS-LacZ; elav-Gal4* y con genotipo con sobreexpresión *EcRA: UAS-EcRA; elav-Gal4*. **(A)** Gráfica para los valores de *Gal4*. **(B)** Gráfica para los valores de *EcRA*. En negro aparecen representadas las muestras control, en gris oscuro los datos para “hembras” y en gris claro los datos para “machos” (Prueba estadística t de Student; ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SD).

2.3.2.- DIFERENCIAS BASALES EN EL NÚMERO DE SINAPSIS EN MOTONEURONAS DE LARVA Y ADULTO

Para continuar, exploramos si las uniones neuromusculares presentan dimorfismos sexuales en términos de número de sinapsis tanto en larvas como en adultos. No encontramos diferencias significativas entre machos y hembras en larva, mientras que la mosca adulta, presenta significativamente más sinapsis en las hembras (Figura 17R). Debido a que tanto el número como el tamaño de las motoneuronas se conservan entre sexos y solo hay una diferencia mínima en el número de sinapsis de la NMJ adulta, consideramos a las motoneuronas como parte de un circuito poco dimórfico.

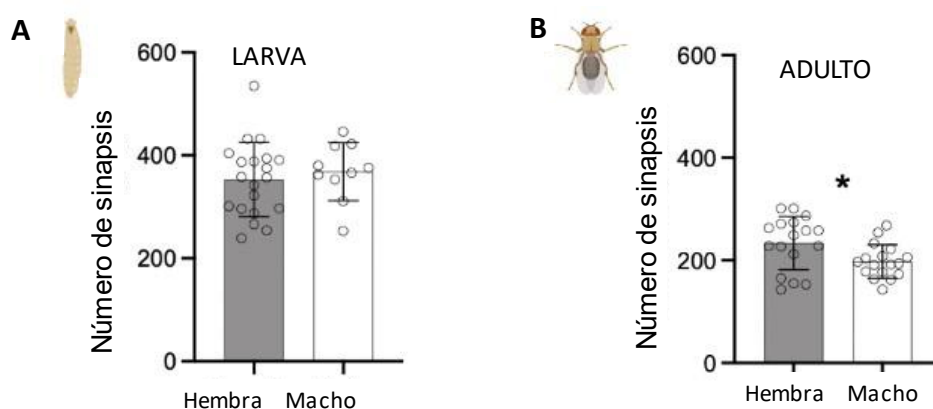


Figura 17R. Cuantificación de puntos positivos *nc82* denominado “número de sinapsis”. Valores basales en el número de sinapsis por sexos **(A)** Gráfica dónde se muestra los valores basales del número de sinapsis de la NMJ de larvas dividido por sexos. En gris las larvas hembras y en blanco las larvas macho. No existen diferencias estadísticas en el número de sinapsis. **(B)** Valores basales del número de sinapsis en las moscas adultas divididas por sexos. Las diferencias son significativas siendo las moscas macho las que albergan un menor número de sinapsis en comparación con las hembras. Los datos se analizaron estadísticamente. (T de Student; post-hoc Bonferroni; * $P < 0,05$. ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

2.3.3.- EFECTOS DE LAS ISOFORMAS DE EcR EN LA SINAPSIS DE LA LARVA

Para investigar el papel de las distintas isoformas del receptor de ecdisona en el número de sinapsis en larva, sobreexpresamos las isoformas de *EcR* o de su co-receptor *USP*, en las motoneuronas o usamos RNAi (interferencia de RNA) para disminuir la expresión. Independientemente del efecto general sobre el número de sinapsis la sobre-expresión

de EcRA produce una pérdida de sinapsis sólo en los machos. También observamos un efecto, de nuevo en los machos, ante la falta de *USP*.

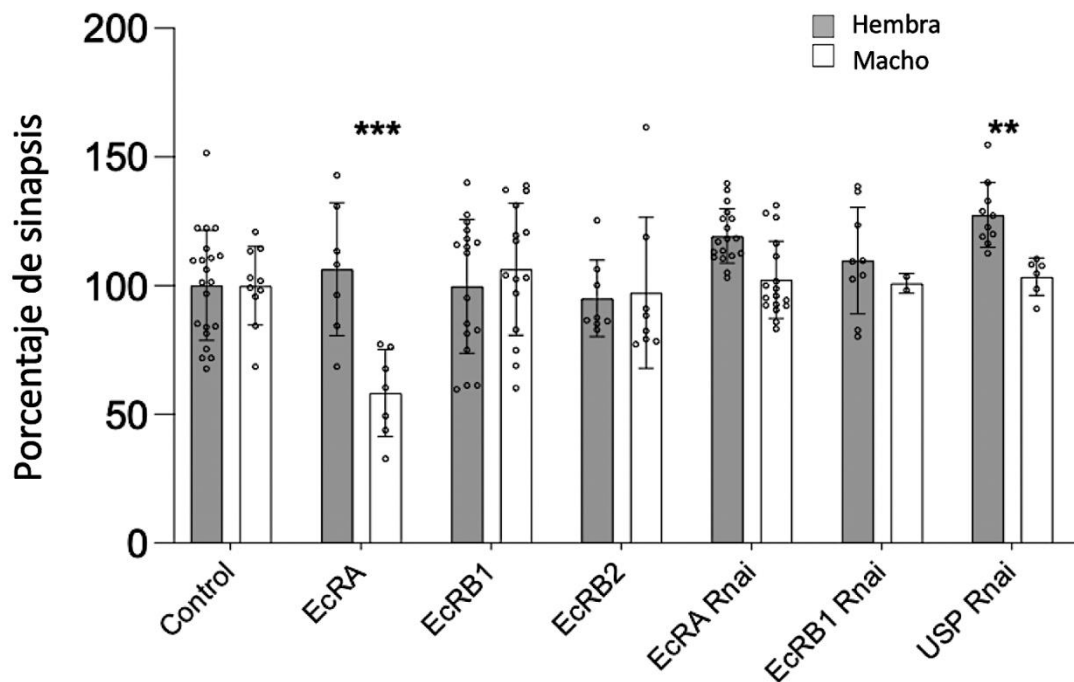


Figura 18R. Cuantificación de puntos positivos *nc2* en porcentaje frente a los controles cuando las diferentes isoformas del receptor de ecdisona están reguladas hacia arriba o hacia abajo en las uniones neuromusculares de las larvas (NMJ) del músculo longitudinal ventral en el tercer segmento abdominal. Los datos del fenotipo hembra en gris y los de macho en blanco. Los datos se analizaron estadísticamente. (T de Student; post-hoc Bonferroni; * P <0,05. ns representa: no significativo. Se representa la media ± SEM).

2.3.4.- EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE *EcRA* EN LA SINAPSIS DEL ADULTO

Tras el efecto tan acusado en las larvas, quisimos comprobar si el número de sinapsis en las moscas adultas se veía alterado ante el exceso de *EcRA*. Comprobamos que, si había alteración, pero, al contrario que en la larva, fueron las hembras las que perdieron sinapsis de forma significativa. Este fenotipo dimórfico se mantiene en el adulto independientemente del *Gal4* utilizado (*elav-Gal4* de tipo pannerural, o *D42-Gal4* varias áreas del sistema nervioso, pero especialmente de motoneuronas).

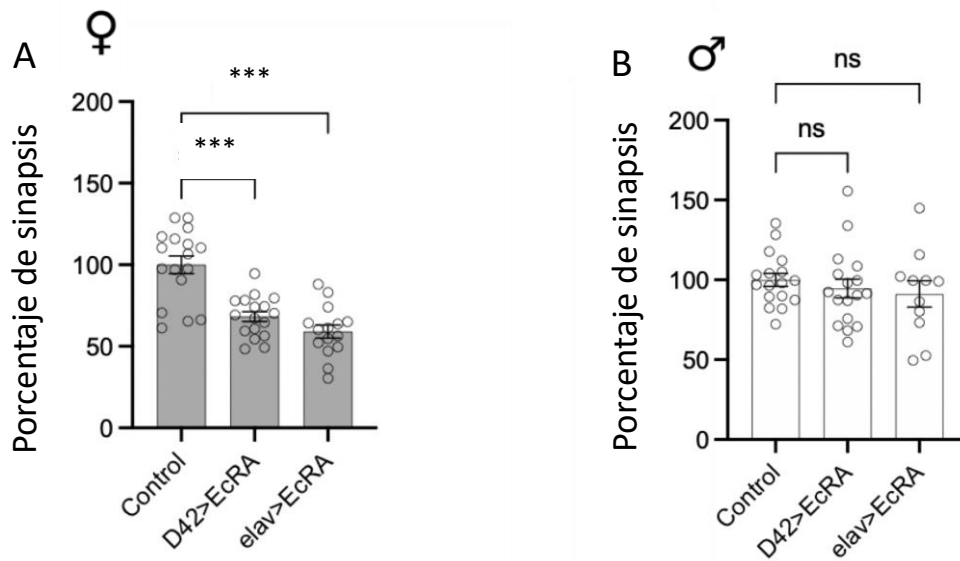


Figura 19R. Cuantificación de puntos positivos *nc82* en porcentaje frente a los controles establecido como “número de sinapsis”. Efecto de la sobreexpresión de *EcRA* en los circuitos neuronales de *elav* y *D42*. **(A)** Gráfico que representa el porcentaje de sinapsis en NMJ de hembras que sobreexpresan la isoforma A del receptor de ecdisona bajo dos promotores diferentes del SNC (*elav*: panneural y *D42*: específico de motoneurona). Las moscas hembra con la mutación *EcRA* sobreexpresada tienen una reducción en las sinapsis. **(B)** Machos con la mutación *EcRA*. Los datos se analizaron estadísticamente. (ANOVA; post-hoc Bonferroni; *** $P < 0,001$; ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

2.3.5.- EFECTO DE LA ISOFORMA *EcRA* Y DEPENDENCIA DE LIGANDO

Para caracterizar funcionalmente el fenotipo diferencial de machos y hembras debido a la sobreexpresión del receptor de ecdisona en el sistema nervioso del adulto, utilizamos la construcción *UAS-EcRA^{W650A}* (llamada en adelante *EcRA DN*) que expresa una versión mutada de la isoforma A de *EcR* y que ha sido considerada en algunos estudios como dominante negativa. La construcción *EcRA DN* contiene una mutación en el dominio de unión del ligando, evitando que la hormona libre pueda unirse adecuadamente al receptor. Con este experimento, queríamos saber si el efecto sobre las sinapsis es un efecto independiente de la unión del ligando ecdisona. La sobreexpresión de *EcRA DN* no presentó ningún efecto sobre el número de sinapsis, encontrándose un número de sinapsis igual al control tanto en hembras como en machos, lo que indica la dependencia

de la ecdisoma en los fenotipos observados con la sobreexpresión de la isoforma salvaje (Figura 20R).

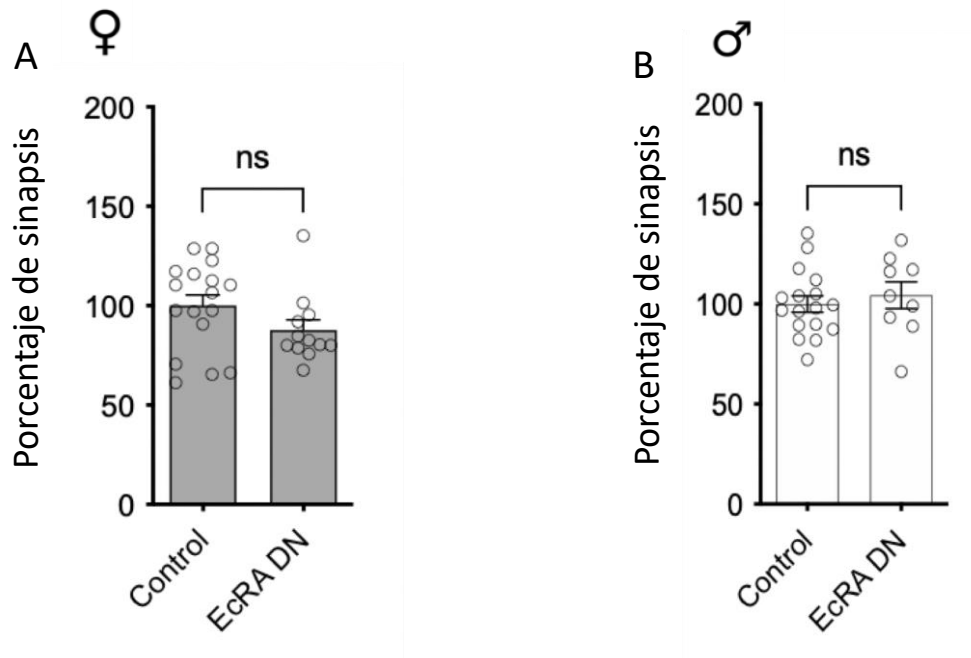


Figura 20R. Efecto de la expresión de *EcRA*^{W650A} (*EcRA-DN*). En gris se representan las hembras y en blanco los machos. **(A)** Gráfico que representa el porcentaje de sinapsis en NMJ de hembras que sobreexpresan la forma mutada de *EcRA-DN* bajo el dominio *elav*, es decir, todas las neuronas. Las moscas hembra con la mutación *EcRA-DN* no experimentan cambios en el número de sinapsis conforme al control. **(B)** Machos con la mutación *EcRA-DN* donde no suceden cambios en el porcentaje de sinapsis. Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student. ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM.

2.4.- EL EFECTO DIMÓRFICO SOBRE LA SINAPSIS TIENE UNA CONSECUENCIA FUNCIONAL EN LA ACTIVIDAD DIARIA Y LA SUPERVIVENCIA

El ensayo de actividad locomotora en Trikinetiks permite evaluar simultáneamente tanto la actividad diaria y sus ritmos circadianos como la capacidad de movimiento de las moscas, lo que permite evaluar a nivel funcional la actividad de las motoneuronas, pero también la actividad referente a otros centros neuronales superiores.

Todos los organismos muestran un comportamiento rítmico fisiológico que suele estar asociado a variaciones en los cambios ambientales. Las hembras de *Drosophila*, debido

a su fisiología inherente de la puesta de huevos, tienen curvas de actividad con patrones más abruptos que los machos, con mayor actividad diurna y un despertar más adelantado.

En las moscas que sobreexpresan *EcRA*, el patrón normal de actividad diaria se altera en ambos sexos (Figura 21R). Los machos que sobreexpresan *EcRA* muestran una pequeña alteración al final del día (Figura 20R A), por el contrario, las hembras no pueden seguir una rutina de actividad normal, mostrando una disminución de actividad a lo largo de todo el día y con los picos de actividad mucho menos pronunciados y menor tiempo de sueño total (Figura 21R B).

