



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



**ESTUDIO DE LA DESREGULACIÓN DEL CALCIO EN UN MODELO DE
DROSOPHILA DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**
Study of Calcium dysregulation in a Drosophila Model of Huntington's disease

Autor/a:

D. Antonio Ferreiro Justo

Tutor/es:

D^a. María Teresa Alonso Alonso D^a. Beatriz Callejo Mateo

TÍTULO: Estudio de la desregulación del calcio en un modelo de *Drosophila* de la enfermedad de Huntington

AUTOR/A: Antonio Ferreiro Justo

TUTOR/ES: María Teresa Alonso Alonso, Beatriz Callejo Mateo

ÁREA: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

TRIBUNAL

PRESIDENTE: D. Víctor Tapias Molina

SECRETARIO: D. Jonathan Rojo Ruiz

VOCAL: D^a. María Teresa Alonso

SUPLENTE 1: D^a. Laura Senovilla González

SUPLENTE 2: D. Ángel L. Guerrero Peral

FECHA:

CALIFICACIÓN:

RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante que resulta de la expansión anómala de repeticiones CAG en el gen que codifica la proteína huntingtina (HTT). Esto conduce a la aparición progresiva de síntomas neurológicos como alteraciones motoras, deterioro cognitivo y cambios en el comportamiento. Entre los mecanismos moleculares propuestos para explicar la patogenia de la EH destaca la hipótesis de que la HTT mutante interfiere con la señalización intracelular de Ca^{+2} . El Ca^{2+} actúa como el principal segundo mensajero intracelular y variaciones en su concentración regulan numerosos procesos fisiológicos esenciales para la función y supervivencia celular. La alteración de la homeostasis del Ca^{2+} se ha relacionado no solo con la EH, sino también con la fisiopatología de otras enfermedades neurodegenerativas.

El objetivo de este estudio es investigar si la expresión de la proteína HTT humana con 128 repeticiones (causante de la EH) específicamente en tejido nervioso altera los niveles de Ca^{2+} en el RE y si esto se relaciona con la pérdida de función neuromuscular *in vivo* en un modelo de *Drosophila melanogaster*. Para ello, se generaron moscas transgénicas que expresan el sensor de Ca^{2+} de baja afinidad GAP3 dirigido al RE (erGAP3) y la proteína HTT humana con 128 repeticiones. Los ensayos realizados revelaron que la expresión de HTT128 en el tejido nervioso de las moscas no alteró significativamente ni su supervivencia ni su función motora. Los niveles de Ca^{+2} tampoco variaron significativamente con respecto a los controles.

Palabras clave

Enfermedad de Huntington, *Drosophila Melanogaster*, señalización de Ca^{+2} , retículo endoplasmático

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder that results from the abnormal expansion of CAG repeats in the gene encoding the huntingtin protein (HTT). This leads to the progressive appearance of neurological symptoms such as motor disturbances, cognitive decline, and behavioral changes. Among the molecular mechanisms proposed to explain the pathogenesis of HD, one hypothesis stands out: that mutant HTT interferes with intracellular Ca^{2+} signaling. Ca^{2+} acts as the main intracellular second messenger, and variations in its concentration regulate numerous physiological processes essential for cellular function and

survival. Disruption of Ca^{2+} homeostasis has been linked not only to HD but also to the pathophysiology of other neurodegenerative diseases.

The aim of this study is to investigate whether the expression of human HTT protein with 128 repeats (responsible for HD) specifically in nervous tissue alters $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ and whether this is related to neuromuscular dysfunction *in vivo* in a *Drosophila Melanogaster* model. For this purpose, transgenic flies were generated that express the low-affinity Ca^{2+} sensor GAP3 targeted to the ER (erGAP3), along with the human HTT protein containing 128 repeats. The assays performed revealed that the expression of HTT128 nervous system of the flies did not significantly alter their survival or motor function. Ca^{2+} levels also did not differ significantly compared to controls.

Keywords

Huntington's Disease, *Drosophila Melanogaster*, Ca^{2+} signaling, endoplasmic reticulum.

RESUMEN	3
Palabras clave.....	3
1.INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Epidemiología	7
1.2. Fisiopatología.....	7
1.3. Modelos para el estudio de la enfermedad de Huntington	8
1.3.1 Drosophila Melanogaster	9
1.4 Señalización de Ca^{2+} intracelular.....	10
1.4.1 Ca^{2+} como segundo mensajero	10
1.4.2 Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.....	10
1.4.3 Sistema de tamponamiento de la elevación del Ca^{2+} citosólico	11
1.4.4 Señalización de calcio mediada por el RE/RS.....	12
1.4.5 Desregulación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la EH.....	13
2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Generación de las líneas transgénicas de Drosophila	15
3.1.1 Ciclo de vida de Drosophila Melanogaster	15
3.1.2 Genética de <i>D. melanogaster</i>	16
3.1.3 Sistema UAS-Gal4	16
3.2 Diseño de cruces.....	17
3.2.1 Genotipos usados	17
3.3 Mantenimiento de las líneas transgénicas de <i>Drosophila</i>	18
3.4 Ensayo de longevidad	18
3.5 Ensayo de actividad locomotora.....	18
3.6 Medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$	19
3.6.1 La sonda de Ca^{2+} erGAP3	19
3.6.2 Protocolos de medida de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$	19
3.6.3 Calibración de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$	20
3.6.4 Análisis estadístico	21
4.RESULTADOS.....	21
4.1 Verificación genética de las líneas generadas	21
4.2 Alteración en la fluorescencia de erGAP3 por la expresión de mHTT128.....	22
4.3 La longevidad de las moscas de la línea HTT128 no difiere de las moscas control.....	22
4.4 Las moscas con HTT128 no muestran alteración significativa de la función muscular	24
5.DISCUSIÓN	28
6. CONCLUSIONES.....	31
7.BIBLIOGRAFÍA.....	32

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _c	Concentración del Ca ²⁺ citosólico
[Ca ²⁺] _i	Concentración del Ca ²⁺ intracelular
[Ca ²⁺] _{RE}	Concentración de Ca ²⁺ en el Retículo Endoplasmático
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺ (Calcium-Induced Calcium Release)
EH	Enfermedad de Huntington
Elav	Sistema visual anormal letal embrionario (Embryonic Lethal Abnormal Visual System)
GAL4	Gen 4 inducido por galactosa
GAP	Proteína GFP-Aequorina (GFP-Aequorin Protein)
GFP	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
GECIs	Indicadores de Ca ²⁺ codificados genéticamente (Genetically Encoded Ca ²⁺ Indicators)
HTT	Proteína Huntingtina
HTT128	Proteína Huntingtina mutante de 128 repeticiones de CAG
IP3R	Receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato (Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor)
MCU	Uniportador de Ca ²⁺ Mitocondrial (Mitochondrial Calcium Uniporter)
NMDA	Receptor N-Metil-D-Aspartato
PMCA	Bomba de Ca ²⁺ de la membrana plasmática (Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase)
RE	Retículo Endoplasmático
ROCCs	Canales de Ca ²⁺ operados por receptor (Receptor Operated Calcium Channels)
RyR	Receptor de Ryanodina
RS	Retículo Sarcoplásmico
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo (sarco)endoplásmico (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ - ATPase)
SMOCCs	Canales de Ca ²⁺ operados por segundos mensajeros (second messenger-operated Ca ²⁺ channels)
SOCCs	Canales de Ca ²⁺ operados por vaciamiento de depósito intracelular de Ca ²⁺ (Store-Operated Calcium Channels)
UAS	Secuencia de Regulación Upstream (Upstream Activation Sequence)
VOCCs	Canales de Ca ²⁺ Operados por Voltaje (Voltage Operated Calcium Channels)

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Epidemiología

La EH se trata de una patología neurodegenerativa con herencia autosómica dominante causada por una expansión anormal de repeticiones del triplete CAG en el gen que codifica para la proteína huntingtina, que resulta en el alargamiento del segmento de poliglutamina en el extremo N-terminal de dicha proteína. Comienza de manera habitual en la edad adulta y sus manifestaciones clínicas se caracterizan por síntomas motores, psiquiátricos y cognitivos que empeoran de manera continua e irreversible a lo largo de 15 a 20 años, terminando finalmente en la muerte **(1)**.

En relación con la epidemiología, la EH presenta una prevalencia de 10,6-13,7 individuos por cada 100.000 habitantes en poblaciones occidentales. En países orientales como Japón, Taiwán y Hong Kong la incidencia es considerablemente menor, siendo esta de 1 a 7 individuos por cada 100.000 habitantes. También se observan diferencias significativas de prevalencia entre etnias, siendo más baja en la población negra **(2)**.

1.2. Fisiopatología

La causa de la EH es una única mutación en el gen de la huntingtina (*htt*), el cual está ubicado en el cromosoma 4p16.3 y codifica para la proteína del mismo nombre. La HTT se expresa de forma ubicua y ejerce funciones relacionadas con el tráfico vesicular, transcripción genética y proteostasis. La alteración consiste en el número anormalmente alto de repeticiones del trinucleótido CAG en la región codificante de la poliglutamina en el exón 1 de la HTT. Esta región es polimórfica en longitud, con un rango normal de menos de 26 repeticiones, mientras que la herencia de 40 o más unidades CAG conlleva una penetrancia casi completa para la aparición de EH. La expansión de tripletes se comporta de manera dominante, de forma que la edad de aparición y la progresión de la enfermedad no difiere significativamente entre homocigotos y heterocigotos **(3)**. La longitud del segmento CAG explica aproximadamente el 60% de la variabilidad en la edad de aparición de los síntomas, siendo el resto atribuible a otros modificadores genéticos y factores ambientales **(4)**.

La mutación favorece la agregación y le confiere a la proteína una ganancia de función tóxica que resulta en muerte neuronal especialmente de neuronas del estriado cerebral **(3,4)**. No existe todavía una explicación clara del mecanismo patogénico, aunque hay diversas hipótesis al respecto que señalan que la acumulación prolongada de HTT mutante (HTT128) supera la capacidad de degradación celular, generando agregados tóxicos que secuestran proteínas

implicadas en funciones como la transcripción, la apoptosis, la función mitocondrial y el transporte axonal, causando la disfunción de estos procesos **(Figura 1) (4)**.

