UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

**EFFECTO DEL FACTOR NEUROTROFICO
ÁCIDO OLEICO EN MODELOS CELULARES
DE SÍNDROME DE DOWN**

Tesis Doctoral
MARUAN HIJAZI VEGA
2014

**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**EFECTO DEL FACTOR NEUROTROFICO ÁCIDO
OLEICO EN MODELOS CELULARES DE
SÍNDROME DE DOWN**

Tesis Doctoral

MARUAN HIJAZI VEGA

2014

D. JOSÉ MARÍA MEDINA JIMÉNEZ, Catedrático de Universidad y D^a. ANA PURIFICACIÓN VELASCO CRIADO, Profesora Contratado Doctor, adscritos al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

AUTORIZAN

La presentación de la Tesis Doctoral: “Efecto del factor neurotrófico ácido oleico en modelos celulares de síndrome de Down”, realizada bajo su dirección por el Licenciado en Farmacia y Biotecnología, D. Maruan Hijazi Vega, en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, firman el documento, en Salamanca a 04 de Marzo de 2014.

Fdo. José María Medina Jiménez

Fdo. Ana Purificación Velasco Criado

ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterasa
AGS: ácido graso sintasa
ANOVA: análisis de varianza
APP: proteína precursora del β -amiloide
AVV: virus adeno-asociado
BAC: cromosoma artificial de bacteria
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro
BMP: proteína morfogenética ósea
BSA: albúmina sérica bovina
CaMK II: proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina
CDK: proteínas quinasas dependientes de ciclinas
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario
ChAT: colina acetiltransferasa
CHT: transportador de alta afinidad de colina
CI: coeficiente intelectual
CNG: secuencias no génicas
CNh: línea celular derivada de corteza cerebral de ratones euploides
CoA: coenzima A
Ct: ciclo umbral
CTb: línea celular derivada de corteza cerebral de fetos de ratones con trisomía 16
Cy2: cianina 2
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol
DEPC: dietilpirocarbonato
DMEM: medio *Eagle* modificado por *Dulbecco*
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTP: desoxirribonucleotido
DOC: cacodilato sódico
dpm: desintegraciones por minuto
DSCR: Región Crítica del síndrome de Down
dsRNA: RNA de doble cadena
DTT: ditioneitol
dUTP: desoxiuridina trifosfato
DYRK1A: *Dual specificity Yak1-Related Kinase*
EBSS: Solución de *Earle*
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA: ácido etilenglicol tetraacético
Ets-2: homólogo 2 del oncogén E26 del virus de eritroblastosis aviar

FBS: suero fetal bovino
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
GAP-43: proteína asociada a crecimiento axonal 43
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GRP78: proteína regulada por glucosa 78
GSK: glucógeno sintasa quinasa
H₂DCFDA: 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato
HDM: membranas de alto peso molecular
HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HRP: peroxidasa de rábano
HSA21: cromosoma 21 humano
IFL: capa fibrilar interna
ISZV: capa interna subventricular
Kb: kilobases
KDa: kilodaltons
LDM: membranas de bajo peso molecular
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
Mb: megabases
MMU10,MMU16,MMU17: cromosomas 10,16 y 17 murinos
mnbb: *minibrain*
MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NEp: neuroepitelio
NFATc: factor nuclear de células T activadas
NLS: señal de localización nuclear
OFL: capa fibrilar externa
OSZV: capa externa subventricular
PAC: cromosoma artificial de bacteriófago *P1*
pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino
PC: fosfatidilcolina
Pc: placa cortical
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDH: piruvato deshidrogenasa
PE: fosfatidiletanolamina
Pi: fosfatidilinositol
PKC: proteína quinasa C
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP: preplaca
PPAR α : receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa
PS: fosfatidilserina