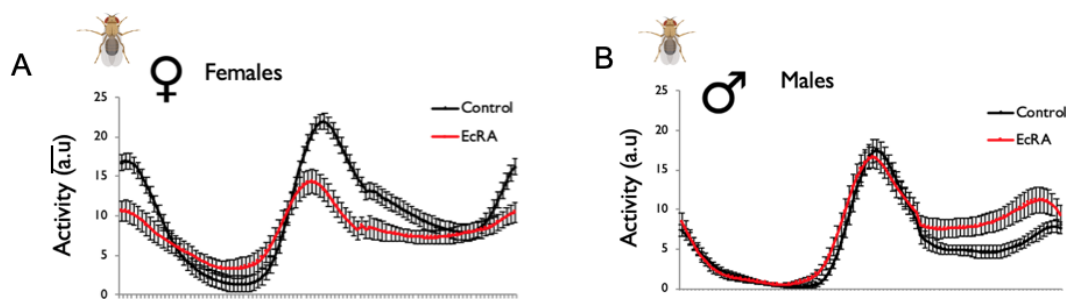


Figura 21R. Actividad locomotora de las moscas *EcRA* de 9 a 21 horas. Se registró la actividad de 15 moscas hembra y 15 moscas macho de 3 días de edad durante 4 días. **(A)** Curva de actividad de machos. **(B)** Curva de actividad de hembras. Las líneas negras representan las moscas de control y las líneas rojas las de *EcRA*.

También pudo evaluarse la cantidad de moscas vivas (o porcentaje de supervivencia) que encontramos a los 5 días de iniciar el experimento. Los resultados en los parámetros evaluados tanto el ritmo, el porcentaje de supervivencia, el tiempo de sueño (actividad por debajo de 5 unidades) o la actividad promedio muestran defectos en las moscas *EcRA* tanto hembras como machos (Tabla 3). Pero es en las hembras *EcRA* dónde el fenotipo de todos los parámetros se encuentra considerablemente más agravado, especialmente en la supervivencia o el tiempo de sueño. Por razones aún desconocidas, las moscas hembra *EcRA* encuentran su patrón de sueño-actividad muy alterado, siendo un parámetro fundamental en la viabilidad de la mosca.

	MACHOS		HEMBRAS	
	CONTROL	EcRA	CONTROL	EcRA
RITMO	100%	93%	100%	83%
% SUPERVIVENCIA (a los 5 días)	92%	87,5%	95%	68,7%
TIEMPO DE SUEÑO (min)	360 min	360 min	255 min	90 min
ACTIVIDAD (Promedio)	3,8	4,3	8,2	4,9

Tabla 3. Parámetros de sueño-actividad de las moscas *EcRA*. Se encuentran representados 4 grupos de individuos con 16 moscas por grupo, siendo hembras y macho control y hembras y macho *EcRA*. Se reflejan los valores de los parámetros cuantificados con la herramienta Trikinetiks. Se han cuantificado el ritmo, el porcentaje de supervivencia a los 5 días, el tiempo de sueño y la actividad promedio.

Con todo ello podemos concluir que, junto con el fenotipo de pérdida de sinapsis en la unión neuromuscular, la sobreexpresión de *EcRA* provoca cambios importantes en la capacidad de las hembras para moverse y un desajuste en el mantenimiento de sus patrones de actividad vital.

2.5.- LA SOBREEXPRESIÓN DE *EcRA* ALTERÓ LA NEURITOGÉNESIS DE UNA MANERA DEPENDIENTE DEL SEXO

Las neuronas que expresan el gen *dsx* están presentes tanto en hembras como en machos, pero, en su patrón neuronal, tienen claras diferencias en el número de neuronas y sus proyecciones. Por esta razón, podemos considerar que las neuronas que expresan *dsx* constituyen un circuito neuronal altamente dimórfico. Estas diferencias son relevantes desde el punto de vista del comportamiento copulatorio, ya que la alteración de la función neuronal *dsx* conduce a comportamientos muy aberrantes en ambos sexos. Esto sugiere, que estas neuronas instruyen programas neuronales específicos en cada sexo. Investigamos el papel de *EcRA* en estas neuronas en particular, las neuronas *dsx* están marcadas con GFP y podemos medir el área total que ocupan las neuronas *dsx*. En las hembras las neuronas *dsx* pierden casi el 50 por ciento de sus ramificaciones una vez que la isoforma *EcRA* está sobreexpresada (figura 22R), mientras

que en los machos no hay diferencias significativas (Figura 22R). Pero, el número total de células del circuito *dsx* no sufre ningún cambio por la sobreexpresión de *EcRA* ni en machos ni en hembras (Figura 23R).

Está claro que ambos patrones *dsx* son diferentes entre sexos, pero, además las neuronas de las hembras son mucho más sensibles a los cambios de la señalización de receptor esteroideo.

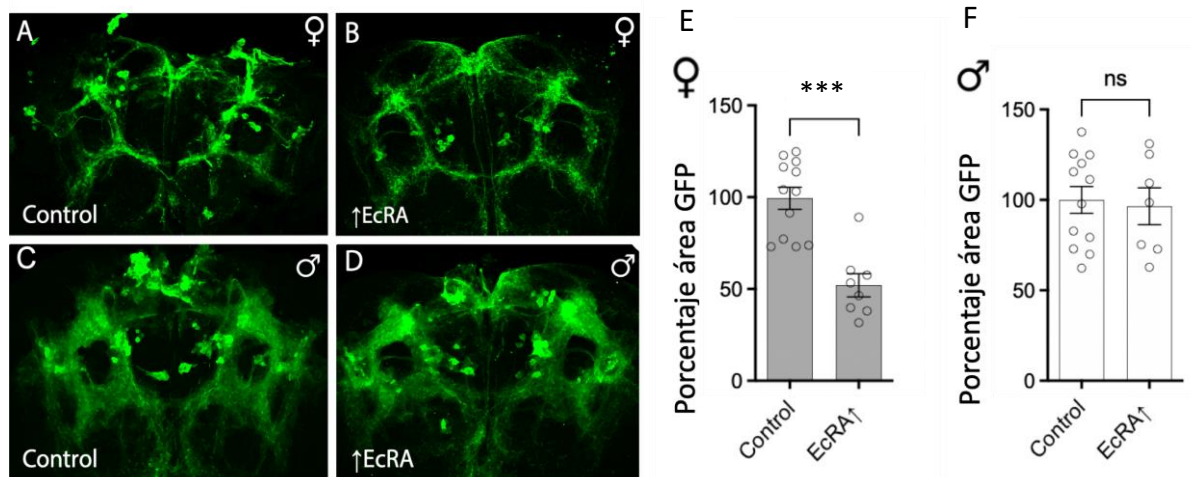


Figura 22R. Efecto de la sobreexpresión del receptor de ecdisona en neuronas *dsx*.

(A) Imagen confocal del patrón de neuronas *dsx* (*dsx-Gal4*) en moscas hembra de tipo salvaje. **(B)** Esta imagen muestra neuronas *dsx* con señal *GFP*, afectadas por la sobreexpresión de *EcRA* (flechas blancas). Existe una pérdida de señal *GFP* en los terminales axonales. **(C)** Patrón de neuronas *dsx* en moscas macho de tipo salvaje. **(D)** Patrón de neuronas *dsx* bajo la sobreexpresión de *EcRA* en un cerebro macho. **(E)** Cuantificación del porcentaje de señal de *GFP* de neuronas *dsx* en cerebros de hembras adultas, en gris. **(F)** Cuantificación del porcentaje de señal de *GFP* en el cerebro macho. Los datos se analizaron estadísticamente. (t de Student; post-hoc Bonferroni; *** $P < 0,001$; ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

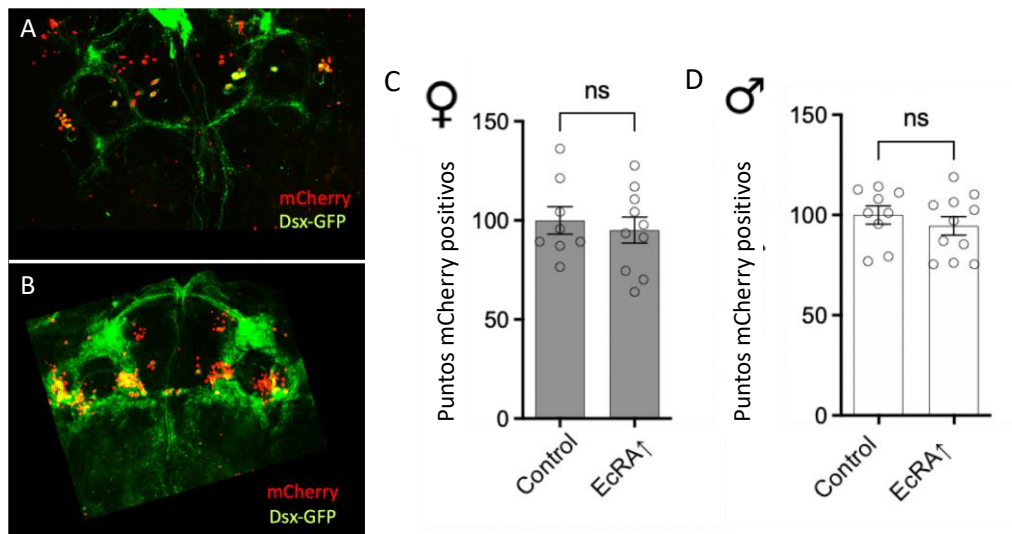


Figura 23R. Efecto de la sobreexpresión del receptor de ecdisona en neuronas *dsx* (puntos *mCherry* positivos). **(A)** Imagen confocal de cerebro adulto de hembra con el patrón marcado de neuronas *dsx* (*dsx-Gal4*) con los núcleos marcados con *UAS-mCherry* **(B)** Imagen confocal de cerebro adulto de macho con el patrón marcado de neuronas *dsx* (*dsx-Gal4*) con los núcleos marcados con *UAS-mCherry* **(C)** Cuantificación del porcentaje de los puntos *mCherry* (marcan el núcleo de las neuronas *dsx*) en moscas hembras mutadas por la sobreexpresión de *EcRA* y *UAS>LacZ* como moscas control **(D)** Cuantificación de machos entre el control y machos con *EcrA* sobreexpresado. Los datos se analizaron estadísticamente. (t de Student; post-hoc Bonferroni; ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

2.6.- ESTUDIO DEL PAPEL DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL EN EL FENOTIPO DE *EcRA* SOBRE LA SINAPSIS

En busca de posibles mecanismos para explicar los efectos dimórficos debidos a *EcRA*, hemos explorado la relación con las vías de determinación sexual. En *Drosophila*, los genes de la jerarquía de determinación del sexo como *TraF* orquestan el desarrollo y la diferenciación de tejidos específicos de sexo, estableciendo la fisiología y los circuitos neuronales típicos de cada sexo (Introducción, Figura 15). El gen *Tra* sólo se transcribe a proteína en las hembras, pero no en los machos. Con el experimento de sobreexpresar *TraF* (la isoforma femenina) en la unión neuromuscular (NMJ) de machos podemos “feminizar” estas células con una identidad sexual “masculina” de origen. De igual forma, en la NMJ de las hembras, con la sobreexpresión de *TraF* se producirá el evento de “superfeminización” celular. En definitiva, podemos decir que cambiamos el género

en aquellos dominios donde expresemos está construcción mientras que el resto del organismo mantiene su identidad.

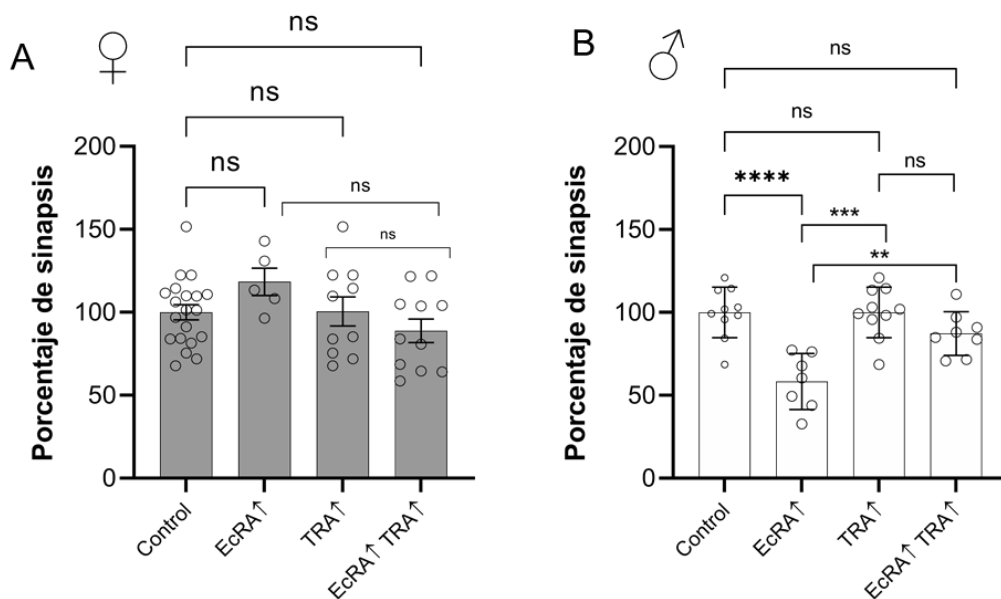
Al cuantificar el porcentaje de sinapsis entre hembras y machos, vemos que el dimorfismo tiene distinto sentido en larvas que en adultos.

En la larva son los machos los que ven afectado su número de sinapsis ante la sobreexpresión de *EcRA* y este fenotipo desaparece cuando se co-expresa *TraF* junto con *EcRA*, mientras que en las hembras no hay cambios significativos en ningún caso (Figura 24R). En los adultos el efecto de pérdida sináptica causada por *EcRA* afectaba sólo a las hembras y o de nuevo el fenotipo se revierte por la expresión de ambas construcciones *EcRA* y *TraF* Mientras que en los machos no hay variaciones significativas (Figura 24R).

Aunque los efectos dimórficos en larvas y adultos son diferentes, en ambos casos se revierten los efectos producidos por *EcRA* con la modificación de los genes de determinación sexual producida por la co-expresión de *TraF*.

Con este hecho, podemos decir que es la identidad sexual celular y no otros efectos indirectos de tipo sistémico, los que dan cuenta del efecto dimórfico por la sobreexpresión de *EcRA*, por ello cuando esa identidad sexual celular es modificada los efectos de *EcRA* desaparecen.