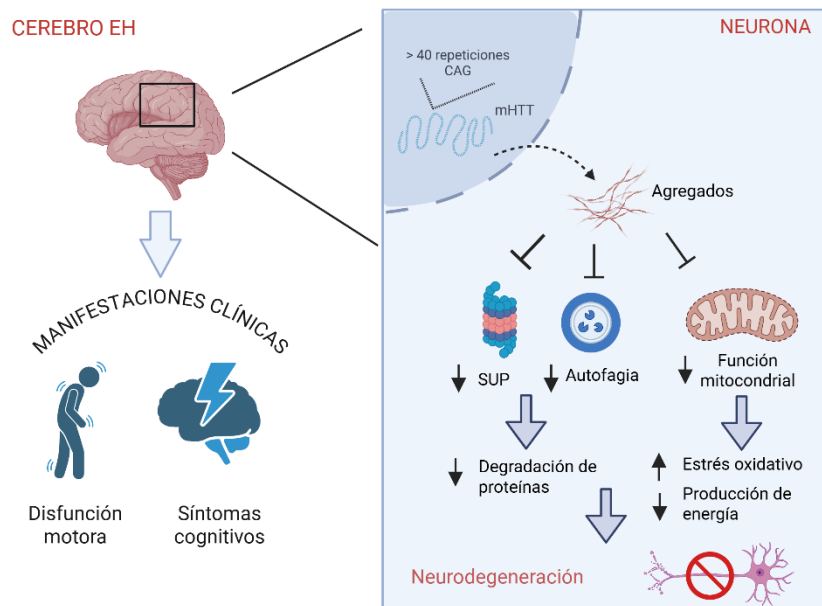


Figura 1. Manifestaciones clínicas y mecanismo patológico de la EH. Figura adaptada de (5) Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen síntomas motores, psiquiátricos y cognitivos. La alteración motora más característica es la corea, acompañada de disfagia, disartria, hipocinesia y rigidez. A nivel psiquiátrico, son comunes la depresión, apatía, irritabilidad y psicosis. El deterioro cognitivo está presente desde fases tempranas y afecta a funciones ejecutivas, memoria y organización mental. En las formas juveniles predominan los síntomas hipocinéticos, los problemas de conducta y las crisis epilépticas, con ausencia inicial de corea (6). Actualmente no existe cura que ralentice o detenga la EH. El enfoque terapéutico está dirigido principalmente al manejo de los síntomas mediante el uso de fármacos y terapias no farmacológicas como las terapias físicas o del habla, adaptándose siempre a cada paciente dada la heterogeneidad de los síntomas que pueden presentar (7).

1.3. Modelos para el estudio de la enfermedad de Huntington

Hay diversos modelos experimentales para el estudio de la enfermedad de Huntington. La mayoría de los modelos animales de EH se dividen en genéticos y no genéticos. Los modelos no genéticos inducen muerte celular mediante mecanismos excitotóxicos o disrupción de la actividad mitocondrial. El ácido quinolínico y el ácido kaínico son los principales modelos excitotóxicos empleados y el ácido 3-Nitropropiónico es la principal toxina mitocondrial **(Figura 2)**. Una de las principales limitaciones de estos modelos es que no reproducen la causa genética de la EH; no

reflejan la producción, el plegamiento ni la agregación progresiva de la proteína huntingtina mutada (8).

Los modelos genéticos son los más precisos para el estudio preclínico porque reproducen fielmente la alteración genética que causa la enfermedad en humanos. Dentro de estos modelos el animal más utilizado es el del ratón. Según la manera de inducir la enfermedad, se distinguen modelos transgénicos y modelos knock-in. Las primeras líneas de ratones transgénicos desarrolladas fueron R6/1 y R6/2 que expresan el exón 1 del gen HTT con entre 115 y 157 repeticiones del triplete CAG, respectivamente. El modelo R6/2 es el que más rápido desarrolla los síntomas de la enfermedad y el que más alteraciones neuropatológicas presenta. Otros modelos transgénicos empleados son los de cromosoma artificial de levadura(YAC) y el de cromosoma artificial de bacteria(BAC), que se emplean para expresar en los ratones el gen humano completo de HTT128 (8,9). Por otro lado, los modelos knock-in son los que representan más fielmente la situación fisiológica, ya que mantienen los patrones de expresión espacial y temporal de la huntingtina normal, pero con la mutación. Los modelos más conocidos son CAG140, HdhQ92, HdhQ111 y zQ175(10). Además del modelo murino, también se utilizan otros organismos que ofrecen ventajas específicas para estudiar diferentes patologías de esta enfermedad, uno de ellos es la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) que se trata de un modelo de bajo costo que ofrece facilidad y rapidez de manipulación genética (11).

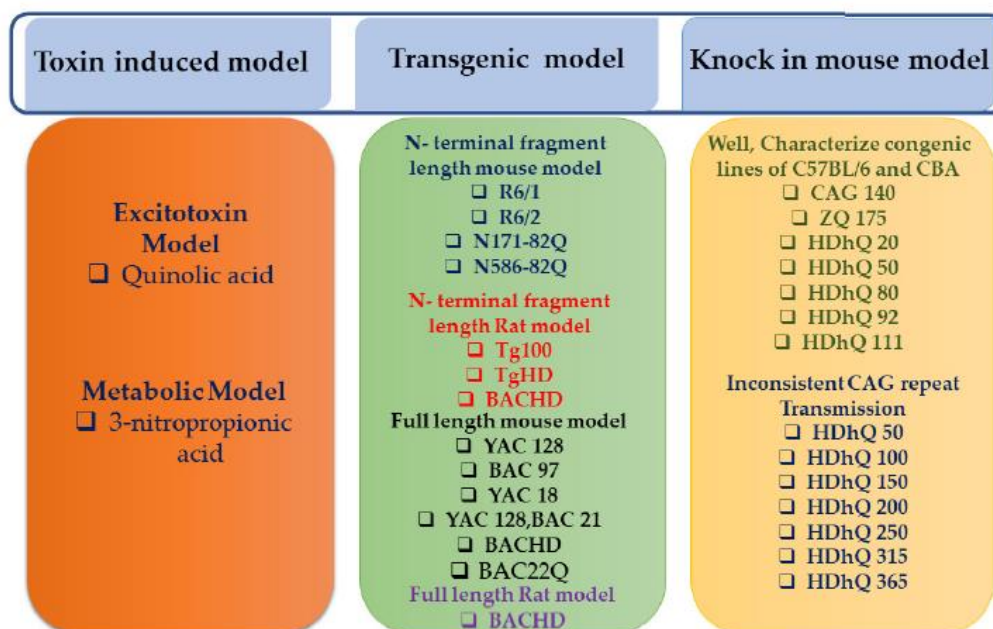


Figura 2. Clasificación de los modelos de estudio para la EH. Tomada de (9).

1.3.1 *Drosophila Melanogaster*

Drosophila Melanogaster se ha consolidado como un modelo clave para el estudio de la EH. Aproximadamente el 75% de los genes humanos asociados a enfermedades tienen homólogos en la mosca, lo que permite analizar mecanismos patológicos relevantes en un sistema sencillo y altamente manipulable (12).

Algunas de las ventajas del uso de *Drosophila* como modelo de estudio son el bajo costo de mantenimiento, su ciclo de vida corto en comparación con otros modelos tradicionales, así como la posibilidad de dirigir la expresión de proteínas humanas mutantes a tejidos específicos mediante el sistema UAS/GAL4 ((Secuencia de regulación Upstream (*Upstream Activation Sequence*) / Gen 4 inducido por Galactosa)). El uso del promotor neuronal *elav* (*Embryonic Lethal Abnormal Visual System*) posibilita que la expresión de la proteína mutada se restrinja al sistema nervioso, lo que replica la vulnerabilidad neuronal observada en pacientes y permite analizar de manera específica los efectos de la HTT128 en neuronas (13,14). Los modelos de EH en *Drosophila* han sido ampliamente utilizados para evaluar la progresión de los síntomas motores y la supervivencia, así como para investigar alteraciones celulares como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y las anomalías en la autofagia, todos ellos procesos implicados en la fisiopatología de la EH (15).

1.4 Señalización de Ca^{2+} intracelular

1.4.1 Ca^{2+} como segundo mensajero

El calcio (Ca^{2+}) es uno de los segundos mensajeros intracelulares más versátiles y universales. La señalización de Ca^{2+} se basa en cambios rápidos y transitorios en la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), que actúan como señales para activar diferentes vías de respuesta celular (16). En condiciones normales, la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol es muy baja (~ 100 nM), mientras que en compartimentos como el retículo endoplásmico (RE) o el espacio extracelular, los niveles son considerablemente mayores (1-2 mM). Esta diferencia de gradiente permite que, ante la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática o en orgánulos internos, se produzcan aumentos rápidos y localizados de Ca^{2+} citosólico. Dichos incrementos son detectados por proteínas sensores especializadas, como la calmodulina, que a su vez regulan la actividad de numerosas enzimas y factores de transcripción (16,17).

1.4.2 Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular

Existen varios tipos de canales que median la entrada de Ca^{2+} desde el exterior. Los canales de

calcio operados por voltaje (*Voltage Operated Calcium Channel*; VOCCs) se activan en respuesta a cambios en el potencial de membrana, permitiendo la entrada masiva de Ca^{2+} durante la despolarización. Por otro lado, los canales de calcio operados por receptores (*Receptor-Operated Calcium Channels*; ROCCs) se activan tras la unión de ligandos a receptores de membrana, como ocurre con los receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) en neuronas, que permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta al glutamato (16). Además, la entrada de calcio también puede producirse a través de los canales activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (*Store-Operated Calcium Channels*; SOCCs). Estos canales, como Orai1, se activan cuando las reservas de Ca^{2+} en el RE disminuyen, permitiendo la recarga de estos compartimentos y manteniendo la señalización prolongada (18). Finalmente existen otros dos tipos de canales, los operados por segundos mensajeros (*Second Messenger-operated Calcium Channels*; SOCCs) que se activan indirectamente por la acción de segundos mensajeros intracelulares como el inositol trifosfato (IP_3) o el diacilglicerol (DAG) y los canales de potencial transitorio (*Classical Transient Receptor Potential*; TRPCs) (16).

1.4.3 Sistema de tamponamiento de la elevación del Ca^{2+} citosólico

Mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dentro de los límites fisiológicos es esencial para que las células funcionen correctamente y permanezcan viables. Como el Ca^{2+} participa como un segundo mensajero en muchos procesos celulares, cualquier incremento temporal tras una señal debe ser regulado con rapidez para prevenir efectos perjudiciales y alteraciones en la actividad celular (19).

Las células cuentan con distintos sistemas para regular y estabilizar los niveles de calcio citosólico después de una señal. Uno de los más importantes incluye ciertas proteínas del citoplasma que se unen al calcio, como la calmodulina, la parvalbúmina y la calbindina. Estas proteínas capturan el calcio libre y controlan su disponibilidad para diversas vías de señalización. De esta manera, funcionan tanto como sensores como reguladores dinámicos, ayudando a mantener la precisión en el espacio y el tiempo de las señales mediadas por Ca^{2+} (20).

Además de la acción de las proteínas que amortiguan el calcio, el exceso de Ca^{2+} en el citosol se elimina rápidamente mediante mecanismos de transporte activo que lo movilizan hacia compartimentos intracelulares o al exterior de la célula. En este proceso intervienen principalmente dos sistemas: por un lado, las bombas Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (*Plasma Membrane Calcium ATPase*; PMCA), que utilizan energía del ATP para expulsar calcio fuera de la célula y son esenciales para restablecer los niveles basales tras aumentos transitorios asociados a señales celulares; por otro, los intercambiadores sodio/calcio (*sodium-calcium exchanger*; NCX), que extraen Ca^{2+} a cambio de Na^+ , desempeñando un papel especialmente

relevante en células excitables como las neuronas al contribuir de manera rápida a la reducción de la concentración citosólica de calcio (19,21).