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RCAN1: regulador de calcineurina 1
REST/NRSF: factor silenciador restrictivo de neuronas
RGC: células de la glía radial
RHP: oligonucleótidos hexaméricos aleatorios
RIPA: ensayo de radio-inmunoprecipitación
ROS: especies reactivas de oxígeno
RT: transcripción inversa
SCD-1: estearil-CoA desaturasa
SDS: dodecilsulfato sódico
SEM: error estándar de la media
Ser/Thr: serina o treonina
Shh: *sonic hedgehog*
siRNA: RNA de interferencia de cadena corta
SNC: sistema nervioso central
Sod-1: superóxido dismutasa 1
SP: subplaca
SREBP-1: proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1
SV40: virus de simio 40
TAE: tampón Tris acetato
TBS: tampón Tris salino
TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TdT: transferasa terminal de desoxinucleótidos
TTBS: tampón Tris salino con Tween-20
TUNEL: *TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*
UTR: región no traducida
VCP: proteína que contiene valosina
VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje
YAC: cromosoma artificial de levadura
ZI: zona intermedia
ZM: zona marginal
ZSV: zona subventricular
ZV: zona ventricular

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El síndrome de Down (SD).....	3
1.1.1. Historia.....	3
1.1.2. Aspectos generales.....	3
1.1.3. Aspectos clínicos del SD.....	4
1.1.3.1. Alteraciones de tipo neurológico y conductual.....	4
1.1.4. Origen de la trisomía 21.....	6
1.1.5. Correlación genotipo-fenotipo.....	7
1.1.6. Región Crítica del síndrome de Down (DSCR)	7
1.2. Modelos murinos y celulares de SD.....	9
1.2.1. Modelos trisómicos (MMU16)	11
1.2.2. Modelos transcromosómicos.....	13
1.2.3. Modelos transgénicos de YACs, BACs y PACs.....	13
1.2.4. Modelos transgénicos de sobreexpresión de gen único.....	13
1.2.4.1. Modelo TgDyrk1A.....	13
1.2.5. Modelos celulares de SD.....	15
1.3. DYRK1A.....	16
1.3.1. Familia de proteínas DYRK.....	16
1.3.2. Estructura y mecanismo de activación de DYRK1A.....	17
1.3.3. Localización subcelular de DYRK1A.....	18
1.3.4. Patrón de expresión de DYRK1A.....	19
1.3.5. Función de DYRK1A.....	19
1.3.6. DYRK1A en neuropatologías.....	20
1.4. Desarrollo del Sistema Nervioso Central en SD.....	21
1.4.1. Implicación de DYRK1A en el neurodesarrollo.....	26
1.5. El ácido oleico en el Sistema Nervioso Central.....	28
1.5.2.1. Características generales.....	28

1.5.2.2. Biosíntesis y localización.....	28
1.5.2.3. Efecto axonogénico durante la diferenciación neuronal.....	30
1.5.2.4. Proteínas transportadoras de ácidos grasos: la albúmina.....	32
1.5.2.4.1. Estructura de la albúmina y unión a ácidos grasos.....	32
1.5.2.4.2. La albúmina en el cerebro.....	34
1.6. Neurotransmisión colinérgica.....	35
1.6.1. Localización y regulación de la colina acetiltransferasa.....	35
1.6.2. Receptores colinérgicos.....	37
2. PLAN DE TRABAJO.....	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
3.1. Material.....	45
3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario.	45
3.1.2. Medios instrumentales.	45
3.1.3. Productos.	49
3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares.	49
3.1.3.2. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad, muerte celular y especies reactivas de oxígeno.	49
3.1.3.3. Productos utilizados en los ensayos con radioactividad.	50
3.1.3.4. Productos utilizados en el análisis de proteínas, inmunocitoquímica y localización de ácido oleico.	50
3.1.3.5. Productos empleados en el silenciamiento génico.	52
3.1.3.6. Productos utilizados para el fraccionamiento celular y determinación de fosfatidilcolina.	53
3.1.3.7. Productos utilizados para determinar el genotipo de ratones y el análisis del mRNA.	53
3.2. Métodos.....	55
3.2.1. Preparación de los cultivos celulares.	55
3.2.1.1. Composición de las disoluciones.	55
3.2.1.2. Preparación de los cultivos de las líneas celulares.	57