LARVA



ADULTOS

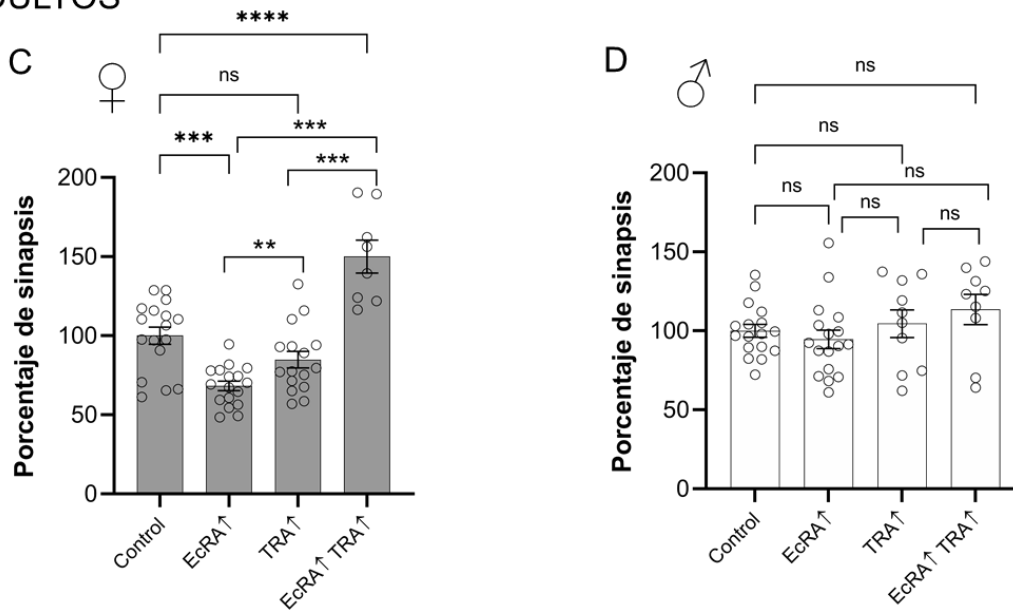


Figura 24R. Efectos dimórficos en el número de sinapsis ante la expresión de *TraF* en la NMJ de larva o de adulto (*D42-Gal4*) **(A)** Gráfica dónde se representan los valores del porcentaje de sinapsis de 15 larvas hembra ante la sobreexpresión de las distintas construcciones. **(B)** Gráfica de los valores de larva macho **(C)** Gráfica dónde se representan los valores del porcentaje de sinapsis de 15 hembras adultas ante la sobreexpresión de las distintas construcciones **(D)** Gráfica que representa los valores del porcentaje de sinapsis en la NMJ de macho (t de Student; post-hoc Bonferroni; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ ns representa: no significativo. Se representa la media \pm SEM).

2.7.- PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN ESTEROIDEA EN LA NEURODEGENERACIÓN

Después de haber comprobado el distinto impacto en función del sexo que tiene modificación de la señalización del receptor de ecdisoma, decidimos valorar los efectos del sexo en los modelos de mosca para la enfermedad de Alzheimer o Huntington en el circuito neuronal dimórfico de las neuronas *dsx* (Figura 23R).

Comprobamos que tanto en moscas hembra como en machos el efecto de la sobreexpresión de $\alpha\beta 42$ -Arc2E o HD conlleva una pérdida de señal *GFP* en las neuronas *dsx* esto es, que hay una pérdida del área total neuronal. La pérdida de área neuronal se produce en ambos sexos y en ambos modelos, pero es en el modelo de HD dónde encontramos un efecto dimórfico, siendo el fenotipo más acusado en las hembras (Figura 25R). Por lo que el contexto del sexo puede ser una variable determinante para el progreso de la neurodegeneración.

Según la literatura, la regulación hormonal está implicada en la progresión de algunos trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Pike, 2017). Por ello quisimos comprobar si el efecto de pérdida de sinapsis derivada de la sobreexpresión de *EcRA* previamente descrita, puede agravarse con la suma del efecto de sobreexpresión de la construcción $a\beta_{42}$ -Arc2E. Y si este efecto, de nuevo, difiere entre hembras y machos.

Los datos ofrecen un resultado sostenible del efecto sinérgico entre la sobreexpresión de ambas construcciones $a\beta_{42}$ -Arc2E y *EcRA* dónde se pierde un porcentaje significativo en el área total de las neuronas *dsx* en hembras y machos, encontrando un efecto más acusado en las hembras (Figura 25R). Por el contrario, al utilizar el RNA de interferencia de *EcRA*, junto con la sobreexpresión de $a\beta_{42}$ -Arc2E, el efecto de la pérdida neuronal se atenúa y en el caso de los machos se recupera parcialmente el fenotipo (Figura 25R). Este hecho nos lleva a pensar que puede existir una relación de equilibrio entre el receptor de ecdisona y los efectos derivados de la neurodegeneración.

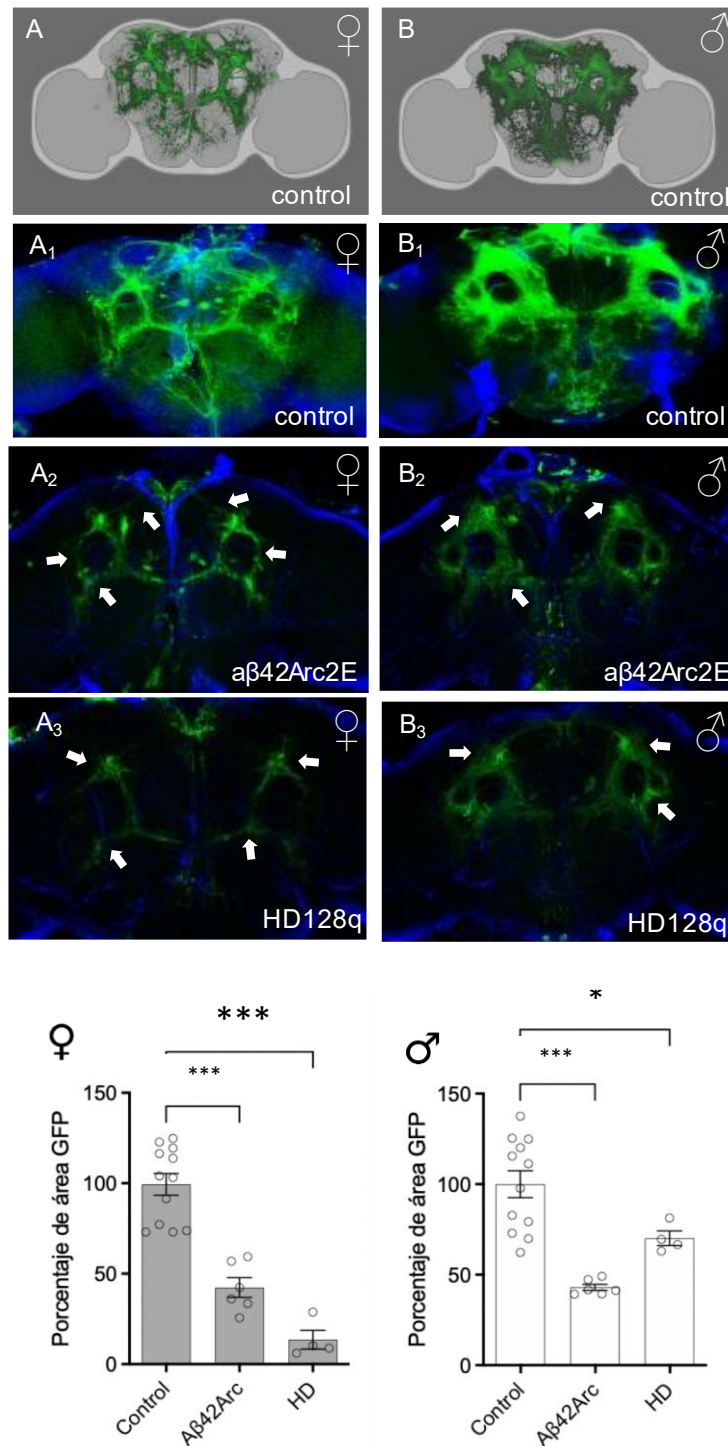


Figura 25R. Efectos dimórficos de proteínas neurodegenerativas tóxicas en neuronas *dsx*.

(A1-A3) Imágenes de microscopía confocal representativas de las neuronas *dsx-Gal4* marcadas con *GFP* (membrana neuronal) de cerebros de hembras **(B-B3)** Imágenes de cerebros adultos de machos con las neuronas *dsx* marcadas en verde (*mCD8GFP*). **(A2, B2)** Imagen confocal de cerebro hembra y macho con sobreexpresión de $a\beta 42$ -Arc2E **(A3, B3)** Cerebros adultos que sobreexpresan el exón1 del gen de la huntingtina humana con la expansión **(C)** Cuantificación del efecto de $a\beta 42$ -Arc2E y HD en el área total de las neuronas *dsx* en las hembras **(D)** Cuantificación del efecto de $a\beta 42$ -Arc2E y HD en el área total de las neuronas *dsx* en los machos. Los datos se analizaron estadísticamente. (ANOVA; post-hoc Bonferroni; *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ Se representa la media \pm SEM).

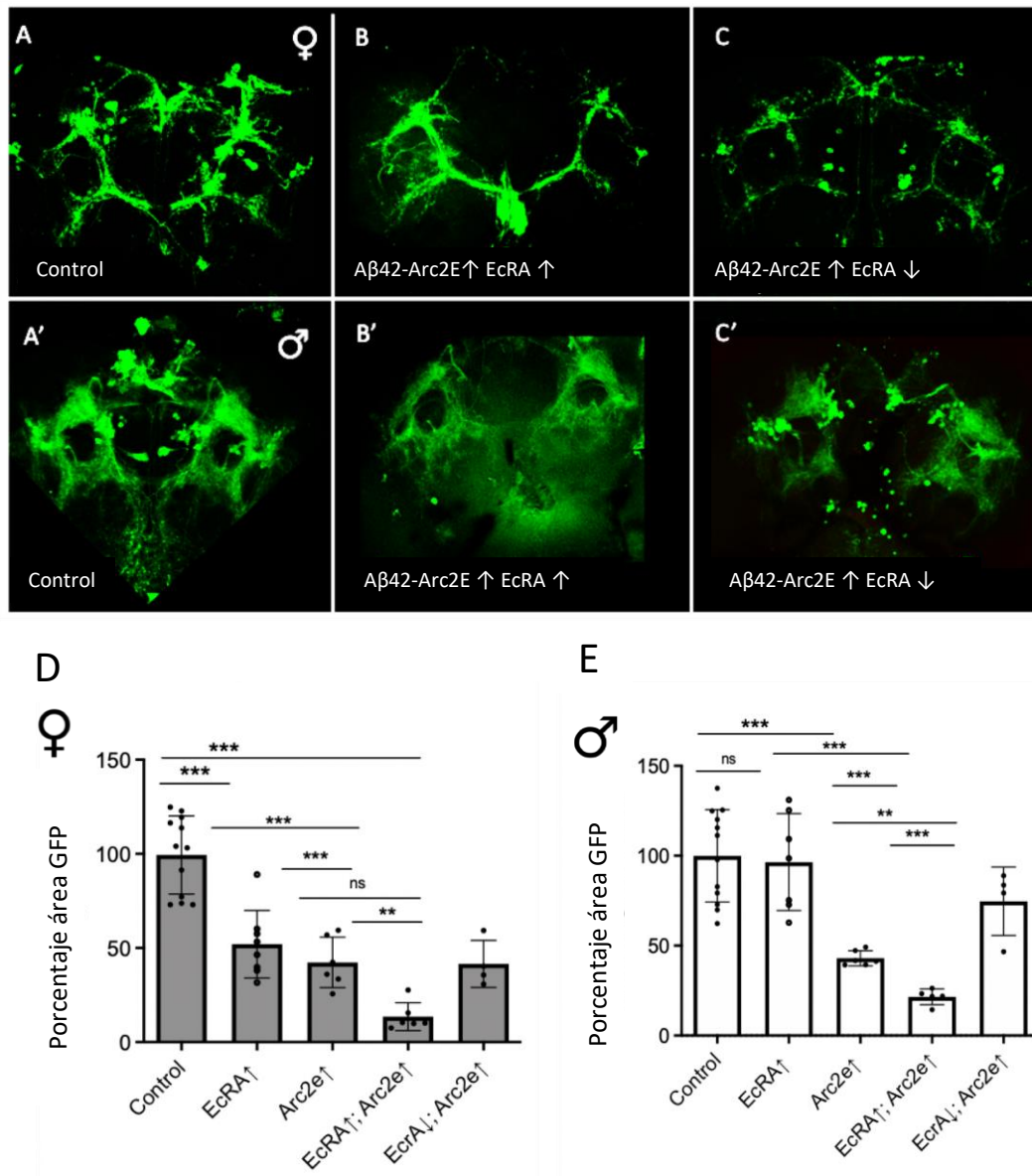


Figura 26R. Interacción entre *EcrA* y el contexto neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer. **(A-C)** Imágenes confocales representativas de cerebros de hembra. En verde, las neuronas *dsx*. **(A'-C')** Imágenes de cerebros adultos de machos con las neuronas *dsx* marcadas en verde (*GFP*). **(A, A')** Cerebros control tanto de hembra como de macho **(B-B')** Cerebros adultos de hembra y macho que sobreexpresan $\text{A}\beta\text{42-Arc2E}$ (*Arc2e*) y *EcrA* **(C-C')** Cerebros adultos de hembra y macho que sobreexpresan $\text{A}\beta\text{42-Arc2E}$ y el RNA de interferencia de *EcrA* **(D)** Cuantificación del efecto de $\text{A}\beta\text{42-Arc2E}$ y HD en el área total de las neuronas *dsx* en los machos. Los datos se analizaron estadísticamente. (ANOVA; post-hoc Bonferroni; *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ Se representa la media \pm SEM).

2.8.- REGULACIÓN ESTEROIDEA Y CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN DE MUERTE CELULAR

En el apartado 2.3 hemos mostrado el efecto de la sobreexpresión de *EcRA* que deriva en la reducción del número de sinapsis en la unión neuromuscular o la pérdida del área total neuronal en las neuronas *dsx*. Es conocido el papel que tiene el receptor de ecdisona, así como otros receptores esteroideos en regular la expresión de genes relacionados con la apoptosis.

Por ello, diseñamos un experimento para conocer si el efecto de *EcRA* pudiera estar activando vías de muerte celular. Mediante el sistema *Gal80ts Gal4/UAS* podemos dirigir la sobreexpresión de *EcRA* sólo en el cerebro adulto, pero en un momento concreto (apartado 1, material y métodos). Dejamos que el desarrollo larvario sea normal y encendemos el sistema de sobreexpresión una vez a distintos tiempos desde la eclosión de la mosca adulta. Así, realizamos tres tiempos de encendido, al día 1 de salir de la pupa, al día 3 y al día 5, tiempos en los que mediremos muerte celular.