Dentro de la célula, tanto el RE como las mitocondrias cumplen un papel clave como depósitos transitorios de calcio. El RE lo reincorpora mediante la acción de la bomba SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*), mientras que las mitocondrias captan Ca²⁺ a través del uniportador mitocondrial (MCU). Ambos mecanismos contribuyen al ajuste preciso de la señal de calcio y ayudan a evitar acumulaciones que podrían resultar tóxicas para la célula (22).

1.4.4 Señalización de calcio mediada por el RE/RS

El RE y su equivalente especializado en células musculares, el retículo sarcoplásmico (RS), funcionan como los principales depósitos intracelulares de Ca²⁺ y tienen un papel clave en la regulación de su señalización. Ambos orgánulos almacenan elevadas concentraciones de Ca²⁺, que liberan al citosol cuando reciben estímulos específicos. Esta liberación da lugar a picos u ondas de calcio que actúan como señales esenciales en numerosos procesos celulares (22).

La liberación de Ca²⁺ desde el RE/RS al citosol se produce principalmente a través de dos tipos de canales: los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R) y los receptores de rianodina (RyR). Los IP₃R se activan tras la unión de IP₃, un segundo mensajero generado por la estimulación de receptores acoplados a proteínas G, mientras que los RyR responden tanto a señales eléctricas como a incrementos locales de Ca²⁺, en un mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio (*Calcium Induce Calcium Release*; CICR). En mamíferos, existen tres subtipos principales de IP₃R: IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3, cada uno codificado por un gen distinto y caracterizado por una distribución específica en los tejidos. El subtipo IP₃R1 se expresa en alta cantidad en el sistema nervioso central, especialmente en regiones como el cerebelo y el hipocampo. Por su parte, el IP₃R2 es más abundante en tejidos no neuronales, como el corazón y el hígado, mientras que el IP₃R3 presenta una distribución más amplia y se localiza en órganos como el páncreas y el sistema inmunitario (22,23).

Existen tres subtipos de RyR identificados en mamíferos: RyR1 se encuentra mayoritariamente en el músculo esquelético, RyR2 es el subtipo predominante en el músculo cardíaco y también se expresa en el cerebro, participando en la regulación de la actividad neuronal y en último lugar RyR3 presenta una expresión más dispersa y en menor cantidad, pero contribuye a afinar la señalización de calcio en distintos tipos celulares (22).

La recaptación de Ca^{2+} al interior del RE/RS es llevada a cabo por la bomba SERCA, que utiliza energía de ATP para transportar Ca^{2+} desde el citosol de vuelta al interior del orgánulo, restableciendo así los niveles de reserva y permitiendo la repetición de los ciclos de señalización. Existen tres isoformas, la isoforma SERCA1 se expresa sobre todo en fibras de contracción rápida del músculo esquelético; SERCA2 cuenta con dos variantes principales: SERCA2a, que se localiza principalmente en el músculo cardíaco y en fibras lentas del músculo esquelético, y SERCA2b, que se encuentra en la mayoría de los tejidos no musculares. Por otro lado, SERCA3 se expresa en tejidos como el endotelio y en células del sistema inmunitario. El modelo de *Drosophila Melanogaster* empleado en este estudio presenta una única isoforma génica principal, codificada por el gen Ca-P60A, funcionalmente equivalente a la SERCA2 de mamíferos.(22,24).

1.4.5 Desregulación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la EH

La alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular es un fenómeno central en la fisiopatología de la EH. El principal desencadenante de este desequilibrio es la proteína HTT patológica, que interfiere en múltiples niveles del control del Ca^{2+} . Por un lado, HTT patológica interactúa de forma anómala con proteínas que se unen al Ca^{2+} , como la calmodulina, alterando su función y favoreciendo un aumento sostenido de Ca^{2+} citosólico. Esta acumulación puede activar enzimas como la calpaína, una proteasa dependiente de calcio que degrada componentes estructurales y funcionales de la célula (25).

La HTT mutada afecta la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol, especialmente mediante su interacción directa con los $\text{InsP}_3\text{R1}$, lo que incrementa su sensibilidad al estímulo y provoca un vaciamiento excesivo del RE. Este desequilibrio activa los mecanismos de entrada de calcio desde el exterior celular (*Store-Operated Calcium Entry*; SOCE), generando una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular que puede comprometer la función mitocondrial y desencadenar muerte celular (25,26). Se propone que el exceso de calcio liberado hacia el citosol se acumula preferentemente en las mitocondrias, lo que sumado a un efecto directo de la HTT patológica sobre la permeabilidad iónica de la membrana mitocondrial resultaría en una alteración de la señalización mitocondrial de Ca^{2+} lo que provocaría en última instancia la activación de caspasas y calpaína, la apoptosis y la degeneración de las neuronas espinosas medias (**Figura 3**) (27).

Se ha visto también cómo la HTT patológica provoca una activación excesiva de los receptores NMDA debido al efecto potenciador de esta proteína mutada sobre el transporte e incorporación de los receptores NMDA en la membrana plasmática. Las diferencias en el nivel de expresión y composición de subunidades de los receptores NMDA en diferentes tipos celulares podría ser lo que explique la muerte selectiva de las neuronas espinosas medias en la EH. La inhibición

farmacológica de los NMDAR ha demostrado tener un efecto neuroprotector en cultivos primarios de neuronas espinosas medias obtenidas de modelos murinos de EH (25).

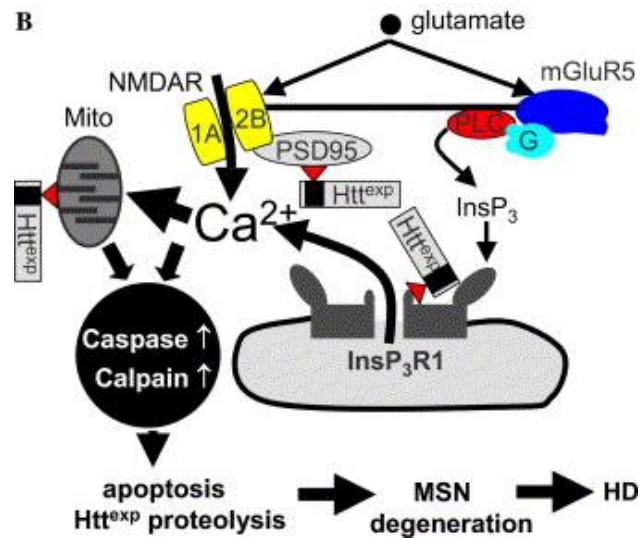


Figura 3. Desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} en EH. El esquema representa la señalización de Ca^{2+} en las neuronas espinosas medias con expresión de HTT patogénica. En este contexto, la HTT patogénica altera la homeostasis del Ca^{2+} mediante tres mecanismos que actúan de forma sinérgica. En primer lugar, potencia la actividad de los receptores NMDA, posiblemente al interferir con su regulación normal por parte del complejo PSD95. Segundo, HTT patogénica se une al extremo carboxilo terminal de $\text{InsP}_3\text{R1}$, aumentando considerablemente su sensibilidad y provocando una liberación excesiva de del Ca^{2+} incluso con pequeñas cantidades de glutamato. Por último, HTT patogénica podría alterar directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial, activando enzimas como caspasas y calpaínas, conduciendo a la apoptosis de las neuronas espinosas medias. Figura tomada de (27).

La desregulación transcripcional se ha descrito en prácticamente todos los modelos de EH, lo que sugiere un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. El mecanismo favorito parece ser la unión directa: los fragmentos de HTT patogénica actuarían secuestrando reguladores negativos y positivos de la transcripción como la proteína de unión a CREB (CBP). CBP regula al coactivador-1a (PGC1 α) que participa en la biogénesis mitocondrial, por lo que una alteración en su expresión podría contribuir a la producción de los defectos mitocondriales (26).

2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

La expresión en *Drosophila* de la proteína HTT patogénica causante de la EH exclusivamente en sistema nervioso podría alterar los niveles de Ca^{2+} del RE y esto impactaría en una pérdida de la función neuromuscular.

Objetivos específicos:

- Generación y caracterización de líneas transgénicas que expresen tanto la proteína HTT

con 128 repeticiones de CAG como un indicador de Ca^{2+} ratiométrico de baja afinidad, GAP3, dirigido al RE de tejido nervioso.

- Realizar la curva de supervivencia de las nuevas líneas transgénicas creadas.
- Monitorizar la función muscular de las diferentes líneas transgénicas.
- Determinar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ *in vivo* en las diferentes líneas transgénicas generadas a lo largo de la vida de la mosca.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Generación de las líneas transgénicas de *Drosophila*

3.1.1 Ciclo de vida de *Drosophila Melanogaster*

D. melanogaster se ha consolidado como un organismo fundamental para el estudio patologías en gran parte gracias a su rápido ciclo de vida (**Figura 4**). La temperatura influye en gran medida en la velocidad de este ciclo. Los huevos de las hembras adultas eclosionan aproximadamente a las 24 horas, dando lugar a larvas de estadio 1 (L1). A continuación, las larvas pasan por tres estadios larvarios (L1, L2 y L3), los dos primeros duran de media 1 día cada uno mientras que el tercero requiere, en general, 2 días. Al finalizar el tercer estadio, las larvas inician la fase de pupa que tiene una duración de entre 4 y 5 días y en ella ocurre la metamorfosis y se desarrollan los órganos y estructuras del adulto. Las moscas adultas emergen de la funda pupal en un proceso denominado eclosión y alcanzan la madurez sexual en unas 8-12 horas (14,28).

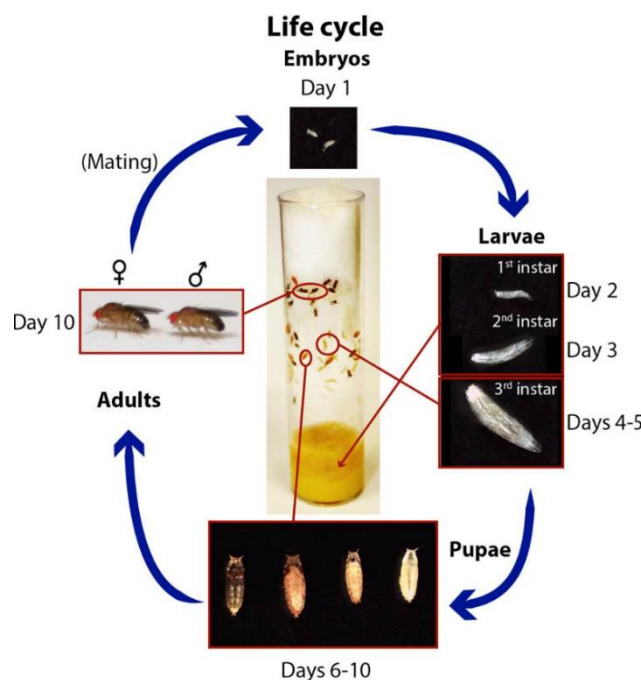


Figura 4. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. Figura tomada de (28).