3.2.1.3. Preparación del cultivo primario de neuronas procedentes de ratones normales y transgénicos que sobreexpresan <i>Dyrk1A</i>	57
3.2.2. Estudio de la apoptosis mediante la técnica TUNEL.	58
3.2.3. Determinación de la actividad de piruvato deshidrogenasa.	59
3.2.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno.	60
3.2.5. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT.	62
3.2.6. Determinación de la expresión y localización de ChAT mediante inmunocitoquímica. ...	63
3.2.7. Silenciamiento del mRNA de <i>Dyrk1A</i> mediante la técnica del RNA de interferencia.	63
3.2.8. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo <i>Western blot</i>	65
3.2.9. Genotipado de los ratones transgénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	69
3.2.10. Captación de ácido oleico.	70
3.2.11. Detección de ácido oleico conjugado con biotina.	70
3.2.12. Determinación de fosfatidilcolina mediante ensayo colorimétrico.	71
3.2.13. Fraccionamiento celular y purificación de membranas plasmáticas.	72
3.2.14. Análisis del mRNA de proteínas específicas mediante transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa.	73
3.2.15. Cuantificación del mRNA de proteínas específicas mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.	76
3.2.16. Análisis estadístico.	77
4. RESULTADOS.....	79
4.1. Caracterización de las células trisómicas.	81
4.1.1. Fenotipo, supervivencia y muerte celular.	81
4.1.2. Velocidad de la vía glucolítica.	90
4.1.3. Producción de especies reactivas de oxígeno.	91
4.2. Efecto del ácido oleico sobre la expresión de la colina acetiltransferasa (ChAT) en modelos de síndrome de Down.	95
4.2.1. Efecto del ácido oleico sobre la expresión de ChAT en células trisómicas.	95
4.2.2. Efecto del silenciamiento de <i>Dyrk1A</i> sobre la expresión de ChAT en células trisómicas.	99

4.2.3. Efecto del ácido oleico en neuronas procedentes de ratones transgénicos que sobreexpresan <i>Dyrk1A</i>	102
4.3. Estudio del efecto del ácido oleico sobre la síntesis de fosfatidilcolina en células trisómicas.	107
4.3.1. Captación del ácido oleico. Implicación de <i>Dyrk1A</i>	107
4.3.2. Localización del ácido oleico. Implicación de <i>Dyrk1A</i>	109
4.3.3. Incorporación del ácido oleico en fosfatidilcolina.	114
4.3.3.1. Efecto del ácido oleico sobre la concentración de fosfatidilcolina en células trisómicas. Papel de <i>Dyrk1A</i>	114
4.3.3.2. Efecto de la adición exógena de fosfolípidos sobre la expresión de ChAT.	122
4.3.4. Síntesis de fosfatidilcolina en células trisómicas.	123
4.3.4.1. Expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de fosfatidilcolina.	123
4.3.4.2. Papel de SREBP-1 en la síntesis de fosfatidilcolina.	126
5. DISCUSIÓN.....	133
6. CONCLUSIONES.....	145
7. BIBLIOGRAFÍA.....	147