Las células que inician la apoptosis han sido marcadas con el anticuerpo Caspasa 3 activada. La caspasa-3 es una proteína que interactúa con caspasa-8 y caspasa-9 y juega un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular.

Desde el día 1 de vida adulta de las moscas, encontramos un efecto dimórfico muy marcado en el número de células Caspasa 3 positivas, son las hembras las que exhiben un patrón de apoptosis que no revelan los machos. En el día 3, se mantiene el efecto en las hembras, pero con valores más reducidos (figura 24R). Más adelante, en el día 5, el número de células caspasa positivas se reduce hasta alcanzar un nivel basal mínimo entre todos los sexos y genotipos. En resumen, las hembras experimentan un evento de muerte celular dentro de los 4 primeros días de vida adulta que no sucede en los machos (figura 27R).

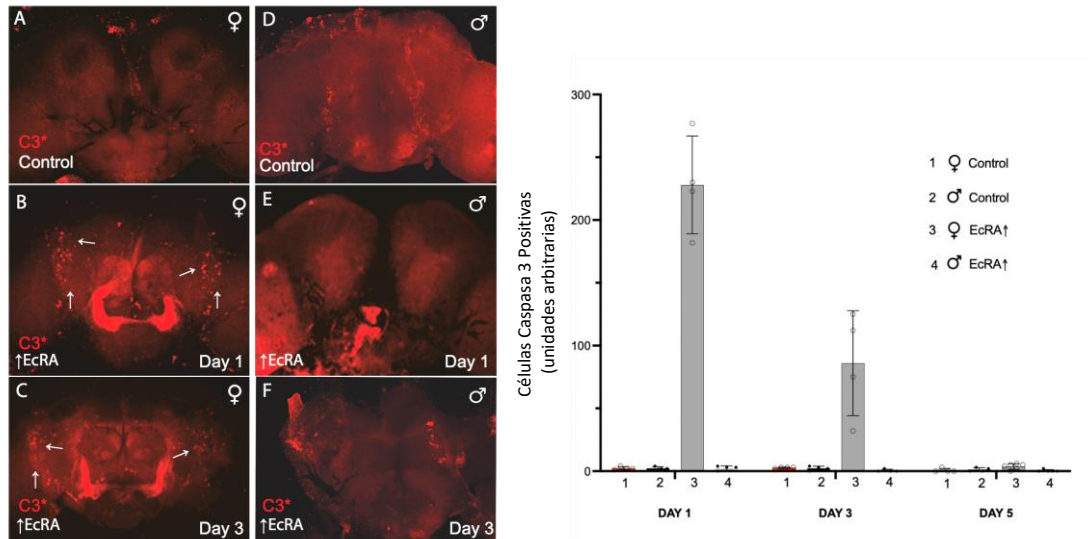


Figura 27R. Efecto de la sobreexpresión de *EcRA* en la muerte celular programada. **(A-C)** Imágenes confocales de cerebros de hembra adultos. **(A)** Cerebro hembra control de día 1 de vida adulta. **(B)** Cerebro hembra con sobreexpresión de *EcRA* de día 1. Aparecen marcadas con flechas blancas las células positivas para Caspasa 3. **(C)** Cerebro adulto de hembra con 3 días de vida adulta con *EcRA* sobreexpresado **(D-F)** Imágenes confocales de cerebros de macho adultos. **(D)** Cerebro macho control de u día de vida adulta. **(E)** Cerebro hembra con sobreexpresión de *EcRA* de día 1. Las flechas blancas corresponden a las células positivas para Caspasa 3 **(F)** Cerebro macho *EcRA* en el día 3 de la salida de la pupa. Los datos se representaron en una gráfica de datos agrupados.

2.8.1.- REGULACIÓN ESTEROIDEA Y SU INTERACCIÓN CON EL GEN PROAPOPTÓTICO *REAPER (rpr)*.

Durante el desarrollo de la mosca, es requerida la actividad de diversos genes proapoptóticos como *Reaper*, *Hid* y *Grim*. La expresión de estos genes está regulada diferencialmente entre los distintos tejidos de la mosca, lo que sugiere que hay distintos requisitos para su activación. Moscas que carecen de la función de *Reaper* no tienen afectación en la mayoría de los tejidos, sin embargo, en el sistema nervioso central presenta una supervivencia inapropiada de neuronas larvarias y neuroblastos.

Previamente hemos demostrado que el efecto de aumentar la expresión de *EcRA* en las neuronas *dsx* conlleva una pérdida de superficie neuronal, aunque sin alterar el número de células. Pero debido a la regulación de las vías apoptóticas por parte del receptor de ecdisona, una de las hipótesis fue que la activación de las vías de muerte celular cómo una posible causa responsable de los fenotipos de *EcRA*. Para examinar esta hipótesis,

decidimos explorar los efectos de bloquear una de las vías de muerte celular mediante un RNAi de interferencia de *Reaper* (gen proapoptótico) junto con la sobreexpresión de la isoforma A del receptor de ecdisona en las neuronas *dsx*. Al ser *reaper* un gen proapoptótico, cuando reducimos su expresión podemos limitar la activación de la cascada de muerte celular en las neuronas *dsx*.

Los resultados muestran un efecto de recuperación del fenotipo derivado de *EcRA* al reducir la expresión de *Reaper*. Este efecto sólo ocurre en las hembras, que son las que presentaban fenotipo debido a *EcRA*.

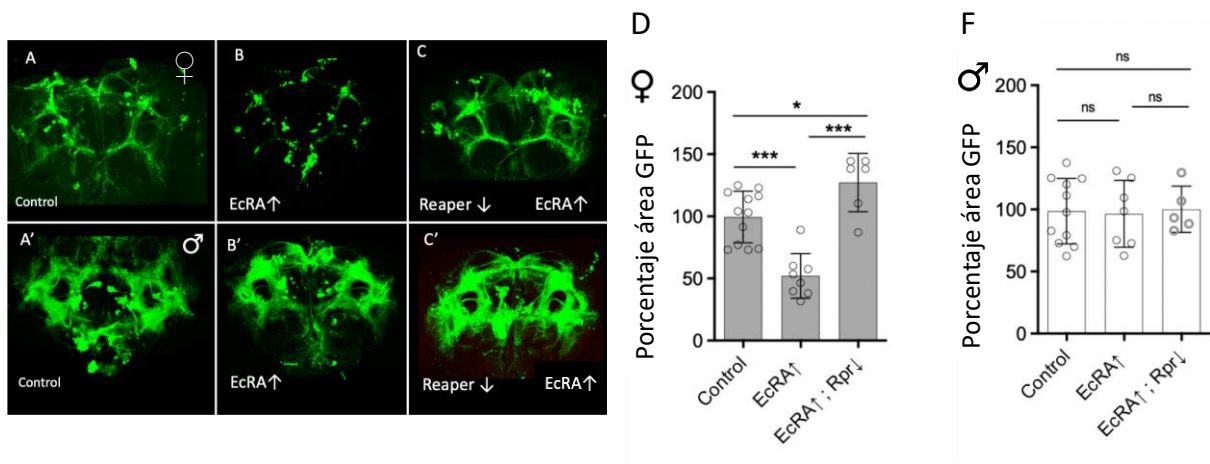


Figura 28R. La inhibición de *reaper* es capaz de recuperar el fenotipo derivado de *EcRA* **(A-C)** Imágenes confocales de cerebros de hembra adultos. **(A)** Cerebro hembra control **(B)** Cerebro hembra con sobreexpresión de *EcRA* **(C)** Cerebro adulto de hembra con sobreexpresión *EcRA* y la bajada de expresión de *Reaper* **(A'-C')** Imágenes confocales de cerebros de macho adultos. **(A')** Cerebro macho control. **(B')** Cerebro macho con sobreexpresión de *EcRA* **(C')** Cerebro adulto de macho con sobreexpresión *EcRA* y la bajada de expresión de *reaper* **(D)** Cuantificación de área total neuronal en cerebros hembra **(E)** Cuantificación de área total neuronal en cerebros macho. Los datos se analizaron estadísticamente. (ANOVA; post-hoc Bonferroni; *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$ Se representa la media \pm SEM), ns: no significativo

DISCUSIÓN

- I. Generación y validación de moduladores sinápticos
- II. La señalización hormonal y el sexo biológico juegan un papel en la modulación sináptica
- III. Regulación esteroidea y apoptosis

I.- GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE MODULADORES SINÁPTICOS: DIANAS FARMACOLÓGICAS

Como hemos comentado a lo largo de esta tesis, muchos trastornos neurológicos y psiquiátricos pueden ser considerados como «sinaptopatías», es decir, enfermedades debidas a disfunciones en las sinapsis, que son las uniones a través de las cuales se comunican las neuronas. En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, los escasos medicamentos disponibles alivian de forma parcial los síntomas, no frenan ni modifican el progreso de la enfermedad. Lo cierto es que este tipo de enfermedades sigue sin cura. Aunque las muertes por otras causas importantes han disminuido significativamente, los registros oficiales en Estados Unidos indican que las muertes por la enfermedad de Alzheimer han aumentado de forma significativa. Entre 2000 y 2019, el número de muertes por enfermedad de Alzheimer registradas en los certificados de defunción se ha más que duplicado, aumentando un 145,2 %, mientras que el número de muertes por la principal causa de muerte (enfermedad cardíaca) disminuyó un 7,3 %. (*New Alzheimer's Association Report Examines Racial and Ethnic Attitudes on Alzheimer's and Dementia*).

La falta de éxito en la búsqueda de un fármaco para la enfermedad de Alzhéimer ha sido una de las mayores frustraciones de la medicina moderna, con una tasa de fracaso de más del 99 %. Sin embargo, de este fracaso también se han obtenido enseñanzas que han servido para buscar nuevos enfoques y rediseñar las estrategias terapéuticas.

1.1.- LA INTERACCIÓN ENTRE NCS1 Y RIC8a COMO DIANA TERAPÉUTICA

Anteriormente nuestro laboratorio había demostrado cómo la interacción de *NCS-1* y *Ric8a* emerge como una diana terapéutica para las enfermedades que afectan las sinapsis, debido al papel de esta interacción en la regulación del número de sinapsis y la liberación de neurotransmisores (Romero-Pozuelo et al., 2007) (Dason et al., 2009). En este contexto, los resultados *in vivo* realizados durante este trabajo, muestran que la estabilización del complejo *NCS-1 / Ric8a* mediada por una acilhidrazona denominada compuesto 3b, aumenta el número de sinapsis hasta niveles normales, exclusivamente en presencia de una patología sináptica, que es un requisito esencial para cualquier tratamiento dirigido a las sinapsis. Por lo tanto, el compuesto 3b constituye un compuesto prototípico prometedor para futuras investigaciones en el tratamiento de

trastornos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer, Huntington o Parkinson caracterizadas por una disminución en el número y la eficacia de las sinapsis que precede a la muerte neuronal (Figura 1D).

El compuesto 3b fue identificado por química combinatoria dinámica, actualmente se trabaja en identificar otros derivados más eficaces y con mejores características farmacocinéticas.

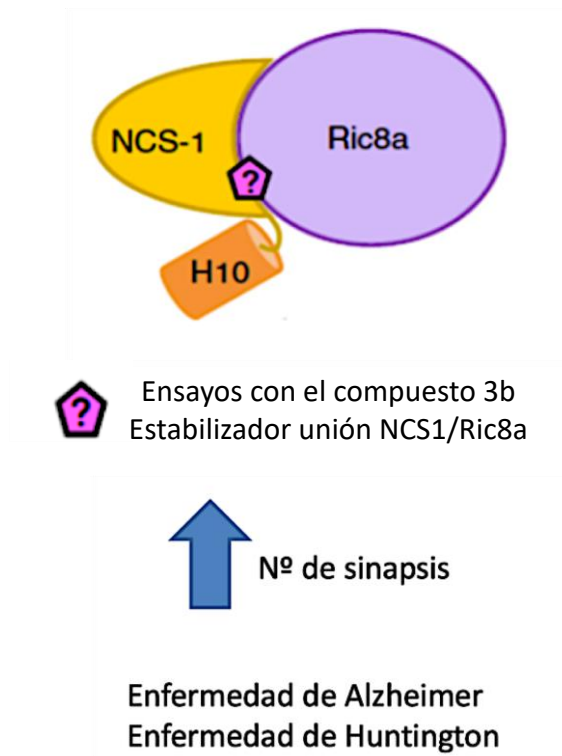


Figura 1D. Este complejo proteico puede ser usado como diana para tratar las sinaptopatías. El compuesto 3b, es un compuesto estabilizador del complejo NCS1/Ric8a que puede servir como regulador de cara a aumentar el número de sinapsis en contextos neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington.

Lo más interesante de la interacción entre *NCS-1* y *Ric8a* como diana terapéutica es que se trata de una diana generalista común a todas las patologías, ya que la sinapsis siempre se ve alterada de forma directa o indirecta. Es un abordaje nuevo y relevante que no pretende resolver una vía específica alterada en una patología concreta, sino que al tratarse de un mecanismo de control del número y actividad sináptica puede ser clave en muchas patologías independientemente de su etiología.

1.2.- COMPUESTOS IMIDAZÓLICOS: Comp3 COMO NUEVO CANDIDATO FARMACOLÓGICO

En los últimos años, grupos de investigación con los que se ha colaborado en este trabajo, han descrito la síntesis de una nueva familia de compuestos con alta afinidad y selectividad para los receptores imidazólicos I2. Estos receptores están alterados en el cerebro de pacientes con Alzheimer (Abás et al., 2020). La densidad de estos receptores aumenta post mortem en la enfermedad de Alzheimer hasta un 63% (García-Sevilla et al., 1999), y también se ha sugerido que I2 puede ser un marcador de la gravedad y malignidad de los glioblastomas humanos (Imperial College London, 2021). Un ejemplo de la potencialidad farmacológica de compuestos ligando de estos receptores, es la del compuesto Garsevil (LSL60101). Este compuesto, fue descrito por primera vez en 1995 como un ligando específico de los receptores I2 y destaca por sus propiedades en farmacocinéticas, fácil síntesis y bajo coste, también muestra una alta afinidad y selectividad con estos receptores en el cerebro humano. Se demostró que este compuesto mejora el déficit cognitivo en modelos murinos de neurodegeneración y Alzheimer (Rodríguez-Arévalo et al., 2021). También, se ha comprobado en ratones los efectos de este compuesto son más beneficiosos que los del Donepezil (inhibidor de acetilcolinesterasa), uno de los pocos fármacos comercializados para tratar el Alzheimer.