3.1.2 Genética de *D. melanogaster*

Drosophila se ha convertido en un organismo modelo para el estudio genético de enfermedades neurodegenerativas gracias a una serie de ventajas que ofrece como la alta conservación de rutas genéticas con humanos y la presencia de pocos genes duplicados en su genoma, lo que permite el análisis genético sin una redundancia funcional considerable (11).

Una de las herramientas fundamentales en la genética de *Drosophila* es el sistema GAL4/UAS derivado de la levadura, que permite controlar con precisión la expresión de genes en tejidos y etapas concretas del desarrollo. Consiste en el cruce de una línea que expresa el factor de transcripción GAL4 bajo el control de un promotor específico de tejido y una línea que expresa el gen de interés bajo el control de las secuencias UAS. En la descendencia, Gal4 se une a UAS y activa o silencia el gen de interés únicamente en el tejido deseado (13,28).

Para el reconocimiento de las moscas resultantes de los cruces que tengan las características deseadas, se usan cromosomas balanceadores, que son versiones modificadas de los cromosomas que contienen inversiones genéticas que impiden recombinaciones durante la meiosis y que tienen marcadores visibles (como *tubby* o *cyo*) que permiten seleccionar la descendencia que heredó una u otra versión de un cromosoma. Los cromosomas balanceadores tienen también una tercera característica que es la presencia de mutaciones letales recesivas para evitar la selección de la mutación de interés en poblaciones consanguíneas (28).

3.1.3 Sistema UAS-Gal4

Para obtener las moscas transgénicas, se microinyectó el vector pUASTattB-erGAP3 en embriones de *D. melanogaster* de la cepa "y1 M{vas-int.Dm}ZH-2A w; M{3xP3-RFP.attP}ZH86Fb"* (BL24749; BestGene® Inc.). Esta cepa posee en su tercer cromosoma un locus 86F, que incluye una secuencia attP para facilitar la integración y un promotor 3xP3 seguido de un marcador RFP (Proteína Fluorescente Roja), rodeado por secuencias loxP de recombinación. Junto con el vector, se inyectó ARNm de la integrasa ΦC31, necesario para insertar el casete de expresión UAS-erGAP3-SV40 en el genoma. Después de lograr la integración, se microinyectó ARNm de la recombinasa Cre con el fin de eliminar el marcador RFP (29).

Para expresar erGAP3 en el tejido nervioso, empleamos el sistema UAS-GAL4. Las moscas UAS-erGAP3, generadas mediante el procedimiento explicado previamente, se cruzaron con moscas que expresaban el factor de transcripción GAL4 bajo el promotor elav (**Figura 5**) (30).

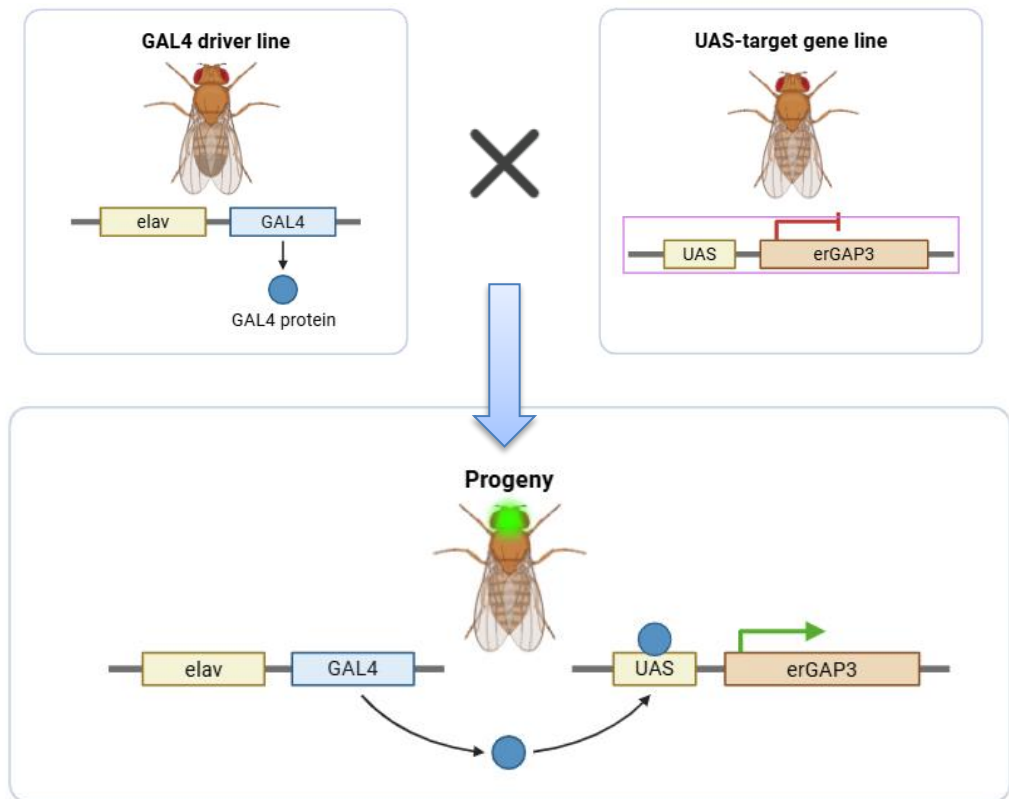


Figura 5. Generación de las líneas transgénicas que expresan erGAP3 en sistema nervioso (DNE005). Figura modificada de (30).

3.2 Diseño de cruces

3.2.1 Genotipos usados

Se utilizaron dos líneas transgénicas de *Drosophila* para la realización de los experimentos (**Tabla 1**). Una línea expresa la proteína HTT con 128 repeticiones y el sensor de Ca^{2+} dirigido al RE bajo el promotor *elav* para sistema nervioso (E35). La otra línea se usará como control y expresa solamente el sensor erGAP3 en sistema nervioso bajo el promotor *elav* (DNE005).

Tabla 1. Líneas transgénicas utilizadas en este trabajo

Línea	Genotipo	Tejido
E35	elav-Gal4; +; UAS:HTT128, UAS:erGAP3	Nervioso
DNE005	elav-Gal4; +; UAS:erGAP3	Nervioso

3.2.1.1 Modelo en sistema nervioso

Se cruzaron las líneas DNE005 (elav-erGAP) y BL33808 ($w[1118]; P\{w[+mC]=UAS-HTT.128Q.FL\}f27b$) para obtener finalmente una línea que expresase HTT128 y erGAP3 en el

sistema nervioso de las moscas. Se realizaron los siguientes cruces:

$$\begin{array}{c}
 \text{♀ } \frac{W}{W}; \frac{+}{+}; \frac{UAS:HTT128}{UAS:HTT128} \times \text{♂ } \frac{elav-Gal4}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{UAS:erGAP}{UAS:erGAP} \\
 \downarrow \\
 \text{♀ } \frac{W}{elav-Gal4}; \frac{+}{+}; \frac{UAS:HTT128}{UAS:erGAP} \times \text{♂ } \frac{W}{Y}; \frac{+}{+}; \frac{MKRS}{TB6B} \\
 \downarrow \\
 \frac{W}{elav-Gal4}; \frac{+}{+}; \frac{UAS:HTT128, UAS:erGAP}{UAS:HTT128, UAS:erGAP}
 \end{array}$$

3.3 Mantenimiento de las líneas transgénicas de *Drosophila*

Las cepas de *Drosophila* se mantuvieron en un medio de cultivo comercial estándar (Bloomington Formulation; Nutri-Fly Genesee Scientific, 66-112) suplementado con un 0,48 % de ácido propiónico (Sigma Aldrich, 81910) y un 0,2 % de agar tipo I (iNtron Biotechnology, 25999). Las moscas se mantuvieron en un incubador (Ibercex, M-17004) a 18 °C, con un 60 % de humedad y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. El medio se reemplazó cada tres semanas.

3.4 Ensayo de longevidad

Las líneas empleadas para el estudio de longevidad se conservaron en un incubador 29°C con una humedad del 60% y bajo ciclos constantes de 12h de luz/oscuridad. Las moscas que emergieron el mismo día fueron recogidas y separadas por sexo. Cada dos o tres días se trasladaban a viales nuevos con alimento fresco. En cada recambio, se registraban las moscas muertas tanto en el vial antiguo como aquellas que fallecían durante la transferencia. Las que escapaban o morían por accidente se excluían del experimento y se ajustaba el total de animales en consecuencia. El seguimiento continuó hasta que no quedara ningún ejemplar vivo. Los resultados se expresaron como porcentajes de supervivencia correspondientes a cada día (29,31).

3.5 Ensayo de actividad locomotora

El ensayo de escalada es una técnica ampliamente utilizada que aprovecha la tendencia natural de las moscas *Drosophila* a desplazarse hacia arriba (geotaxis negativa), y sirve para evaluar su capacidad motora a diferentes edades. En este experimento se midió la capacidad de las moscas para escalar 5 cm en un máximo de 18 segundos. Las mediciones tuvieron lugar a los días 1, 7, 14 y 21 y se realizaron siempre a las 10 de la mañana para evitar posibles sesgos debidos a los ritmos circadianos. El día del experimento se transferían un mínimo de diez moscas de cada una de las líneas a viales sin comida, marcados con una línea a 5 cm de altura. Tras esperar unos

minutos para permitir que las moscas se adaptasen al nuevo entorno, se dieron tres golpes fuertes a los viales y se registró cuántas lograban alcanzar la marca de 5 cm en 18 segundos y también el tiempo que necesitaban la mitad de las moscas de cada vial para llegar a esa altura. Se dejaba descansar a las moscas durante 10 minutos antes de iniciar la siguiente ronda. Se realizaron un total de tres rondas por cada grupo de moscas (29).

3.6 Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$

3.6.1 La sonda de Ca^{2+} erGAP3

Los GECIs (Genetically Encoded Calcium Indicators) son indicadores genéticamente codificados que permiten medir la concentración de Ca^{2+} dentro de las células vivas. Se pueden dirigir a tejidos u orgánulos específicos gracias a la manipulación genética. Existen tres tipos principales de GECIs: los bioluminiscentes basados en la proteína aequorina, los fluorescentes basados en la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*; GFP) y los basados en FRET, que emplean dos proteínas fluorescentes entre las que la cambia la transferencia de energía al unirse Ca^{2+} . (29,32).

La familia GAP (GFP-Aequorin Protein) representa una generación innovadora de indicadores GECIs, diseñados para la monitorización precisa de la concentración de calcio en compartimentos intracelulares, especialmente en el RE y el aparato de Golgi. Los sensores GAP combinan dos proteínas de la medusa *Aequorea victoria*: una variante de la GFP y la apoaequorina, una proteína sensible al Ca^{2+} . Esta fusión permite que los sensores GAP funcionen en modo fluorescente y bioluminiscente (cuando se reconstituye la apoaequorina con su cofactor coelenterazina)(29,33).

Para la realización de este trabajo la variante empleada fue GAP3, que contiene dos mutaciones (D24N y D119A) que reducen la afinidad de GAP por el Ca^{2+} (GAP3, $K_D = 489 \mu M$). El sensor se dirige específicamente al RE gracias a la unión de la secuencia de calreticulina (CR) y la señal de retención en el RE KDEL en los extremos N-terminal y C-terminal, respectivamente. La proteína GAP3 conserva los dos picos de excitación del espectro de GFP silvestre (405 y 470nm), aunque su fluorescencia depende de la concentración de Ca^{2+} . Cuando no hay Ca^{2+} , la excitación es más intensa a 405 nm y más débil a 470 nm. En cambio, al unirse el Ca^{2+} , se incrementa la fluorescencia al excitar a 470 nm, mientras que la señal a 405 nm se reduce (29).