1

INTRODUCCIÓN

1.1. El síndrome de Down (SD)

1.1.1. Historia

El síndrome de Down (SD) debe su nombre al apellido del médico británico John Langdon Haydon Down, que en 1866 fue el primero en describir las características clínicas que tenían en común un grupo concreto de personas, sin poder determinar su causa (Down, 1995). Dado que estas personas presentaban muchas similitudes, se pudo hablar por primera vez de una patología de tipo sindrómica. En 1909, Shuttleworth mencionó en una comunicación científica la edad materna como factor de riesgo en el SD. En 1932, Davenport sugirió que las irregularidades cromosómicas podrían originar ciertas formas de discapacidad intelectual, entre ellas el SD. Tjio y Levan (1956) (Longo, 1978) demostraron la existencia de 46 cromosomas en el ser humano y, poco después, en el año 1959, el equipo formado por Lejeune, Gautrier y Turpin (Lejeune et al., 1959) en Francia, de forma paralela al equipo británico de Jacobs (Jacobs et al., 1959), descubrieron que las personas con SD portan 1 cromosoma 21 extra, es decir, 47 cromosomas en total, definiendo así la causa genética de la patología. En 1961, la Organización Mundial de la Salud hizo efectivo el cambio de nomenclatura y el término “mongolismo” pasó a denominarse oficialmente síndrome de Down.

1.1.2. Aspectos generales

El SD, o trisomía 21, es la aneuploidía autosómica más frecuente y la principal causa genética de retraso mental y de defectos cardíacos congénitos. Presenta una incidencia variable de 1/700 a 1/800 recién nacidos vivos. El retraso mental, la hipotonía muscular, el retardo en el crecimiento, las dismorfologías físicas y las alteraciones neuropatológicas asociadas con la enfermedad de Alzheimer, son características comunes en los individuos con SD (ver revisión (Dierssen, 2012)). El SD cursa a menudo con alteraciones endocrinas, musculares, gastrointestinales, cardiológicas, oculares, auditivas e inmunológicas. La esperanza de vida de los individuos con SD ha aumentado considerablemente en los últimos 30 años, pasando de 26 a 60 años. Entre los factores que pueden haber contribuido a esta mejora se incluyen el avance en los tratamientos para algunas de las causas de mortalidad más frecuentes y los cambios en la práctica médica, incluyendo la cirugía cardíaca para niños con SD. Además, las técnicas de estimulación temprana, a través de ejercicios físicos, visuales y olfativos, son capaces de activar en los

primeros meses de vida partes del cerebro que hace 40 años estaban destinadas a permanecer dormidas para siempre.

1.1.3. Aspectos clínicos del SD

FENOTIPO	FRECUENCIA EN SD (%)
Retraso mental	100 %
Neuropatología de tipo Alzheimer	60-70 % (a partir de los 35 años)
Hipotonía muscular	100 %
Dermatoglifos característicos	85 %
Corta estatura	70 %
Braquicefalia	75 %
Pliegues epicánticos	60 %
Manchas de Brushfield en iris	55 %
Protusión lingual	45 %
Pabellones auditivos dismórficos	50 %
Manos cortas y amplias	65 %
Quinto dedo corto de la mano	60 %
Cardiopatía congénita	40 %
Canal atrioventricular	16 %
Atresia / Estenosis duodenal	Riesgo x 250
Ano imperforado	Riesgo x 50
Enfermedad de Hirschsprung	Riesgo x 30
Leucemia megacariocítica aguda (LMA)	Riesgo x 200-400
Leucemia linfoblástica aguda (LLA) + LMA	Riesgo x 10-20

Tabla 1: Frecuencia fenotípica en los individuos con SD (%). Tabla modificada de (Antonarakis et al., 2004).

1.1.3.1. Alteraciones de tipo neurológico y conductual

Los individuos con SD pueden presentar severas alteraciones neurológicas y conductuales, disfunción cognitiva y, generalmente, un coeficiente intelectual (CI) entre 30 y 70. La infancia se caracteriza por un retardo en el desarrollo cognitivo, que conduce a un retraso mental moderado y a un descenso del CI desde el primer año de vida hasta la infancia tardía. En los individuos adultos se produce un deterioro cognitivo debido, presumiblemente, a un envejecimiento acelerado (ver revisión (Rachidi and Lopes, 2007)).