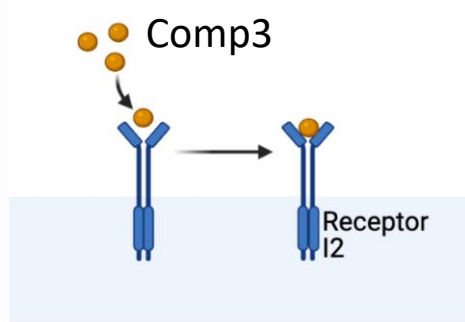
A nivel molecular, se observó que el LSL60101 fue capaz de reducir el número de placas de beta amiloide y los niveles de esta proteína alterada en el cerebro de los animales tratados, además de reducir la fosforilación de la proteína tau, otro de los biomarcadores importantes de la progresión de la enfermedad (Rodríguez-Arévalo et al., 2021).

Otro de los ejemplos acerca del uso de compuestos afines a los receptores imidazólicos es Idazoxan, una droga ampliamente estudiada desde los años 90. Este compuesto se está investigando como tratamiento adyuvante en la esquizofrenia y es capaz de mejorar los efectos terapéuticos de los antipsicóticos, posiblemente mejorando la neurotransmisión de dopamina en la corteza prefrontal del cerebro, un área del cerebro que se cree que está involucrada en la patogenia de la esquizofrenia (Bousquet et al., 1999). Además, ha demostrado ser una clara diana terapéutica ante contextos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (F. Zhang et al., 2020). Un tercer

ejemplo de la potencialidad terapéutica de compuestos ligando-imidazólicos de I2 es CR4056. Está caracterizado por una potente actividad analgésica en diferentes modelos animales experimentales de dolor, además en un ensayo clínico reciente de fase II, CR4056 redujo eficazmente el dolor en pacientes con osteoartritis de rodilla.

En este trabajo se han testado una batería de compuestos-ligando de receptores I2 encontrando el compuesto Comp 3 como un candidato válido y probado de modulación sináptica en un modelo neurodegenerativo tanto de la enfermedad de Alzheimer. Este compuesto además es capaz de revertir el defecto de la pérdida de actividad locomotora de las moscas tanto para el modelo de Alzheimer como para el de Huntington. El compuesto Comp3 se postula aquí como un buen candidato farmacológico ante la disfunción sináptica. Las perspectivas futuras que se plantean es saltar al siguiente nivel de investigación con ensayos en modelos murinos.

Por otro lado, en este trabajo también se pone de manifiesto el uso de la mosca como herramienta avatar de *screenings* farmacológicos. En un corto periodo de tiempo fue posible testar múltiples compuestos con obtención de resultados relevantes y a bajo coste experimental.



- Ensayos con compuestos ligandos de receptores Imidazólicos I₂.

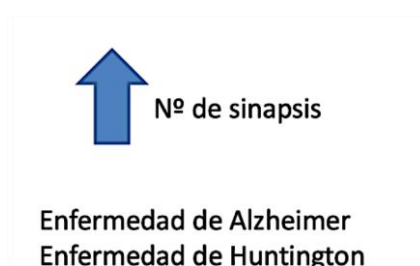


Figura 2D. Los compuestos ligando para receptores I2, en concreto Comp3, pueden contemplarse como diana para tratar las sinaptopatías. El compuesto Comp3, tiene una alta afinidad por los receptores I2 y consigue a aumentar el número de sinapsis y la actividad locomotora en contextos neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington.

La función neuronal, entendida como el número de sinapsis y su actividad, es el principal determinante en el procesamiento cerebral, los cambios que se desvían de la normalidad pueden conducir a enfermedades neurológicas. En nuestro trabajo usando como modelo la mosca observamos, en las larvas y adultos, que los machos y las hembras muestran diferencias significativas en el número de sinapsis de la unión neuromuscular ante la sobreexpresión del receptor esteroideo de ecdisona.

En esta tesis probamos que el receptor de ecdisona juega un papel en el control del número de sinapsis de una manera específica de isoforma, relativa a la isoforma A del receptor. En la larva la sobreexpresión de la isoforma A del receptor disminuye el número de sinapsis en los machos, pero en una vez alcanzada la etapa adulta el fenotipo es el inverso, siendo las hembras las que ven reducido drásticamente el número de sinapsis ante la sobreexpresión del receptor (Figura 18R).

En las hembras adultas el número de sinapsis y la capacidad locomotora se encuentran altamente afectados ante la sobreexpresión de *EcRA* tanto en el circuito poco dimórfico de la NMJ como en el circuito altamente dimórfico *dsx*.

Aunque hablemos de la mosca, estos resultados ponen de manifiesto la importancia del receptor de hormonas en el establecimiento sináptico y los posibles efectos derivados de su alteración en patologías neurológicas.

Específicamente, en humanos, las acciones de las hormonas sexuales durante el desarrollo temprano pueden conferir una vulnerabilidad inherente del cerebro femenino al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas en la edad avanzada.

II.- LA SEÑALIZACIÓN HORMONAL Y EL SEXO BIOLÓGICO JUEGAN UN PAPEL EN LA MODULACIÓN SINÁPTICA

2.1.- EL PAPEL DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL EN LA SINAPSIS

Las diferencias cerebrales en función del sexo son evidentes en múltiples especies del reino animal como en la mosca el circuito *dsx*, estudiado en esta Tesis doctoral. Otros ejemplos los encontramos en especies de aves donde el macho usa el canto para atraer a las hembras. En este caso, los machos tienen dos núcleos cerebrales significativamente más grandes en comparación con las hembras. En los roedores, las diferencias sexuales son muy acusadas en varios núcleos cerebrales que controlan la fisiología reproductiva y ciertos comportamientos de una manera específica del sexo. En los humanos las

diferencias anatómicas en función del sexo son mucho menos evidentes, quizás porque dominan las diferencias por otras variables, como las ambientales (Turano et al., 2019). La presencia o ausencia de andrógenos durante el desarrollo perinatal organiza ciertas estructuras y funciones del cerebro de una manera sexualmente dimórfica. Las consecuencias de esta organización se hacen evidentes después de la "activación" de estas regiones sexualmente dimórficas durante la pubertad. Esa activación está inducida por hormonas sexuales, testosterona (machos) y estrógeno y progesterona (hembras). Si bien los andrógenos son mediadores esenciales en la diferenciación sexual del cerebro, también es importante tener en cuenta que cada célula tiene un sexo intrínseco.

En *Drosophila melanogaster* hembras y machos producen el mismo tipo de hormona, a unos niveles similares y las diferencias en la expresión de los receptores tampoco son significativas (Schwedes & Carney, 2012), es por ello, que es buen modelo para estudiar el papel de la identidad sexual a nivel celular.

Nuestros resultados sobreexpresando uno de los genes de determinación sexual, el gen *Tra*, que sólo se traduce a proteína en hembras y que está bastante arriba en la jerarquía de determinación, es que se consiguen revertir todos los fenotipos encontrados de sensibilidad diferencial a los niveles de *EcRA*.

Estos efectos son independientes si el fenotipo dimórfico era patente en los machos (larva) o en las hembras (adulto), sino que el mero hecho de alterar en un dominio celular específico la cascada de determinación sexual ya supone un cambio de contexto celular que contrarresta cualquier modificación en la señalización de los receptores esteroideos.

De acuerdo con las diferencias dimórficas en sistema nervioso entre sexos, está demostrado que las mujeres experimentan mayor dolor clínico, menor umbral de dolor y tolerancia, más sensibilidad y angustia al dolor inducido experimentalmente en comparación con los hombres (Bartley & Fillingim, 2013).

Además, la evidencia clínica emergente ha sugerido que la desregulación del sueño puede tener un impacto sobre la salud más severa en las mujeres que en los hombres (Brivio et al., 2020). Se sabe que los trastornos del sueño tienen su origen en el desarrollo y parecen verse afectados por las hormonas. El tratamiento inadecuado sin introducir el sexo como variable, podría tener efectos considerables, ya que los

trastornos del sueño se suelen relacionar con la depresión, y la depresión se asocia con más frecuencia a las mujeres que a los hombres.

En definitiva, los efectos combinados de los efectos organizacionales y de activación de los esteroides sexuales producen diferencias en las manifestaciones de la patología del cerebro. Considerar el sexo biológico como un factor en la investigación clínica puede ser revelador para comprender el cerebro y para el desarrollo de la medicina personalizada.

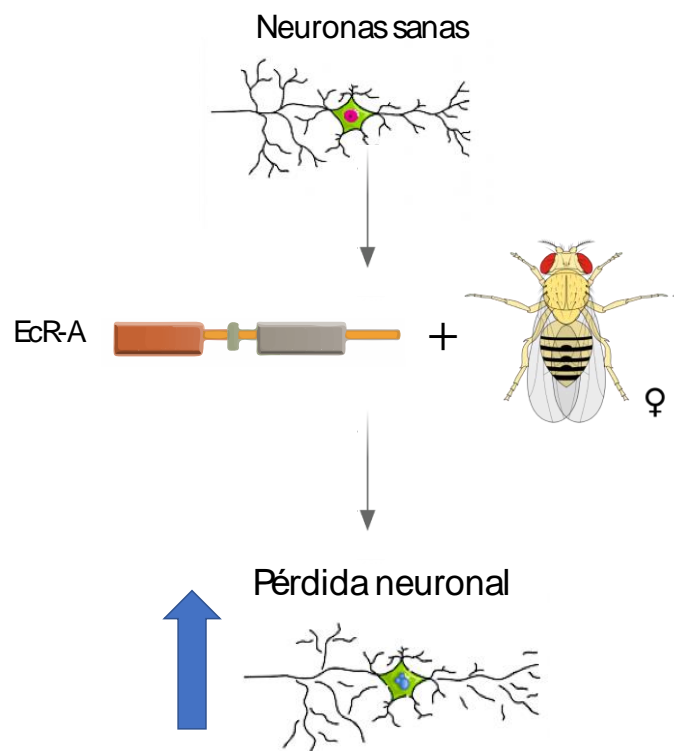


Figura 3D. El receptor de ecdisona juega un papel en el control del número de sinapsis de una manera específica de isoforma y específica del sexo. El contexto del sexo hembra conlleva un mayor efecto de pérdida sináptica o de neuritas en el adulto.

2.2.- INFLUENCIA DEL SEXO EN LOS MODELOS NEURODEGENERATIVOS

El impacto de los trastornos neurodegenerativos en los seres humanos tiene múltiples consecuencias debido al deterioro progresivo del rendimiento cognitivo y físico. Estos trastornos tienen diversas manifestaciones y están influenciados por factores genéticos y de estilo de vida, condiciones de salud concurrentes, así como factores de riesgo predisponentes no modificables, incluidos el género y la edad avanzada. La evidencia

acumulada indica un sesgo natural dependiente del género de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis múltiple, con la proporción de prevalencia entre hombres y mujeres, así como la gravedad de la enfermedad que difieren significativamente entre los dos sexos (Ullah et al., 2019).

En este trabajo de tesis doctoral encontramos que un circuito neuronal muy diferente entre machos y hembras como es el circuito DSX se ve gravemente alterado ante la sobre-expresión de proteína amiloide o huntingtina mutada. Este resultado es interesante ya que no existen muchos datos publicados acerca de diferencias dimórficas en la progresión de la enfermedad de Huntington. Nosotros hemos demostrado que las hembras claramente sufren una pérdida en el área total de las neuronas DSX ante la expresión de la Huntingtina mutada (Figura 23R). Esto puede concordar con un estudio observacional reciente, llamado global Enroll-HD (Hentosh et al., 2021), realizado en humanos, en el que se observó que las mujeres con la enfermedad de Huntington tienen peores síntomas motores, cognitivos y depresivos que los hombres con la enfermedad, En particular ambos sexos habían empeorado los síntomas motores en el transcurso de cuatro visitas, pero había una disparidad significativa entre los sexos, y las mujeres presentaban sistemáticamente más síntomas que los hombres. Para los síntomas de comportamiento, específicamente los síntomas depresivos, las mujeres tenían significativamente más síntomas depresivos, aunque los síntomas auto-informados en ambos sexos se volvieron menos severos con el tiempo.

Además, validamos el modelo de *Drosophila* como un modelo fácil y eficaz para estudiar a nivel molecular los efectos sobre la sinapsis en función del sexo.

2.3.- EFECTO SINÉRGICO ENTRE EL RECEPTOR DE ECDISONA Y EL CONTEXTO NEURODEGENERATIVO DE HD Y ALZHEIMER

Según los resultados obtenidos, el efecto de *EcRA* junto con la sobreexpresión de $a\beta_{42}$ Arc2E conlleva un efecto sinérgico de pérdida de neuritas aún mayor que con sólo el efecto derivado de la sobreexpresión de *EcRA*. Este hecho lleva a pensar que la actividad de un receptor esteroideo unida a una patología neurodegenerativa puede complicar aún más la viabilidad neuronal. En humanos, algunas investigaciones sugiere que la terapia hormonal, seguida por numerosas mujeres para aliviar algunos síntomas

de la menopausia, podría incrementar el riesgo de enfermedad de Alzheimer (EA) (Savolainen-Peltonen et al., 2019). La hormonoterapia, también llamada tratamiento hormonal, consiste en "volver a agregar" hormonas como el estrógeno (y a menudo también una progestina) para aliviar los síntomas de la menopausia. La terapia hormonal se ha prescrito para tratar los síntomas de la perimenopausia y la menopausia desde la década de 1940.

En este estudio de Savolainen-Peltonen se observó a 84.739 mujeres posmenopáusicas diagnosticadas de EA en Finlandia entre 1999 y 2013. Los investigadores compararon a esas mujeres con otras que no habían sido diagnosticadas de EA.

Revisando los expedientes de salud, tres cuartas partes de las mujeres habían estado tomando la terapia hormonal durante más de diez años. Se encontró que las mujeres que tomaban terapia hormonal tenían un riesgo un 9-17% más alto de desarrollar EA. En las mujeres que comenzaron con terapia hormonal antes de los 60 años, el aumento en el riesgo se vinculó con el uso a largo plazo de una década o más.

El estudio no encontró una diferencia en el riesgo de EA según la formulación de la terapia hormonal (pastillas, parches, geles o cremas). El riesgo fue similar independientemente de que las mujeres tomaran solo estrógeno, o estrógeno y progesterona a la vez (Savolainen-Peltonen et al., 2019).

La terapia hormonal ha sido controvertida en las últimas décadas, ya que estudios la han asociado con beneficios de salud, reduciendo el riesgo de osteoporosis y mejorando algunas medidas de salud cardíaca pero también con riesgos, incluyendo vínculos con el cáncer y accidentes cerebrovasculares. El temor por el potencial cáncer y otros riesgos ha alimentado una dramática disminución en el número de mujeres que usan la terapia de reemplazo hormonal en los últimos 15 años.