3.6.2 Protocolos de medida de $[Ca^{2+}]_{RE}$

Las moscas fueron anestesiadas con CO_2 y situadas dorsalmente sobre una gota de agar (de bajo punto de fusión) al 2 % (Sigma-Aldrich, A6560), preparado con agua miliQ. Luego se trasladaron

con cuidado a la platina de un microscopio estereoscópico Leica M205FA, equipado con un objetivo Plan Apo 1.0X (NA = 0,30), una lámpara de mercurio de 100 W, filtros de excitación a 470/40 o 403/40 nm, y un filtro de emisión de 525/50 nm.

Se tomaron 5 imágenes de fluorescencia cada 5 segundos, alternando la excitación entre 403 y 470 nm. Las imágenes se registraron en formato de 16 bits, con un agrupamiento (binning) de 4x4, un zoom de 6,5X y un tiempo de exposición de entre 100 y 400 ms para ambas longitudes de onda. Para obtener la señal mínima de fluorescencia, las moscas se calentaron durante 10 minutos en un baño a 50 °C y, posteriormente, se repitió la adquisición de imágenes con los mismos parámetros (29).

3.6.3 Calibración de la $[Ca^{2+}]_{RE}$

Primero, se generó una imagen de proyección de intensidad media de fluorescencia a partir de la secuencia de cinco capturas, utilizando la función Z Project del software ImageJ. Luego, se aplicó un umbral para separar los píxeles de la imagen en dos categorías: primer plano (señal útil) y fondo. Finalmente, se calculó el cociente de fluorescencia, dividiendo, píxel a píxel, la intensidad registrada a 470 nm entre la obtenida a 403 nm (470/403). Para convertir estos valores de fluorescencia en concentraciones de Ca^{2+} , se aplicó la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En esta fórmula, “Y” representa la fluorescencia normalizada, con valores comprendidos entre 0 y 1. “R” es el cociente de fluorescencias (470/403) medido en un momento concreto del experimento, “Rmin” corresponde al valor del cociente en ausencia de Ca^{2+} , y “Rmax” representa el cociente bajo condiciones de saturación de Ca^{2+} , estimado teóricamente multiplicando Rmin por el rango dinámico del sensor (que en este caso es 3). Una vez obtenido el valor de “Y”, la $[Ca^{2+}]$ se determina aplicando la ecuación de Hill:

$$Y = \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]^n}{K_d^n + [Ca^{2+}]^n} \quad (\text{Ecuación 2})$$

A partir de ambas ecuaciones y asumiendo que Vmax es igual a 1, se obtiene que la $[Ca^{2+}]$ es igual a:

$$[Ca^{2+}] = \frac{K_d}{\left(\frac{R_{max} - R}{R - R_{min}}\right)^{1/n}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Mediante experimentos previos realizados tanto in vitro como in situ en el laboratorio(34), se determinó que el coeficiente de Hill (n) para la unión de GAP3 al Ca^{2+} es igual a 1. Al aplicar este valor en la ecuación anterior, se obtiene una expresión comparable a la utilizada en la calibración

del indicador Fura-2.

$$[Ca^{2+}] = \frac{K_d \cdot (R - R_{min})}{R_{max} - R} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Suponiendo que el sensor GAP3 tiene un rango dinámico (R_{max}/R_{min}) de 3 y una constante de disociación (K_d) de 489 μM (41), es posible realizar una calibración aproximada de las señales de Ca^{2+} utilizando los valores de R/R_{min} mediante la siguiente ecuación:

$$R/R_{min} = 1 + (DR - 1) \cdot ([Ca^{2+}] / (K_d + [Ca^{2+}])) \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde “ $DR = 3$ ” es el rango dinámico para la GAP3 y los valores de R/R_{min} deberían situarse entre 1 para $[Ca^{2+}] = 0$ y 3 para $[Ca^{2+}]$ saturantes ($>10 \text{ mM}$)

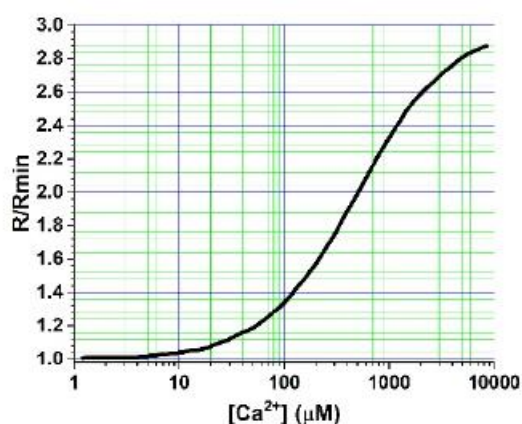


Figura 6: Curva de calibración de la GAP3. La proteína GAP3 aislada de *E. coli* se valió para Ca^{2+} . La curva se dibujó utilizando los siguientes parámetros: rango dinámico (RD) = 3; constante de disociación Ca^{2+} -GAP3 (KD) = 489 μM ; número de Hill (n) = 1. En el eje izquierdo, R/R_{min} que oscila entre 1,0 en $[Ca^{2+}] = 0$ y 3,0 en $[Ca^{2+}] = \text{infinito}$. En la abscisa, $[Ca^{2+}]$ en escala logarítmica. La línea negra corresponde a la siguiente ecuación: $R/R_{min} = 1 + (DR - 1) \cdot ([Ca^{2+}] / (KD + [Ca^{2+}]))$ (Ecuación 5). Tomado de (29,34).

3.6.4 Análisis estadístico

Los datos fueron representados, analizados e interpretados utilizando el software GraphPad Prism 10. Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Para determinar la significación estadística, se aplicó la prueba t de Student o ANOVA bidireccional. En los gráficos únicamente se muestra el análisis estadístico cuando las diferencias observadas resultaron significativas.

4.RESULTADOS

4.1 Verificación genética de las líneas generadas

Se verificó que el sensor erGAP3 se expresaba en la mosca y que dicha expresión era específica

del sistema nervioso. Dado que el sensor erGAP3 está basado en la GFP y, por lo tanto, emite fluorescencia verde, se comprobó si el tejido nervioso de las líneas E35 y DNE005 presentaban dicha fluorescencia. Se situaron las moscas adulto en una lupa de fluorescencia y se comprobó la expresión de erGAP3 como fluorescencia verde de GFP. En **las figuras 8A y 8B** se puede observar cómo la fluorescencia de la GFP se localiza de manera específica en el tejido nervioso de la mosca. La funcionalidad del sensor ha sido comprobada por nuestro laboratorio en estudios previos(29).

4.2 Alteración en la fluorescencia de erGAP3 por la expresión de mHTT128

Para averiguar si la expresión de HTT128 provoca una alteración en la expresión del sensor erGAP3, se tomaron imágenes de fluorescencia de moscas adultas de un día de edad en el microscopio estereoscópico con un zoom de 6.5x y a una longitud de onda de 470nm. Se utilizó el software ImageJ para analizar estas imágenes y las medidas se realizaron en un ROI situado en la cabeza de la mosca. Como se observa en la **Figura 8C**, la expresión del sensor erGAP3 es buena en ambas líneas transgénicas, aunque se ve una ligera disminución de la fluorescencia en las moscas de la línea HTT128 ($945.5 \pm 20.61 \text{ u.a.}$) frente a las moscas control ($982.5 \pm 27.38 \text{ u.a.}$); esta diferencia no fue significativa.

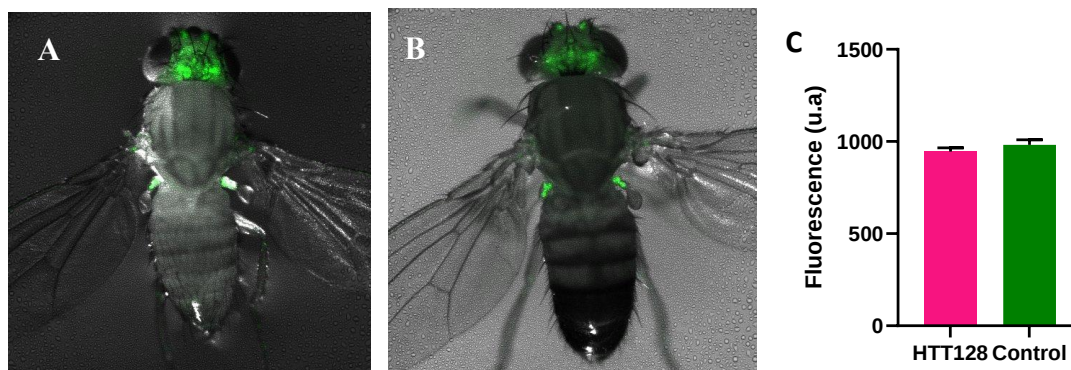


Figura 8. Expresión específica del sensor erGAP3 en moscas transgénicas DNE005 y E35. **A)** Vista dorsal de una mosca adulta de la línea E35. **B)** Vista dorsal de una mosca adulta de la línea DNE005. En todas las preparaciones se observa una buena expresión del sensor erGAP3 específicamente en el tejido nervioso. **C)** Histograma representando la intensidad media de fluorescencia en adultos de *Drosophila* de las líneas E35 y DNE005. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM de 22 medidas independientes realizadas en adultos de las líneas E35 (rosa) y 21 medidas independientes realizadas en adultos de la línea DNE005 (verde).

4.3 La longevidad de las moscas de la línea HTT128 no difiere de las moscas control

Para comprobar si la expresión específica de la proteína HTT128 en el tejido nervioso afectaba la

longevidad de *Drosophila*, se analizó la supervivencia de la línea transgénica que expresa la proteína HTT128 (E35) y se comparó con la del control, en los que esta proteína no estaba presente.

La longevidad media se calculó como el promedio de vida de todos los individuos dentro de cada grupo, mientras que la longevidad máxima correspondió al tiempo de vida más largo registrado en la cohorte. La duración de vida se evaluó en poblaciones de moscas con y sin expresión de HTT128 (líneas E35 y DNE005), mantenidas a 29 °C, y los resultados se representaron como el porcentaje de supervivencia en función de la edad (en días).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 9**, donde se representan tanto los datos correspondientes a la línea control DNE005 (151 machos y 154 hembras) como a la línea E35 que expresa la HTT128 (161 machos y 152 hembras).

Las moscas controles tuvieron una esperanza de vida media (50% de supervivencia) de 29 días para las hembras y 25 días para los machos. En cuanto a la esperanza de vida máxima, esta alcanzó valores de 36-39 días para las hembras y de unos 32-34 días para los machos (**Figura 9**).

En cuanto a la línea transgénica, la expresión de HTT128 en tejido nervioso no alteró la vida media de las moscas, siendo esta de 33 días para las hembras y de 24 días para los machos (**Figura 9**). Lo mismo pasó con la esperanza de vida máxima, que fue de 42-45 días para las hembras y de 40-42 días para los machos (**Figura 9**). En la línea control se observa tanto en los machos como en las hembras una estabilidad hasta los días 22-25 (**Figura 9**), a partir de los cuales la mortalidad aumenta considerablemente. En el caso de las hembras con HTT128 la mortalidad se empieza a incrementar a partir del día 31 y en los machos de esta línea la mortandad aumenta a partir del día 26 (**Figura 9**). En líneas generales los datos muestran que la expresión de la proteína HTT128 en sistema nervioso de la mosca no altera en ninguno de los dos sexos la supervivencia de las moscas.

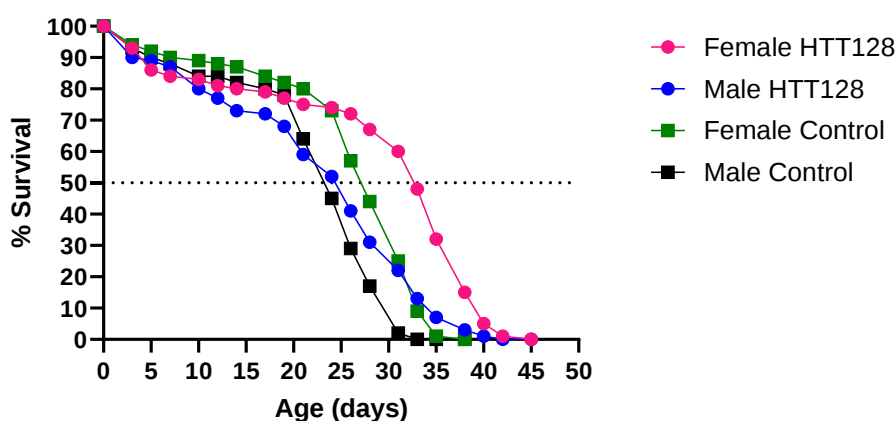


Figura 9: La supervivencia de la línea transgénica HTT128 (E35) no presenta diferencias notables en comparación con la línea control (DNE005). Se representa la supervivencia (en porcentaje) frente a la edad (en días) de la línea control DNE005 (151 machos y 154 hembras) frente a la línea E35 con expresión de HTT128 en sistema nervioso (161 machos y 152 hembras). Se compararon los valores medios (línea discontinua; 50% supervivencia) y longevidad máxima (último punto de datos) y en ninguno de los dos casos se observaron diferencias entre las dos líneas.

4.4 Las moscas con HTT128 no muestran alteración significativa de la función muscular

La alteración de la función motora es uno de los síntomas más comunes en los pacientes con EH. A su vez, el deterioro progresivo de la musculatura es una señal típica del envejecimiento, estrechamente relacionado con trastornos neurodegenerativos. Por esta razón, se evaluó la función muscular en moscas que expresaban HTT en el músculo, utilizando dos pruebas de escalada. El primer experimento consistió en contabilizar el número de moscas capaces de trepar 5cm de altura en 18s (**Figura 10A**) y el segundo en registrar el tiempo (en s) en que la mitad de las moscas superaban los 5 cm.

En el primer ensayo (**Figura 10A**) no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de moscas capaces de trepar en ninguno de los 4 días de experimentación (días 1, 7, 14 y 21). Se observa para ambas líneas cómo a medida que pasan los días, el porcentaje de moscas capaces de escalar 5 cm en 18 segundos va disminuyendo. A día 21 prácticamente ninguna de las moscas de ambas líneas era capaces de realizar la prueba.

En el segundo ensayo (**Figura 10B**) se observó que a medida que envejecían las moscas de ambas líneas, aumentaba en ellas el tiempo que tardaban la mitad de las moscas en superar la línea de los 5cm de altura. La diferencia más notable entre las moscas con HTT y control se dio a día 21, donde el tiempo que tardaron la mitad de las moscas en superar la marca de los 5cm de altura fue mayor que en el control; sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

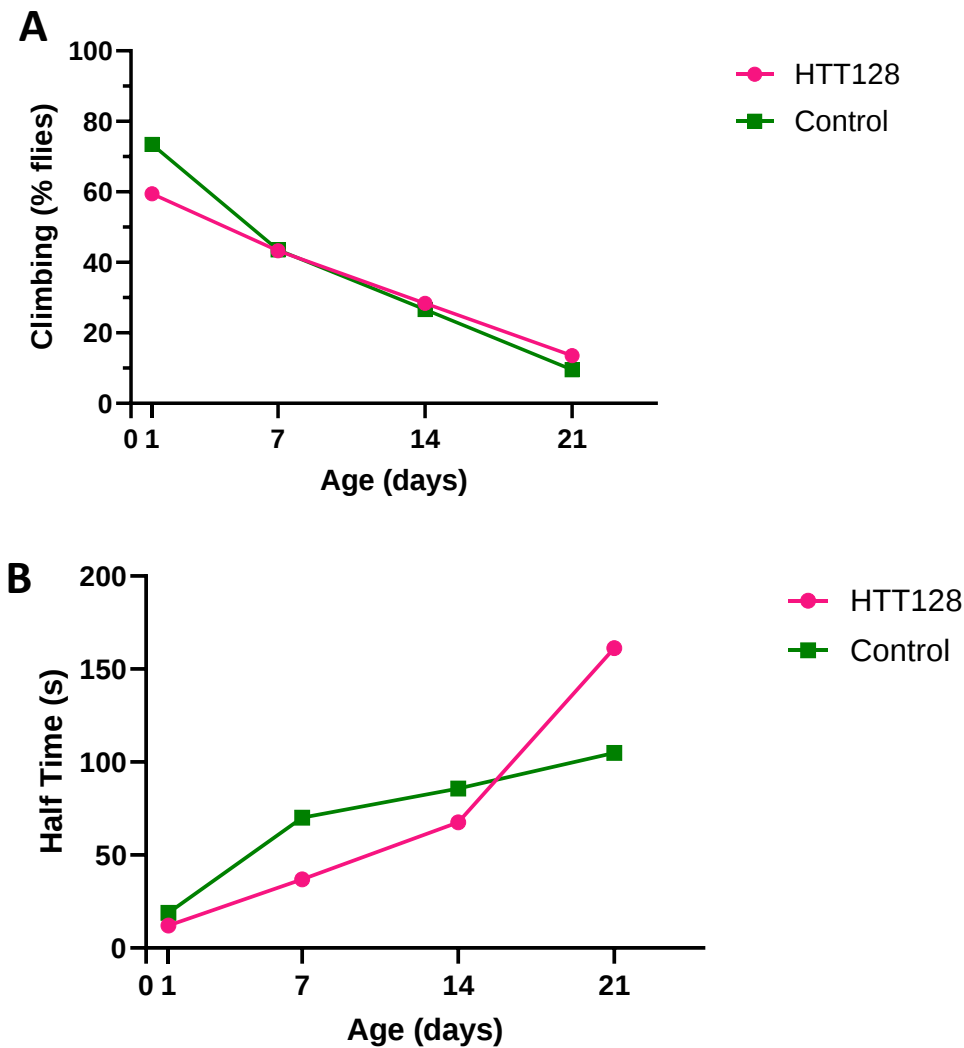


Figura 10. Ensayos de escalada en las líneas de moscas control y HTT128. La figura muestra dos ensayos de escalada diferentes como medida de la función muscular, realizados en moscas de las líneas DNE005 y E35 a días 1,7,14 y 21. **A)** La gráfica muestra el porcentaje de moscas que lograron escalar 5 cm de altura en 18 segundos, en función de su edad (expresada en días). Este porcentaje disminuye considerablemente con la edad, pero no se observaron diferencias significativas entre ambas líneas. **B)** La gráfica representa el tiempo promedio (en segundos) en el que la mitad de las moscas superan la marca de 5 cm frente a la edad (en días). Este tiempo fue aumentando notablemente con la edad, pero en ningún caso se vieron diferencias significativas entre las moscas con HTT128 y el control.

4.5 La expresión de HTT128 en sistema nervioso provoca un aumento de la $[Ca^{+2}]$ en el tejido muscular

Después de analizar cómo la expresión de la proteína HTT128 en el tejido nervioso de *Drosophila* afecta la longevidad y la capacidad locomotora de las moscas, se planteó investigar si esta proteína también influye en los niveles de calcio en el RE.

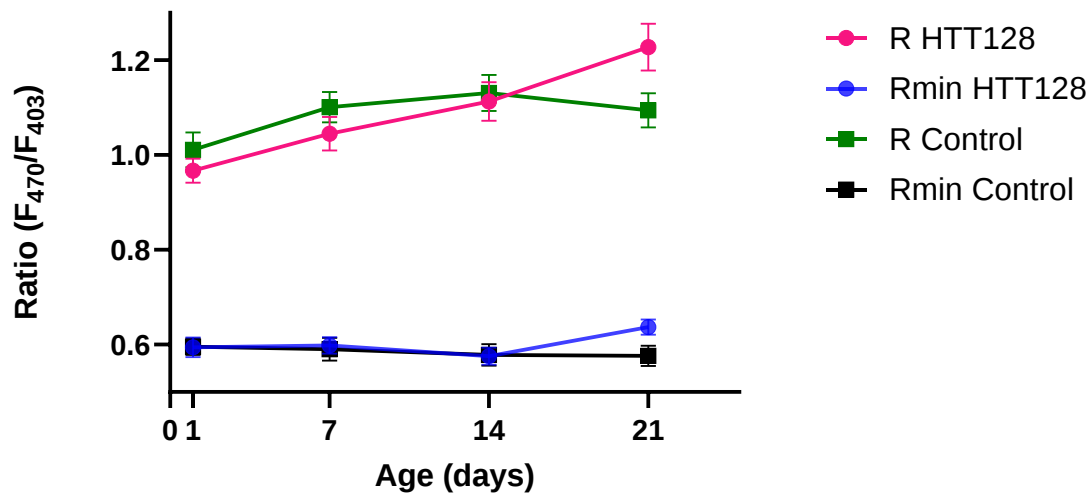
Para este análisis, las moscas transgénicas de ambas líneas se mantuvieron a 29 °C, igual que en los experimentos anteriores de longevidad y locomoción. Se midió la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en los días 1, 7, 14 y 21 tras la eclosión de los adultos.

Durante el experimento, se capturaron imágenes de fluorescencia tras excitar el sensor erGAP3 a longitudes de onda de 403 y 470 nm. A partir de estas imágenes, se calculó el cociente $R = F_{470}/F_{403}$, dividiendo la señal registrada a 470 nm entre la obtenida a 403 nm, píxel por píxel. Esta medida ratiométrica permitió estimar los niveles de Ca^{2+} en el sistema nervioso de las moscas E35 y DNE005.

En la **Figura 11A** se muestra el cociente de fluorescencia obtenido en las dos líneas transgénicas (E35 y DNE005) en las cuatro edades analizadas, tanto en condiciones basales (rosa y verde) como después de la depleción de Ca^{2+} en el RE (curvas azul y negra). Tanto en la línea control como en la línea transfectada con HTT128 no parece observarse un cambio notable en los ratios de fluorescencia registrados, observándose un ligero incremento desde el día 7 en la línea transfectada con HTT128.