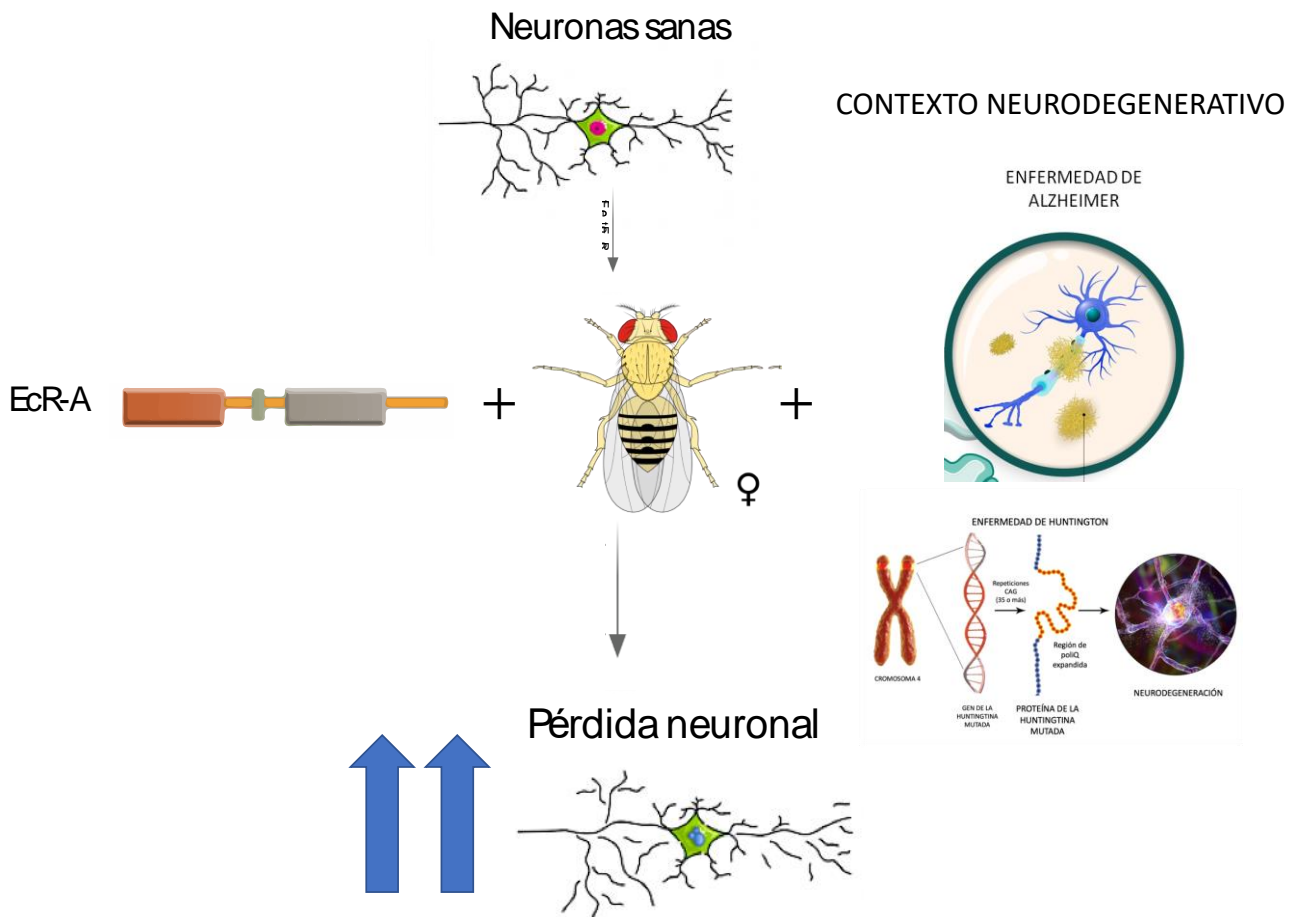


Figura 4D. La disfunción sináptica puede verse agravada debido a los efectos de *EcRA* así como del sexo del individuo y un contexto neurodegenerativo. Los animales que sobreexpresan *EcRA* ya ven mermado el área total neuronal, pero al sumarles un contexto neurodegenerativo este hecho se agrava. Además de nuevo, son las hembras las que notan más estos efectos.

III. REGULACIÓN ESTEROIDEA Y APOPTOSIS

3.1 PAPEL DE LOS RECEPTORES ESTEROIDEOS EN LA NEURITOGÉNESIS A TRAVÉS DEL CONTROL DE GENES APOPTÓTICOS.

Todas las neuronas de nuestro cuerpo tienen un ciclo vital. Se forman, viven, ejercen sus funciones y finalmente mueren. De hecho, se trata de algo que ocurre constantemente en diferentes sistemas del organismo.

Sin embargo, el sistema nervioso es un caso particular en el que, una vez en la edad adulta, apenas se van a producir nuevas neuronas. Y las que ya tenemos no van a vivir eternamente: poco a poco y por distintas razones, van a ir degenerando y muriendo. La apoptosis neuronal representa un programa de suicidio intrínseco mediante el cual una neurona orquesta su propia destrucción. Durante el desarrollo normal del sistema nervioso, la pérdida neuronal fisiológicamente apropiada contribuye a un proceso de esculpido que elimina aproximadamente la mitad de todas las neuronas nacidas durante la neurogénesis (Cavallaro, 2015).

Además los sistemas nerviosos de los insectos metamórficos se reforman drásticamente durante la transición entre formas larvarias y adultas mediante la eliminación de neuronas larvarias redundantes y la reutilización de neuronas que sobreviven, podan y luego vuelven a crecer para generar arborizaciones específicas para adultos de *novo* (Truman, 1990).

Durante el desarrollo de *Drosophila*, la hormona esteroide ecdisona juega un papel clave en la transición del embrión a la larva y luego a la pupa. Es durante la metamorfosis larva-pupa cuando se produce una muerte celular programada extensa para eliminar grandes tejidos larvarios obsoletos. Durante esta transición, los pulsos de ecdisona controlan la expresión de factores de transcripción específicos que impulsan la expresión de genes clave implicados en la muerte celular, controlando así espacial y temporalmente la muerte celular programada. El papel y la regulación de la muerte celular programada de las neuronas durante el desarrollo metamórfico temprano del sistema nervioso central (SNC) en *Drosophila melanogaster* se desconoce en gran medida, saber más sobre este hecho puede arrojar luz acerca del comportamiento y la organización del cerebro de la mosca adulta, que puede ser extrapolable a otros organismos.

Como se ha mostrado en esta tesis, en los cerebros de hembra adulta dónde se sobreexpresa *EcRA*, existen un número de células caspasa 3 positivas en el día 1 y 3 post eclosión que no se encuentran en el cerebro de los machos. Lo que significa que en el cerebro hembra pero no en el de macho, hay células concretas con especial sensibilidad a la actividad de *EcRA*.

Ya estaba descrito, que, con la emergencia de la fisiología adulta, el cordón ventral de *Drosophila* muestra un grupo de aproximadamente 300 neuronas, que, a su vez, expresan niveles 10 veces más altos de la isoforma A del receptor de ecdisona que otras neuronas centrales. Este patrón de expresión se establece temprano en la metamorfosis y persiste durante el resto de la etapa de pupa. Aunque estas células representan un grupo heterogéneo de neuronas, todas comparten el mismo destino de sufrir una rápida degeneración después de que el adulto emerge de la pupa. Un requisito previo para esta muerte celular es la disminución de los ecdisteroides al final de la metamorfosis (Robinow et al., 1993).

La correlación de un patrón único de expresión de isoformas del receptor con un destino particular de muerte celular regulado por esteroides sugiere que las variaciones en el patrón de expresión de la isoforma A del receptor puede servir como un interruptor importante durante el desarrollo. Y tras nuestros resultados, este evento resulta de especial importancia en las hembras y en la organización del cerebro adulto en los primeros 3 días de la fisiología cerebral adulta.

Un estudio en ratas demuestra que el estradiol puede funcionar como agente neuroprotector o inductor de apoptosis, dependiendo del subtipo de receptor de estrógeno presente en la célula. Por tanto, *ERalpha* tiene un efecto neuroprotector, mientras que *ERbeta* media la inducción de apoptosis en células neuronales. Además, la apoptosis inducida por estrógenos a través de ER-beta requiere la expresión de las proteínas Fas y ligando Fas (*FasL*), ya que la ausencia de *FasL* en las neuronas previene este efecto (Villa et al., 2016).

Por otro lado, está documentado en humanos que el estrógeno estimula el crecimiento e inhibe la apoptosis a través de mecanismos mediados por receptores de estrógeno en muchos tipos de células (Lewis-Wambi & Jordan, 2009). Otros trabajos dicen que existe una fuerte evidencia de que el estrógeno induce la apoptosis en el cáncer de mama y otros tipos de células. Hace cuarenta años, antes del desarrollo del tamoxifeno, se

usaban altas dosis de estrógeno para inducir la regresión tumoral del cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas (Lewis-Wambi & Jordan, 2009). En resumen, la interacción entre las vías de muerte celular y la maquinaria hormonal tienen una presencia activa en desarrollos de eventos patológicos.

Tras este hecho y como hemos comentado, en el sistema nervioso de la mosca, la apoptosis juega un papel importante en la construcción de redes neuronales, donde se eliminan hasta el 50% de las neuronas generadas (Dekkers et al., 2013). La sobreexpresión de *EcRA* modifica el área total del circuito *dsx* sin verse afectado el número de neuronas. Pero sorprendentemente, la inhibición de expresión de un gen proapoptótico (*Reaper*), es capaz de recuperar el fenotipo derivado de la sobreexpresión de *EcRA* en este circuito. Está bien documentado que los genes *Grim* y *Reaper*, dos de las cuatro proteínas proapoptóticas de la vía de muerte celular de *Drosophila*, son necesarias para la poda de neuronas sensoriales (Mukherjee et al., 2021). Y también está descrito que la inhibición de la actividad de las caspasas protege a los componentes del citoesqueleto de la proteólisis aumentando su capacidad de protrusión y movimiento hacia delante (Kellermeyer et al., 2018), lo que sugiere que los cambios transitorios y locales en la activación local de las caspasas contribuye a la remodelación neuronal de las sinapsis (Gilman & Mattson, 2002). Las señales atrayentes y repelentes modulan la actividad de las caspasas a través receptores de la superficie celular para alterar la trayectoria del cono de crecimiento. La activación de caspasas provoca que los axones no lleguen a su neurona diana y promueve la formación de sinapsis incorrectas (Chen et al., 2020).

En este trabajo demostramos cómo la inhibición de genes de apoptosis puede mitigar los efectos surgidos en la pérdida de volumen neuronal debida a la sobreexpresión de un receptor de hormonas. Por primera vez relacionamos la vía de señalización de una hormona esteroidea, con la expresión de genes de apoptosis a niveles subletales, es decir niveles que no causan muerte celular pero que claramente están relacionados con la remodelación de la anatomía de la neurona. Mirando hacia el futuro, esperamos que al etiquetar genéticamente estas proteínas proapoptóticas y comparar su dinámica y localización en neuronas en proceso de poda versus neuronas moribundas, podamos comprender mejor su mecanismo de acción en procesos subletales no apoptóticos.

CONCLUSIONES

1. La estabilización del complejo *NCS1/Ric8a* se postula como diana terapéutica para la recuperación de la función sináptica. El compuesto 3b es capaz de recuperar la función sináptica en los modelos neurodegenerativos de mosca y ratón.
2. Los estudios con los receptores I2 abren nuevas vías de investigación como moduladores sinápticos ante enfermedades neurodegenerativas. El compuesto Comp3, agonista del receptor Imidazólico I2 tiene efectos beneficiosos ante la pérdida sináptica en contextos neurodegenerativos de Huntington y Alzheimer
3. La sobreexpresión de un receptor esteroideo, en concreto la isoforma A del receptor de ecdisona (*EcRA*) en *Drosophila melanogaster* regula la sinapsis y/o neuritogénesis de una manera dimórfica y dependiente de ligando.
4. La sobreexpresión de *EcRA* en el cerebro produce muerte celular programada dependiente del sexo y con especificidad espacio-temporal. Siendo un grupo concreto de neuronas afectadas de los cerebros de adultos hembra en un periodo de tiempo definido.
5. La inhibición de un gen pro-apoptótico mejora el fenotipo neural encontrado por la sobreexpresión de *EcRA*, por lo que la vía apoptótica está implicada en la regulación sináptica y en la remodelación de neuritas mediada por *EcRA*.
6. El sexo influye en el desarrollo de las patologías neurodegenerativas en los modelos de Alzheimer y Huntington en *Drosophila melanogaster*. La regulación de la señalización esteroidea está implicada en el progreso de estas patologías neurodegenerativas en los modelos de *Drosophila melanogaster*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abás, S., Rodríguez-Arévalo, S., Bagán, A., Griñán-Ferré, C., Vasilopoulou, F., Brocos-Mosquera, I., Muguruza, C., Pérez, B., Molins, E., Luque, F. J., Pérez-Lozano, P., de Jonghe, S., Daelemans, D., Naesens, L., Brea, J., Loza, M. I., Hernández-Hernández, E., García-Sevilla, J. A., García-Fuster, M. J., ... Escolano, C. (2020). Bicyclic α -Iminophosphonates as High Affinity Imidazoline I2 Receptor Ligands for Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(7), 3610-3633. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02080>
- Barker, R., Ashby, E. L., Wellington, D., Barrow, V. M., Palmer, J. C., Kehoe, P. G., Esiri, M. M., & Love, S. (2014). Pathophysiology of white matter perfusion in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain: A Journal of Neurology*, 137(Pt 5), 1524-1532. <https://doi.org/10.1093/brain/awu040>
- Barreto, G. E., McGovern, A. J., & Garcia-Segura, L. M. (2021). Role of Neuroglobin in the Neuroprotective Actions of Estradiol and Estrogenic Compounds. *Cells*, 10(8), 1907. <https://doi.org/10.3390/cells10081907>
- Bartley, E. J., & Fillingim, R. B. (2013). Sex differences in pain: A brief review of clinical and experimental findings. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 111(1), 52-58. <https://doi.org/10.1093/bja/aet127>
- Bektas, N., Nemutlu, D., & Arslan, R. (2015). The imidazoline receptors and ligands in pain modulation. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(5), 472-478. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.165196>
- Bellen, H. J., Tong, C., & Tsuda, H. (2010). 100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: A history lesson for the future. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(7), 514-522. <https://doi.org/10.1038/nrn2839>
- Bender, M., Imam, F. B., Talbot, W. S., Ganetzky, B., & Hogness, D. S. (1997). Drosophila Ecdysone Receptor Mutations Reveal Functional Differences among Receptor Isoforms. *Cell*, 91(6), 777-788. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80466-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80466-3)
- Bousquet, P., Bruban, V., Schann, S., Grenay, H., Ehrhardt, J. D., Dontenwill, M., & Feldman, J. (1999). Participation of imidazoline receptors and alpha (2)-adrenoceptors in the central hypotensive effects of imidazoline-like drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 881, 272-278. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09369.x>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401-415.
- Brivio, E., Lopez, J. P., & Chen, A. (2020). Sex differences: Transcriptional signatures of stress exposure in male and female brains. *Genes, Brain and Behavior*, 19(3), e12643. <https://doi.org/10.1111/gbb.12643>
- Budnik, V., & Ruiz-Canada, C. (2006). *The Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function:*

Second Edition. Elsevier.