En la **Figura 11B** se muestran los valores de los cocientes de fluorescencia en las dos líneas de moscas transgénicas, normalizados en función de su valor mínimo ($R_{mín}$), para los cuatro grupos de edad analizados. Cada valor es la media $\pm$ SEM de entre 14-16 moscas, la mitad hembras y la mitad machos. El contenido de Ca^{2+} en el sistema nervioso de las moscas control experimentó un aumento desde un $R/R_{mín}$ de $1,68 \pm 0,05$ (media $\pm$ SEM; $n=21$) en las moscas a día 1 hasta un $R/R_{mín}$ de $1,94 \pm 0,04$ (media $\pm$ SEM $n=22$) a día 14; a partir de este día disminuye ligeramente hasta $1,87 \pm 0,03$ a día 21 (media $\pm$ SEM $n=23$). Por otro lado, el contenido de Ca^{2+} en RE de la línea HTT128 aumentó desde un $R/R_{mín}$ de $1,63 \pm 0,04$ (media $\pm$ SEM $n=22$) en las moscas jóvenes a día 1 hasta $1,95 \pm 0,04$ (media $\pm$ SEM $n=22$) a día 14; estos niveles se mantuvieron estables hasta día 21. No se observaron diferencias significativas entre ambas líneas a ninguno de los 4 días de estudio. En resumen, los datos muestran que la expresión de HTT128 en tejido nervioso provoca una disminución en los niveles $[Ca^{2+}]_{RE}$ entre los días 1 y 14 para luego alcanzar unos niveles equiparables a los de la línea control a partir del día 14.

A



B

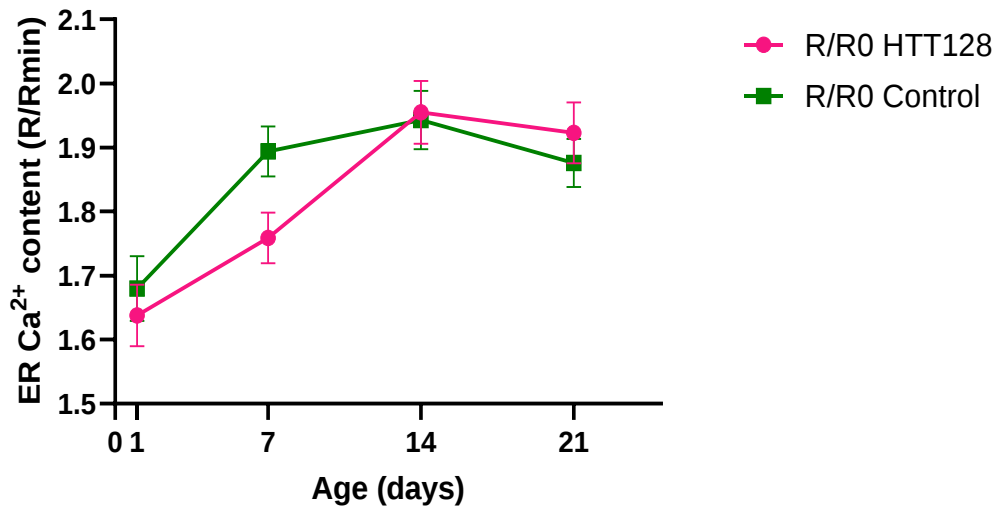


Figura 10. La expresión de HTT128 no provoca una alteración significativa en los niveles de Ca^{2+} del RE. **A)** Mediciones *in vivo* de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en las líneas transgénicas E35 (elav-erGAP3-HTT128) y DNE005 (elav-erGAP3). La Rmin se obtuvo por calentamiento a 50°C durante 10 minutos. Cada valor es la media $\pm$ SEM de 14-16 moscas, la mitad hembras y la mitad machos. Los resultados obtenidos muestran cómo la relación erGAP3(R) no difiere considerablemente entre las dos líneas. Los valores de Rmin fueron constantes durante toda la vida de la mosca. **B)** Aumento en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en las moscas transgénicas HTT128 y control hasta día 14 y mantenimiento de los niveles desde el día 14 hasta día 21. Las ratios de erGAP3 obtenidos previamente ($R = F_{470}/F_{403}$) en las moscas HTT128 y control se normalizaron dividiendo por el valor de Rmin obtenido en la misma mosca después del calentamiento. Los datos normalizados (R/R_{min} ; eje izquierdo) representan una cuantificación del contenido de Ca^{2+} RE que oscila entre 1.5 en $[\text{Ca}^{2+}] = 0$ y 2.1 en $[\text{Ca}^{2+}] = \text{máximo}$. No hubo diferencias significativas entre ninguna de las dos líneas a lo largo de los diferentes días de estudio. Los valores corresponden a la media de machos y hembras de la línea E35 y a la media de machos y hembras de la línea DNE005.

5.DISCUSIÓN

A pesar de que la base genética de la EH está bien definida, los mecanismos celulares y moleculares que provocan la degeneración neuronal siguen siendo objeto de debate, ya que la patología parece involucrar múltiples procesos interrelacionados y no puede explicarse únicamente por la mutación genética. Entre las hipótesis propuestas para explicar la progresión de la EH, destaca la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular como un factor clave en la disfunción neuronal. La HTT se expresa en la mayoría de los tejidos, pero la vulnerabilidad selectiva de ciertas poblaciones neuronales, como las del estriado y la corteza cerebral, sugiere que estos tipos celulares son especialmente sensibles a los desequilibrios en la señalización por Ca^{2+} . El RE desempeña un papel central en la regulación del Ca^{2+} intracelular, y la colocación de la HTT con este orgánulo ha llevado a plantear que la disfunción en el manejo del Ca^{2+} en el RE podría contribuir de manera significativa a la patogénesis de la EH, favoreciendo la aparición de estrés celular y la activación de vías apoptóticas(35).

Para la realización de este estudio se decidió emplear el modelo *Drosophila Melanogaster*, ya que esta especie permite una manipulación genética sencilla y cuenta con un ciclo de vida breve. Actualmente, se han identificado más de 70 líneas transgénicas de *Drosophila melanogaster* utilizadas como modelos para el estudio de la EH (Bloomington *Drosophila* Stock Center). Estas líneas contienen fragmentos o la totalidad del gen *htt*, incorporando expansiones de poliglutaminas de distinta longitud. Para nuestro estudio, seleccionamos una línea que expresa la secuencia completa del gen humano *htt* con una expansión de 128 repeticiones de glutamina, con el fin de detectar de forma más clara y directa los posibles efectos de la HTT128 sobre la señalización intracelular de Ca^{2+} , así como su impacto en la funcionalidad y viabilidad celular. Aunque se considera que a partir de 36 repeticiones ya pueden manifestarse síntomas de la enfermedad y por tanto ser válidas para su estudio, es probable que dichos modelos presenten un inicio más tardío y una progresión más leve en comparación con los que expresan expansiones mayores.

Para analizar la homeostasis de Ca^{2+} en RE, se optó por utilizar erGAP3, un sensor de Ca^{2+} previamente descrito que presenta características ideales para este propósito. Se trata de un indicador ratiométrico, de baja afinidad y específicamente dirigido al RE, lo que lo hace adecuado para detectar las altas concentraciones de Ca^{2+} que se encuentran en este compartimento. Además, erGAP3 se expresa de forma eficiente y específica en el RE, sin interferir con las proteínas endógenas, lo que permite generar líneas transgénicas que expresan un sensor funcional de calcio in vivo, sin alterar la señalización intracelular de Ca^{2+} (34).

La capacidad del RE para regular adecuadamente el Ca^{2+} se ve afectada por el envejecimiento celular. A medida que las células envejecen, el control del Ca^{2+} en el RE se debilita, lo que contribuye a una progresiva pérdida de funcionalidad celular e incluso a la muerte. En la EH, la HTT128 hace que el RE pierda su capacidad de regular y almacenar el Ca^{2+} de forma adecuada por la sensibilización patológica de canales como IP3R1, la activación desregulada de la SOCE y alteraciones transcripcionales en proteínas clave. Esto contribuye a la sobrecarga de calcio, al estrés celular persistente y, finalmente, a la disfunción y muerte neuronal(26,35).

Mediante el sistema UAS Gal-4 y cruces con selección de recombinantes homólogos, se generaron moscas transgénicas expresando el sensor y la proteína HTT128 específicamente en el tejido nervioso de las moscas, cruzando la línea que porta el gen completo de la HTT128 bajo el control de la secuencia UAS (línea 33808) con líneas estables expresando el sensor erGAP3 específicamente en tejido nervioso (DNE005).

Se comprobó si la expresión de erGAP3 era específica de tejido nervioso mediante el uso de un microscopio de fluorescencia y el registro de la fluorescencia verde emitida por la proteína GFP contenida en el sensor (**Figuras 8A y 8B**). Se comparó también el nivel de expresión de la línea HTT128 (E35) con la control (DNE005), observándose una buena expresión en ambas y sin diferencias significativas entre las dos. De este resultado se extrae que la expresión de HTT128 no altera considerablemente la expresión del sensor erGAP3 (**Figura 8C**). De todas formas, el sensor erGAP3 es ratiométrico, siendo capaz de medir la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ independientemente de los niveles de expresión de este, por lo que las medidas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ no se verían afectadas por diferencias en la expresión del indicador de Ca^{2+} .

Las personas con EH suelen presentar una esperanza de vida más corta que la media de la población. La edad de inicio de los síntomas y el número de repeticiones de CAG en el gen que codifica para la HTT están directamente relacionadas con la progresión de la enfermedad y la supervivencia. Por otro lado, un estudio realizado previamente en el laboratorio indicó que la expresión del sensor erGAP3 no modificaba la supervivencia de las moscas en comparación con las moscas de tipo silvestre (29). Por ello decidimos evaluar si la expresión de la proteína HTT128 específicamente en tejido nervioso producía cambios en la longevidad de *Drosophila*, para ello evaluamos la longevidad de la línea transgénica E35 que expresa HTT128 y la comparamos con la línea control DNE005. Con el fin de minimizar cualquier posible sesgo derivado de variables como la temperatura, la alimentación o la densidad de individuos, se procuró mantener estas condiciones constantes y controladas durante todo el desarrollo del estudio. No se observaron variaciones significativas entre los resultados obtenidos en ambas líneas. Esto no era lo previsto debido a que la EH en humanos se caracteriza por un deterioro progresivo que lleva a la muerte a

los 15-20 años desde la aparición de los primeros síntomas, en consecuencia lo que se esperaba obtener era una disminución significativa en la esperanza de vida de las moscas. Además, estos resultados difieren con los obtenidos en otros estudios realizados en *Drosophila* donde se demostró una disminución considerable de la supervivencia en moscas que expresan HTT en tejido nervioso(36).

La disfunción motora es otro de los principales síntomas que se observan en la EH, por lo que otro objetivo de estudio fue la comprobación de la pérdida de la actividad motora provocada por la expresión de HTT128 en tejido nervioso de las moscas, mediante dos ensayos de actividad locomotora. Uno de los ensayos se basó en contar cuántas moscas eran capaces de ascender 5 cm en un intervalo de 18 segundos, mientras que el otro consistió en medir el tiempo que tardaba el 50 % de las moscas en alcanzar la marca de 5 cm. Aunque se trata de pruebas distintas en su planteamiento, ambas tenían como objetivo evaluar la misma variable: la capacidad locomotora de las moscas adultas en distintos momentos tras la eclosión, concretamente en los días 1, 7, 14 y 21. En el primer ensayo (nº de moscas que sobrepasan los 5 cm en 18 s) las moscas HTT y control mostraron una pérdida de función motora ya a día 7, que fue empeorando progresivamente hasta llegar a día 21 donde muy pocas moscas eran ya capaces de superar la prueba. No se observaron diferencias significativas entre ambas líneas en el porcentaje de moscas que lograron escalar durante cualquiera de los cuatro días de estudio. En el segundo ensayo, que consistía en medir el tiempo que tardaba el 50 % de las moscas en superar la marca de los 5 cm, se obtuvieron resultados comparables a los del primer test. Se observó un incremento progresivo en el tiempo requerido para completar la prueba conforme las moscas envejecían. El aumento más notable tuvo lugar a día 21 en las moscas que expresan HTT128; este punto fue el único en el que el tiempo promedio de escalada de las moscas transgénicas con HTT fue superior al tiempo de escalada promedio de las moscas control. Al igual que con el primer ensayo, no se observaron diferencias significativas en los tiempos de escalada en ninguno de los 4 días de estudio. Estos resultados son discordantes con otros obtenidos por otros grupos de investigación(37).

La dishomeostasis del Ca^{2+} es uno de los mecanismos subyacentes implicados en la patogénesis de la EH con mayor evidencia(25,26). Realizamos también medidas de los niveles de Ca^{2+} a días 1,7,14 y 21 con el objetivo de averiguar si la expresión de HTT128 alteraba las reservas de Ca^{2+} en el RE a lo largo del tiempo de vida de la mosca. Los datos representados en la **Figura 10** muestran un aumento en los niveles de Ca^{2+} en ambas líneas transgénicas hasta día 14, siendo los niveles de las moscas con HTT128 ligeramente menores a los de las moscas control. A partir del día 21 los niveles de Ca^{2+} de ambas líneas se mantienen estables. No hubo diferencias significativas entre ambas líneas a lo largo de los diferentes días de experimentación. Estos datos no se correlacionan con las alteraciones esperadas en la EH, las cuales implicarían una pérdida

progresiva de la función neuromuscular y se asociaría con una disminución en las concentraciones de calcio en el RE(29).

Los resultados inesperados obtenidos en los diferentes ensayos nos llevaron a preguntarnos si había alguna alteración en la expresión de HTT128 en la línea E35, por lo que posteriormente a la realización de los experimentos se volvió a comprobar si la línea transgénica creada expresando HTT128 permanecía o no inalterada. Para la comprobación de la línea se cruzaron machos E35 con hembras vírgenes de una línea silvestre de *Drosophila* (W1118) con ojos blancos y se analizó el color de ojos en la descendencia masculina. El 100% de los machos (en los cuales no se dan eventos de recombinación homóloga) presentaban ojos blancos, por lo que se confirmó la pérdida del gen de la HTT128 en la línea transgénica con la que se estuvieron haciendo los experimentos. Esto explica la discrepancia de los resultados obtenidos en relación con otros ya publicados por otros estudios y por nuestro propio laboratorio.

6. CONCLUSIONES

Aunque debido a la pérdida del gen para la HTT128 humana (en la línea transgénica con la que se han realizado los experimentos) inutiliza los resultados obtenidos, de no ser esto así las conclusiones que se podrían extraer de los resultados serían las siguientes:

- La expresión de HTT128 en el tejido nervioso de las moscas no alteró significativamente su supervivencia, equiparándose los resultados obtenidos con los de la línea control.
- La expresión de HTT128 en el tejido nervioso de las moscas no alteró notablemente la función motora en comparación con la línea que no expresa HTT128.
- La expresión de HTT128 en el tejido nervioso no disminuyó los niveles de Ca^{+2} en el RE de manera significativa, lo que se correlaciona con el mantenimiento observado en la función motora.
- La obtención de los resultados contrarios a los esperados se atribuye a la pérdida de la expresión de HTT128 en la línea E35.

7.BIBLIOGRAFÍA

1. Ghosh R, Tabrizi SJ. Clinical Features of Huntington's Disease. En: Nóbrega C, Pereira de Almeida L, editores. Polyglutamine Disorders [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [citado 7 de mayo de 2025]. p. 1-28. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_1
2. McColgan P, Tabrizi SJ. Huntington's disease: a clinical review. Euro J of Neurology. enero de 2018;25(1):24-34.
3. Jiang A, Handley RR, Lehnert K, Snell RG. From Pathogenesis to Therapeutics: A Review of 150 Years of Huntington's Disease Research. IJMS. 21 de agosto de 2023;24(16):13021.
4. Walker FO. Huntington's disease. The Lancet. enero de 2007;369(9557):218-28.
5. Tung CW, Huang PY, Chan SC, Cheng PH, Yang SH. The regulatory roles of microRNAs toward pathogenesis and treatments in Huntington's disease. J Biomed Sci. diciembre de 2021;28(1):59.
6. Roos RA. Huntington's disease: a clinical review. Orphanet J Rare Dis. diciembre de 2010;5(1):40.
7. Ferguson MW, Kennedy CJ, Palpagama TH, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. Current and Possible Future Therapeutic Options for Huntington's Disease. J Cent Nerv Syst Dis. abril de 2022;14:11795735221092517.
8. Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH. Animal Models of Huntington's Disease. ILAR Journal. 1 de enero de 2007;48(4):356-73.
9. Nittari G, Roy P, Martinelli I, Bellitto V, Tomassoni D, Traini E, et al. Rodent Models of Huntington's Disease: An Overview. Biomedicines. 16 de diciembre de 2023;11(12):3331.
10. García-Ramos García R, Del Val Fernández J, Catalán Alonso MJ, Barcia Albacar JA, Matías-Guín J. Modelos experimentales de la enfermedad de Huntington. RevNeurol. 2007;45(07):437.
11. Nitta Y, Sugie A. Studies of neurodegenerative diseases using *Drosophila* and the development of novel approaches for their analysis. Fly. 31 de diciembre de 2022;16(1):275-98.
12. Bier E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. Nat Rev Genet. enero de 2005;6(1):9-23.
13. Santarelli S, Londero C, Soldano A, Candelaresi C, Todeschini L, Vernizzi L, et al. *Drosophila melanogaster* as a model to study autophagy in neurodegenerative diseases induced by proteinopathies. Front Neurosci. 18 de mayo de 2023;17:1082047.
14. Pandey UB, Nichols CD. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. Pharmacological Reviews. junio de 2011;63(2):411-36.
15. Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. Nat Rev Neurosci. junio de 2015;16(6):345-57.
16. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. julio de 2003;4(7):517-29.
17. Clapham DE. Calcium Signaling. Cell. diciembre de 2007;131(6):1047-58.
18. Stathopulos PB, Ikura M. Store operated calcium entry: From concept to structural mechanisms. Cell Calcium. mayo de 2017;63:3-7.
19. Brini M, Ottolini D, Calì T, Carafoli E. Calcium in Health and Disease. En: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, editores. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013 [citado 22 de junio de 2025]. p. 81-137. (Metal Ions in Life Sciences; vol.

- 13). Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7500-8_4
20. Schwaller B. Cytosolic Ca²⁺ Buffers. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 1 de noviembre de 2010;2(11):a004051-a004051.
21. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/Calcium Exchange: Its Physiological Implications. Physiological Reviews. 1 de julio de 1999;79(3):763-854.
22. Raffaello A, Mammucari C, Gherardi G, Rizzuto R. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. Trends in Biochemical Sciences. diciembre de 2016;41(12):1035-49.
23. Prole DL, Taylor CW. Structure and Function of IP₃ Receptors. Cold Spring Harb Perspect Biol. abril de 2019;11(4):a035063.
24. Primeau JO, Armanious GP, Fisher ME, Young HS. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. En: Harris JR, Boekema EJ, editores. Membrane Protein Complexes: Structure and Function [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [citado 23 de junio de 2025]. p. 229-58. (Subcellular Biochemistry; vol. 87). Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7757-9_8
25. Kolobkova YA, Vigont VA, Shalygin AV, Kaznacheyeva EV. Huntington's Disease: Calcium Dyshomeostasis and Pathology Models. Acta Naturae. 2017;9(2):34-46.
26. Giacomello M, Oliveros J, Naranjo J, Carafoli E. Neuronal Ca²⁺ dyshomeostasis in Huntington disease. Prion. enero de 2013;7(1):76-84.
27. Bezprozvanny I, Hayden MR. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. Biochemical and Biophysical Research Communications. octubre de 2004;322(4):1310-7.
28. Hales KG, Korey CA, Larracuente AM, Roberts DM. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. Genetics. 1 de noviembre de 2015;201(3):815-42.
29. Río Lorenzo AD. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics in aging *Drosophila* and correlation with sarcopenia [Internet]. Universidad de Valladolid; 2020 [citado 29 de junio de 2025]. Disponible en: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/43643>
30. Callejo Mateo B. Dinámica del Ca²⁺ en el retículo sarcoplásmico en *Drosophila* envejecida y su relación con la sarcopenia [tesis de máster]. Valladolid: Universidad de Valladolid; 2024.
31. Linford NJ, Bilgir C, Ro J, Pletcher SD. Measurement of Lifespan in *Drosophila melanogaster*. JoVE. 7 de enero de 2013;(71):50068.
32. Rojo-Ruiz J, Sánchez-Rabadán C, Calvo B, García-Sancho J, Alonso MT. Using Fluorescent GAP Indicators to Monitor ER Ca²⁺. Current Protocols. junio de 2024;4(6):e1060.
33. Rodríguez-Prados M, Rojo-Ruiz J, Aulestia FJ, García-Sancho J, Alonso MT. A new low-Ca²⁺ affinity GAP indicator to monitor high Ca²⁺ in organelles by luminescence. Cell Calcium. diciembre de 2015;58(6):558-64.
34. Navas-Navarro P, Rojo-Ruiz J, Rodríguez-Prados M, Ganfornina MD, Looger LL, Alonso MT, et al. GFP-Aequorin Protein Sensor for Ex Vivo and In Vivo Imaging of Ca²⁺ Dynamics in High-Ca²⁺ Organelles. Cell Chemical Biology. junio de 2016;23(6):738-45.
35. Saudou F, Humbert S. The Biology of Huntingtin. Neuron. marzo de 2016;89(5):910-26.
36. Lin YH, Maaroufi HO, Ibrahim E, Kucerova L, Zurovec M. Expression of Human Mutant Huntingtin Protein in *Drosophila* Hemocytes Impairs Immune Responses. Front Immunol. 16 de octubre de 2019;10:2405.
37. Lee WCM, Yoshihara M, Littleton JT. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins

and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2 de marzo de 2004;101(9):3224-9.