- Canal-Martín, A., Sastre, J., Sánchez-Barrena, M. J., Canales, A., Baldominos, S., Pascual, N., Martínez-González, L., Molero, D., Fernández-Valle, M. E., Sáez, E., Blanco-Gabella, P., Gómez-Rubio, E., Martín-Santamaría, S., Sáiz, A., Mansilla, A., Cañada, F. J., Jiménez-Barbero, J., Martínez, A., & Pérez-Fernández, R. (2019). Insights into real-time chemical processes in a calcium sensor protein-directed dynamic library. *Nature Communications*, *10*, 2798. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10627-w>
- Carroll, J. C., & Rosario, E. R. (2012). The potential use of hormone-based therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, *9*(1), 18-34. <https://doi.org/10.2174/156720512799015109>
- Cavallaro, S. (2015). Cracking the code of neuronal apoptosis and survival. *Cell Death & Disease*, *6*(11), e1963-e1963. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.309>
- Chen, X., Jiang, Y., Wang, J., Liu, Y., Xiao, M., Song, C., Bai, Y., Yinuo Han, N., & Han, F. (2020). Synapse impairment associated with enhanced apoptosis in post-traumatic stress disorder. *Synapse (New York, N.Y.)*, *74*(2), e22134. <https://doi.org/10.1002/syn.22134>
- Choi, Y.-J., Lee, G., & Park, J. H. (2006). Programmed cell death mechanisms of identifiable peptidergic neurons in *Drosophila melanogaster*. *Development (Cambridge, England)*, *133*(11), 2223-2232. <https://doi.org/10.1242/dev.02376>
- Crowther, D. C., Kinghorn, K. J., Miranda, E., Page, R., Curry, J. A., Duthie, F. a. I., Gubb, D. C., & Lomas, D. A. (2005). Intraneuronal Abeta, non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *132*(1), 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.12.025>
- D'Amelio, M., Sheng, M., & Cecconi, F. (2012). Caspase-3 in the central nervous system: Beyond apoptosis. *Trends in Neurosciences*, *35*(11), 700-709. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.004>
- Dason, J. S., Romero-Pozuelo, J., Marin, L., Iyengar, B. G., Klose, M. K., Ferrús, A., & Atwood, H. L. (2009). Frequenin/NCS-1 and the Ca²⁺-channel α 1-subunit co-regulate synaptic transmission and nerve-terminal growth. *Journal of Cell Science*, *122*(22), 4109-4121. <https://doi.org/10.1242/jcs.055095>
- Dekkers, M. P. J., Nikolettou, V., & Barde, Y.-A. (2013). Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: new insights and implications for connectivity. *The Journal of Cell Biology*, *203*(3), 385-393. <https://doi.org/10.1083/jcb.201306136>
- Dicthenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H., & Bassell, G. J. (2008). A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Developmental Cell*, *14*(6), 926-939. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.04.003>
- Doody, R. S., Thomas, R. G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P. S., Siemers, E., Liu-Seifert, H., Mohs, R., Alzheimer's Disease

- Cooperative Study Steering Committee, & Solanezumab Study Group. (2014). Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 370(4), 311-321. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312889>
- Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santuccion Chadha, A., Baracchi, F., Girouard, H., Misoch, S., Giacobini, E., Depypere, H., Hampel, H., & Women's Brain Project and the Alzheimer Precision Medicine Initiative. (2018). Sex differences in Alzheimer disease—The gateway to precision medicine. *Nature Reviews. Neurology*, 14(8), 457-469. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0032-9>
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E., Scazufca, M., & Alzheimer's Disease International. (2005). Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study. *Lancet (London, England)*, 366(9503), 2112-2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0)
- García-Sevilla, J. A., Escribá, P. V., & Guimón, J. (1999). Imidazoline receptors and human brain disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 881, 392-409. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09388.x>
- Gilman, C. P., & Mattson, M. P. (2002). Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromolecular Medicine*, 2(2), 197-214. <https://doi.org/10.1385/NMM:2:2:197>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., & James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704-706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Handler, A. M. (1982). Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 93(1), 73-82. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90240-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90240-8)
- Hentosh, S., Zhu, L., Patino, J., Furr, J. W., Rocha, N. P., & Furr Stimming, E. (2021). Sex Differences in Huntington's Disease: Evaluating the Enroll-HD Database. *Movement Disorders Clinical Practice*, 8(3), 420-426. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13178>
- Imperial College London. (2021). *I2PETHV - Quantification and Localisation of Imidazoline2 Binding Sites in Healthy Volunteers Using [11C] BU99008 a Positron Emission Tomography Study* (Clinical trial registration N.º NCT02323217). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02323217](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02323217)
- Ishimoto, H., & Kitamoto, T. (2010). The steroid molting hormone Ecdysone regulates sleep in adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 185(1), 269-281. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.114587>
- Jordán-Álvarez, S., Santana, E., Casas-Tintó, S., Acebes, Á., & Ferrús, A. (2017). The equilibrium between antagonistic signaling pathways determines the number of synapses in *Drosophila*. *PLoS One*, 12(9), e0184238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184238>

- Kannangara, J. R., Mirth, C. K., & Warr, C. G. (2021). Regulation of ecdysone production in *Drosophila* by neuropeptides and peptide hormones. *Open Biology*, *11*(2), 200373. <https://doi.org/10.1098/rsob.200373>
- Kaufman, J.-M., & Lapauw, B. (2020). Role of testosterone in cognition and mobility of aging men. *Andrology*, *8*(6), 1567-1579. <https://doi.org/10.1111/andr.12872>
- Kellermeyer, R., Heydman, L. M., Mastick, G. S., & Kidd, T. (2018). The Role of Apoptotic Signaling in Axon Guidance. *Journal of Developmental Biology*, *6*(4), E24. <https://doi.org/10.3390/jdb6040024>
- Kim, A. J., Cha, G. H., Kim, K., Gilbert, L. I., & Lee, C. C. (1997). Purification and characterization of the prothoracicotropic hormone of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(4), 1130-1135. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1130>
- Kim, Y. J., Soto, M., Branigan, G. L., Rodgers, K., & Brinton, R. D. (2021). Association between menopausal hormone therapy and risk of neurodegenerative diseases: Implications for precision hormone therapy. *Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.)*, *7*(1), e12174. <https://doi.org/10.1002/trc2.12174>
- Kodama, L., & Gan, L. (2019). Do Microglial Sex Differences Contribute to Sex Differences in Neurodegenerative Diseases? *Trends in Molecular Medicine*, *25*(9), 741-749. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.05.001>
- Koelle, M. R., Talbot, W. S., Segraves, W. A., Bender, M. T., Cherbas, P., & Hogness, D. S. (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*, *67*(1), 59-77. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90572-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90572-g)
- Körber, C., & Kuner, T. (2016). Molecular Machines Regulating the Release Probability of Synaptic Vesicles at the Active Zone. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *8*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00005>
- Kraft, R., Levine, R. B., & Restifo, L. L. (1998). The Steroid Hormone 20-Hydroxyecdysone Enhances Neurite Growth of *Drosophila* Mushroom Body Neurons Isolated during Metamorphosis. *The Journal of Neuroscience*, *18*(21), 8886-8899. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08886.1998>
- Kril, J. J., Patel, S., Harding, A. J., & Halliday, G. M. (2002). Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathologica*, *103*(4), 370-376. <https://doi.org/10.1007/s00401-001-0477-5>
- Landgraf, M., & Thor, S. (2006). Development of *Drosophila* motoneurons: Specification and morphology. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *17*(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.11.007>
- Lee, G., & Park, J. H. (2021). Programmed cell death reshapes the central nervous system during metamorphosis in insects. *Current Opinion in Insect Science*, *43*, 39-45.

<https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.09.015>

- Lee, J.-Y., Bhatt, D., Bhatt, D., Chung, W.-Y., & Cooper, R. L. (2009). Furthering pharmacological and physiological assessment of the glutamatergic receptors at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *150*(4), 546-557. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.08.002>
- Lepeta, K., Lourenco, M. V., Schweitzer, B. C., Martino Adami, P. V., Banerjee, P., Catuara-Solarz, S., de La Fuente Revenga, M., Guillem, A. M., Haidar, M., Ijomone, O. M., Nadorp, B., Qi, L., Perera, N. D., Refsgaard, L. K., Reid, K. M., Sabbar, M., Sahoo, A., Schaefer, N., Sheean, R. K., ... Seidenbecher, C. (2016). Synaptopathies: Synaptic dysfunction in neurological disorders - A review from students to students. *Journal of Neurochemistry*, *138*(6), 785-805. <https://doi.org/10.1111/jnc.13713>
- Lewis-Wambi, J. S., & Jordan, V. C. (2009). Estrogen regulation of apoptosis: How can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Research: BCR*, *11*(3), 206. <https://doi.org/10.1186/bcr2255>
- Li, J.-Y., Plomann, M., & Brundin, P. (2003). Huntington's disease: A synaptopathy? *Trends in Molecular Medicine*, *9*(10), 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2003.08.006>
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, *3*(3), 175-190. <https://doi.org/10.1038/nrn753>
- Madabattula, S. T., Strautman, J. C., Bysice, A. M., O'Sullivan, J. A., Androschuk, A., Rosenfelt, C., Doucet, K., Rouleau, G., & Bolduc, F. (2015). Quantitative Analysis of Climbing Defects in a *Drosophila* Model of Neurodegenerative Disorders. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *100*, 52741. <https://doi.org/10.3791/52741>
- Mansilla, A., Chaves-Sanjuan, A., Campillo, N. E., Semelidou, O., Martínez-González, L., Infantes, L., González-Rubio, J. M., Gil, C., Conde, S., Skoulakis, E. M. C., Ferrús, A., Martínez, A., & Sánchez-Barrena, M. J. (2017). Interference of the complex between NCS-1 and Ric8a with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(6), E999-E1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611089114>
- Mansilla, A., Jordán-Álvarez, S., Santana, E., Jarabo, P., Casas-Tintó, S., & Ferrús, A. (2018). Molecular mechanisms that change synapse number. *Journal of Neurogenetics*, *32*(3), 155-170. <https://doi.org/10.1080/01677063.2018.1506781>
- Matuskey, D., Tinaz, S., Wilcox, K. C., Naganawa, M., Toyonaga, T., Dias, M., Henry, S., Pittman, B., Ropchan, J., Nabulsi, N., Suridjan, I., Comley, R. A., Huang, Y., Finnema, S. J., & Carson, R. E. (2020). Synaptic Changes in Parkinson Disease Assessed with in vivo Imaging. *Annals of Neurology*, *87*(3), 329-338. <https://doi.org/10.1002/ana.25682>
- McEwen, B. S., & Milner, T. A. (2017). Understanding the Broad Influence of Sex Hormones and Sex Differences in the Brain. *Journal of neuroscience research*, *95*(1-2), 24-39. <https://doi.org/10.1002/jnr.23809>

- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., & Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5651), 1765-1768. <https://doi.org/10.1126/science.1089035>
- Millington, J. W., & Rideout, E. J. (2018). Sex differences in *Drosophila* development and physiology. *Current Opinion in Physiology*, *6*, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.04.002>
- Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid β -protein: Synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(7), a006338. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006338>
- Mukherjee, A., Pop, S., Kondo, S., & Williams, D. W. (2021). *Proapoptotic RHG genes and mitochondria play a key non-apoptotic role in remodelling the Drosophila sensory system* (p. 2021.01.15.426850). <https://doi.org/10.1101/2021.01.15.426850>
- Nagy, Z., Esiri, M. M., Jobst, K. A., Johnston, C., Litchfield, S., Sim, E., & Smith, A. D. (1995). Influence of the apolipoprotein E genotype on amyloid deposition and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, *69*(3), 757-761. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00331-c](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00331-c)
- Nef, S., Fiumelli, H., de Castro, E., Raes, M. B., & Nef, P. (1995). Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, *15*(1-4), 365-378. <https://doi.org/10.3109/10799899509045227>
- New Alzheimer's Association Report Examines Racial and Ethnic Attitudes on Alzheimer's and Dementia*. (s. f.). Alzheimer's Disease and Dementia. Recuperado 10 de diciembre de 2021, de <https://alz.org/news/2021/new-alzheimers-association-report-examines-racial>
- Oliva, M., Muñoz-Aguirre, M., Kim-Hellmuth, S., Wucher, V., Gewirtz, A. D. H., Cotter, D. J., Parsana, P., Kasela, S., Balliu, B., Viñuela, A., Castel, S. E., Mohammadi, P., Aguet, F., Zou, Y., Khramtsova, E. A., Skol, A. D., Garrido-Martín, D., Reverter, F., Brown, A., ... Stranger, B. E. (2020). The impact of sex on gene expression across human tissues. *Science*, *369*(6509), eaba3066. <https://doi.org/10.1126/science.aba3066>
- Osimo, E. F., Beck, K., Reis Marques, T., & Howes, O. D. (2019). Synaptic loss in schizophrenia: A meta-analysis and systematic review of synaptic protein and mRNA measures. *Molecular Psychiatry*, *24*(4), 549-561. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0041-5>
- Ozdowski, E. F., Baxter, S. L., & Sherwood, N. T. (2015). Chapter 73—*Drosophila* Models of Hereditary Spastic Paraplegia. En M. S. LeDoux (Ed.), *Movement Disorders (Second Edition)* (pp. 1103-1122). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405195-9.00073-1>
- Panzica, G., & Melcangi, R. C. (2016). Structural and molecular brain sexual differences: A tool to understand sex differences in health and disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *67*, 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.017>

- Pfeiffenberger, C., Lear, B. C., Keegan, K. P., & Allada, R. (2010). Locomotor activity level monitoring using the Drosophila Activity Monitoring (DAM) System. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(11), pdb.prot5518. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5518>
- Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, 95(1-2), 671-680. <https://doi.org/10.1002/jnr.23827>
- Pinares-Garcia, P., Stratikopoulos, M., Zagato, A., Loke, H., & Lee, J. (2018). Sex: A Significant Risk Factor for Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Brain Sciences*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/brainsci8080154>
- Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X. R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H. G., Koch, K. W., Schwemer, J., & Rivosecchi, R. (1993). Frequentin—A novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the Drosophila nervous system. *Neuron*, 11(1), 15-28. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90267-u](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90267-u)
- Rapp, P. R., Morrison, J. H., & Roberts, J. A. (2003). Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5708-5714.
- Rawlins, M. D., Wexler, N. S., Wexler, A. R., Tabrizi, S. J., Douglas, I., Evans, S. J. W., & Smeeth, L. (2016). The Prevalence of Huntington's Disease. *Neuroepidemiology*, 46(2), 144-153. <https://doi.org/10.1159/000443738>
- Reiter, L. T., & Bier, E. (2002). Using Drosophila melanogaster to uncover human disease gene function and potential drug target proteins. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 6(3), 387-399. <https://doi.org/10.1517/14728222.6.3.387>
- Rezával, C., Nojima, T., Neville, M. C., Lin, A. C., & Goodwin, S. F. (2014). Sexually Dimorphic Octopaminergic Neurons Modulate Female Postmating Behaviors in Drosophila. *Current Biology*, 24(7), 725-730. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.051>
- Rezával, C., Pattnaik, S., Pavlou, H. J., Nojima, T., Brüggemeier, B., D'Souza, L. A. D., Dweck, H. K. M., & Goodwin, S. F. (2016). Activation of Latent Courtship Circuitry in the Brain of Drosophila Females Induces Male-like Behaviors. *Current Biology*, 26(18), 2508-2515. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.021>
- Rideout, E. J., Dornan, A. J., Neville, M. C., Eadie, S., & Goodwin, S. F. (2010). Control of Sexual Differentiation and Behavior by the doublesex gene in Drosophila melanogaster. *Nature neuroscience*, 13(4), 458-466. <https://doi.org/10.1038/nn.2515>
- Robinow, S., Talbot, W. S., Hogness, D. S., & Truman, J. W. (1993). Programmed cell death in the Drosophila CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development (Cambridge, England)*, 119(4), 1251-1259.
- Rodríguez-Arévalo, S., Bagán, A., Griñán-Ferré, C., Vasilopoulou, F., Pallàs, M., Brocos-Mosquera, I., Callado, L. F., Loza, M. I., Martínez, A. L., Brea, J., Pérez, B., Molins, E., De Jonghe, S., Daelemans, D., Radan, M., Djikic, T., Nikolic, K., Hernández-Hernández, E., García-Fuster, M. J., ... Escolano, C. (2021a). Benzofuranyl-2-imidazoles as imidazoline I2

receptor ligands for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 222, 113540. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113540>

Rodríguez-Arévalo, S., Bagán, A., Griñán-Ferré, C., Vasilopoulou, F., Pallàs, M., Brocos-Mosquera, I., Callado, L. F., Loza, M. I., Martínez, A. L., Brea, J., Pérez, B., Molins, E., De Jonghe, S., Daelemans, D., Radan, M., Djikic, T., Nikolic, K., Hernández-Hernández, E., García-Fuster, M. J., ... Escolano, C. (2021b). Benzofuranyl-2-imidazoles as imidazoline I2 receptor ligands for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 222, 113540. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113540>

Romero-Pozuelo, J., Dason, J. S., Atwood, H. L., & Ferrús, A. (2007). Chronic and acute alterations in the functional levels of Frequenins 1 and 2 reveal their roles in synaptic transmission and axon terminal morphology: Frequenins on neurotransmission. *European Journal of Neuroscience*, 26(9), 2428-2443. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05877.x>

Roo, M. D., Klauser, P., & Muller, D. (2008). LTP Promotes a Selective Long-Term Stabilization and Clustering of Dendritic Spines. *PLOS Biology*, 6(9), e219. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060219>

Salloway, S., Sperling, R., Fox, N. C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L. S., Porsteinsson, A. P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I. C., ... Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. (2014). Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 370(4), 322-333. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304839>

Savolainen-Peltonen, H., Rahkola-Soisalo, P., Hoti, F., Vattulainen, P., Gissler, M., Ylikorkala, O., & Mikkola, T. S. (2019). Use of postmenopausal hormone therapy and risk of Alzheimer's disease in Finland: Nationwide case-control study. *BMJ*, 364, l665. <https://doi.org/10.1136/bmj.l665>

Scharfman, H. E. (2007). The Neurobiology of Epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 7(4), 348-354.

Schwedes, C. C., & Carney, G. E. (2012). Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 58(3), 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.01.013>

Schwedes, C., Tulsiani, S., & Carney, G. E. (2011). Ecdysone receptor expression and activity in adult *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 57(7), 899-907. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.027>

Selkoe, D. J. (2011). Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a004457. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004457>

Selkoe, D., Mandelkow, E., & Holtzman, D. (2012). Deciphering Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), a011460. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011460>

- Shah, N. M., Pisapia, D. J., Maniatis, S., Mendelsohn, M. M., Nemes, A., & Axel, R. (2004). Visualizing Sexual Dimorphism in the Brain. *Neuron*, 43(3), 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.008>
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., ... St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534), 754-760. <https://doi.org/10.1038/375754a0>
- Spence, R. D., & Voskuhl, R. R. (2012). Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(1), 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.12.001>
- Talbot, W. S., Swyryd, E. A., & Hogness, D. S. (1993). Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 73(7), 1323-1337. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90359-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90359-x)
- Tan, F. H. P., & Azzam, G. (2017). Drosophila melanogaster: Deciphering Alzheimer's Disease. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 24(2), 6-20. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.2.2>
- Tapia-Gonzalez, S., Carrero, P., Pernia, O., Garcia-Segura, L. M., & Diz-Chaves, Y. (2008). Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: Potential role of microglial ERs. *The Journal of Endocrinology*, 198(1), 219-230. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0294>
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30(4), 572-580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Truman, J. W. (1990). Metamorphosis of the central nervous system of Drosophila. *Journal of Neurobiology*, 21(7), 1072-1084. <https://doi.org/10.1002/neu.480210711>
- Turano, A., Osborne, B. F., & Schwarz, J. M. (2019). Sexual Differentiation and Sex Differences in Neural Development. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 43, 69-110. https://doi.org/10.1007/7854_2018_56
- Turcano, P., & Savica, R. (2020). Sex differences in movement disorders. *Handbook of Clinical Neurology*, 175, 275-282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64123-6.00019-9>
- Ullah, M. F., Ahmad, A., Bhat, S. H., Abu-Duhier, F. M., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2019). Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 102, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.003>
- Vasilopoulou, F., Griñán-Ferré, C., Rodríguez-Arévalo, S., Bagán, A., Abás, S., Escolano, C., & Pallàs, M. (2021). I2 imidazoline receptor modulation protects aged SAMP8 mice against

cognitive decline by suppressing the calcineurin pathway. *GeroScience*, 43(2), 965-983. <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00281-2>

- Vasilopoulou, F., Rodríguez-Arévalo, S., Bagán, A., Escolano, C., Griñán-Ferré, C., & Pallàs, M. (2021). Disease-modifying treatment with I2 imidazoline receptor ligand LSL60101 in an Alzheimer's disease mouse model: A comparative study with donepezil. *British Journal of Pharmacology*, 178(15), 3017-3033. <https://doi.org/10.1111/bph.15478>
- Vest, R. S., & Pike, C. J. (2013). Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Hormones and Behavior*, 63(2), 301-307. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.04.006>
- Villa, A., Vegeto, E., Poletti, A., & Maggi, A. (2016). Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. *Endocrine Reviews*, 37(4), 372-402. <https://doi.org/10.1210/er.2016-1007>
- Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Dürrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M.-C., Schmidt, M., Qin, G., Wichmann, C., Kittel, R., Sigrist, S. J., & Buchner, E. (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron*, 49(6), 833-844. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.008>
- Wang, Z., Lee, G., Vuong, R., & Park, J. H. (2019). Two-factor specification of apoptosis: TGF- β signaling acts cooperatively with ecdysone signaling to induce cell- and stage-specific apoptosis of larval neurons during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Apoptosis*, 24(11), 972-989. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01574-4>
- Weitzdoerfer, R., Dierssen, M., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2001). Fetal life in Down syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 61, 59-70. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6262-0_5
- Xiong, Y., & Yu, J. (2018). Modeling Parkinson's Disease in *Drosophila*: What Have We Learned for Dominant Traits? *Frontiers in Neurology*, 9, 228. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00228>
- Yin, V. P., & Thummel, C. S. (2004). A balance between the diap1 death inhibitor and reaper and hid death inducers controls steroid-triggered cell death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), 8022-8027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402647101>
- Young, L. J., & Pfaff, D. W. (2014). Sex differences in neurological and psychiatric disorders. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 253-254. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.05.005>
- Zhang, F., Gannon, M., Chen, Y., Yan, S., Zhang, S., Feng, W., Tao, J., Sha, B., Liu, Z., Saito, T., Saido, T., Keene, C. D., Jiao, K., Roberson, E. D., Xu, H., & Wang, Q. (2020). β -amyloid redirects norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3 β /tau cascade. *Science Translational Medicine*, 12(526), eaay6931. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay6931>

- Zhang, Y., Tounekti, O., Akerman, B., Goodyer, C. G., & LeBlanc, A. (2001). 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(20), RC176.
- Zhang, Z., Wang, D., Sun, T., Xu, J., Chiang, H.-C., Shin, W., & Wu, L.-G. (2013). The SNARE Proteins SNAP25 and Synaptobrevin Are Involved in Endocytosis at Hippocampal Synapses. *Journal of Neuroscience*, *33*(21), 9169-9175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0301-13.2013>
- Zielonka, D., Marinus, J., Roos, R. A. C., Michele, G. D., Donato, S. D., Putter, H., Marcinkowski, J., Squitieri, F., Bentivoglio, A. R., & Landwehrmeyer, G. B. (2013). The influence of gender on phenotype and disease progression in patients with Huntington's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *19*(2), 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.09.012>
- Zitzmann, M., & Nieschlag, E. (2001). Testosterone levels in healthy men and the relation to behavioural and physical characteristics: Facts and constructs. *European Journal of Endocrinology*, *144*(3), 183-197. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1440183>

AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo de Tesis finaliza una etapa de mi vida que me hace darme cuenta de lo que representa nuestro “niño anterior” y lo que vamos dejando atrás según van pasando los años, las vivencias, los duelos, y las suertes.

Esto es para ti, Mamá, que desde arriba seguro que te has peleado con los que mueven los hilos que tenemos a la espalda para que cada paso del camino tuviera un sentido y una razón, y me has traído aquí.

A las personas que han conseguido darme aliento cuando el aire no corría entre la puerta y la ventana:

A mi hermana, Rocío, a pesar de las cabriolas que nos hacemos pasar, es mi auténtica mitad y mi corazón compartido. A Alvaro Samper, por ser el faro que acoge e ilumina cuando nada da pá más. A mi Padre, por ser el ejemplo de que cualquiera puede ser mejor, con empeño y esfuerzo.

A mis titas, que, sin ellas, yo no sé. A Ade, por tener siempre una sonrisa preparada y un poco de puré de patata. A Vivi porque todo se lo sube a la espalda y no nos deja caer a ninguno y vaya si nos remolca. A Carolina por su nobleza y acompañamiento, a veces silencioso, pero siempre presente. A Marisa, porque en su casa siempre es toda una aventura, y a Victor por su humor clásico que ahora disfrutan en el cielo. A mis primos, que los adoro, a Carlos por compartir tanto desde enanos; a Esther ídolo mío personal desde siempre; May por esa autosuperación, a Julián, a Miguel y a Greta y a Adri. A Maya y a Ingrid.

Por la ciencia que nos toca:

A la Dra. Alicia Mansilla porque este trabajo sin ella, literalmente se nos queda en un cajón de calcetines. Ella que es Mujer, Madre, Científica, Jefa, Líder, Compañera, Todoterreno y sobre todo Valiente. Un auténtico ejemplo a seguir que ha tenido que ir rompiendo techo, paredes y cimientos de cristal para llegar donde está y sin duda, lo

merece. Tenemos mucho que aprender de ella, y me alegro por todos los estudiantes que la tendrán de guía en un futuro, porque además de enseñarte todo lo que sabe (que es mucho), siempre con una paciencia infinita y con toda la confianza de una verdadera compañera y maestra. Llegarás muy lejos, gracias por creer en mi a pesar de todo.

Al laboratorio del C12 del Instituto Cajal, mi segunda casa. Al Dr. Alberto Ferrús por su sabiduría y ayuda infinita que ha criado todo un linaje de científicos moscólogos. Al Dr. Sergio Casas que nos mantiene a flote a todos los estudiantes y nos genera las dudas necesarias para que nunca dejemos de comernos el coco. A Teresa de los Reyes, futura doctora, y la mejor compañera y amiga de confianzas, con su sonrisa los días se acortan. A la Dra. Maria Losada, chica para todo, desde descubrir cómo volver a andar sin patas a tener un consultorio amoroso, otra compañera excepcional y persona única. Y a las Dras. Elena Santana y Patricia Jarabo, por la vida friki y su hueco en cualquier laboratorio.

A mis compañeros del Hospital Ramón y Cajal que me han ayudado con muchos experimentos y han puesto siempre de su parte. A la Dra. Maria José Casarejos por echarnos siempre un cable con los ratones, el espacio, y sus mejores indicaciones. A Sonia por ser tan eficiente sin perder los nervios ante la dificultad, a Luis por compartir parte del camino.

A mis maravillosos compañeros de universidad del Grado en Biología de la UAM, a Miguel Risco (otro incondicional que siempre me acompaña en todas las pantallas), a Carlos "Cape", a Sergio Calle, a Raúl, a las dos Saras, a Pepe, a Ana...pedazo de aventuras que hemos corrido todos juntos, y las que están por llegar.

A personas del pasado científico que han puesto su piedrecita en el camino, y dónde aprendí que las moscas pueden ser nuestras amigas y darnos un futuro: al Dr. Carlos Estella, el origen de todo, que me permitió irme a NYC a aprender más. Al Dr. Jose Félix de Célis que me dio buenos consejos. A la Dra. Mercedes Martin que me la llevé de amiga a través de los años y las distancias.

Y en el tercer capítulo reside la parte deportiva, esa parte que me alejó de todo lo malo y me llevó a generarme toda una familia no carnal pero igual o más de válida.

No sé ni qué decir de mis compañeras, hermanas y personas “superwoman” que son las piragüistas. Para ellas no existen las barreras y son los mejores ejemplos vitales que nunca he podido tener. Me siento tremendamente agradecida. La estirpe única Lombao: Bárbara, Elena y Julia. Las inquebrantables de Carmen y Gina que nunca te dejan caer. Para Alba esa fiera disfrazada de dulzura que me salva con sus charlas... y otras muchas más...

Y con esto me despido,

A ver qué me encuentro en la siguiente pantalla del camino.

Este trabajo ha sido terminado en Madrid, el 1 de Marzo de 2022.

Almudena Sáiz Madera