Estudios neuroanatómicos desarrollados en adultos con SD han revelado anormalidades pre y postnatales. Así, las personas con SD tienen un peso total del cerebro menor (Schmidt-Sidor et

al., 1990) y el cerebelo, los lóbulos frontales y los temporales son más pequeños (Ness et al., 2012). Por el contrario, se ha visto un aumento de volumen en otras áreas del cerebro, tales como los ventrículos, el córtex temporal, parietal y posterior, el tálamo y el hipotálamo (ver revisión (Rachidi and Lopes, 2008)). En niños con SD también se ha observado un retraso en la maduración del cerebro y en la mielinización, conexiones sinápticas anormales y dendritas más cortas y en menor número (Takashima et al., 1981; Takashima et al., 1994). Además, en estudios funcionales se ha demostrado que los procesos de aprendizaje dependientes del hipocampo se ven particularmente afectados. El descubrimiento de alteraciones en los mecanismos de LTP (*Long Term Potentiation*) y LTD (*Long Term Depression*), subyacentes a los procesos de memoria y aprendizaje (Kleschevnikov et al., 2004), podría ayudar a entender mejor las causas de los déficits cognitivos y a la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas para dichas disfunciones.

Se ha sugerido que el retraso mental se debe, principalmente, a alteraciones en la neurogénesis, la diferenciación neuronal, la mielinización, la dendritogénesis y la sinaptogénesis durante el desarrollo (Becker et al., 1991; Coyle et al., 1986). Así, la investigación en los primeros estadios es fundamental para determinar el origen de estas anomalías y seguir su evolución durante el desarrollo del cerebro. Algunos trabajos ponen de manifiesto que la principal causa de la alteración en la plasticidad sináptica del SD son cambios en la estructura física de las dendritas (Cramer and Galdzicki, 2012; Martinez de Lagran et al., 2012). El desarrollo cortical parece ser normal hasta la semana 22 de gestación en la especie humana; sin embargo, en la semana 40 aparece una menor laminación, además de una menor densidad celular en el córtex visual y una mayor densidad en el neocórtex superior temporal (Becker et al., 1991; Golden and Hyman, 1994).

FENOTIPOS DE TIPO NEUROLÓGICO Y CONDUCTUAL	REFERENCIAS
Desarrollo más temprano de las alteraciones neuropatológicas asociadas con la enfermedad de Alzheimer	(Dalton and Crapper-McLachlan, 1986)
Menor número y densidad neuronales, diferenciación neuronal y sinaptogénesis anormales, retraso en la mielinización	(Becker, 1991; Coyle et al., 1986; Vuksic et al., 2002)
Alteraciones en morfología, número y densidad de las dendritas, las sinapsis y las espinas dendríticas	(Becker, 1991)
Alteración en la formación de capas corticales	(Golden and Hyman, 1994)
Hipoplasia del hipocampo y del córtex, mayor giro parahipocámpico	(Teipel et al., 2003)
Reducción en el tamaño cerebelar y el volumen de los lóbulos VI-VIII	(Aylward et al., 1997)
Degeneración de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal	(Corsi and Coyle, 1991)

Alteraciones en los neurotransmisores	(Schneider et al., 1997)
Alteraciones funcionales en córtex prefrontal y cerebelo	(Nadel, 2003)
Deficiencia en producción del lenguaje, en el habla y articulación	(Chapman et al., 1998)
Bajo coeficiente intelectual (CI) y déficits cognitivos	(Nadel, 2003)
Déficits en memoria a corto y largo plazo	(Brown et al., 2003; Clark and Wilson, 2003)

Tabla 2. Fenotipos de tipo neurológico y conductual en individuos con SD. Tabla modificada de (Rachidi and Lopes, 2007).

1.1.4. Origen de la trisomía 21

La trisomía 21 puede ser de varios tipos, dependiendo del origen citogenético (ver revisión (Rachidi and Lopes, 2008)):

- Trisomía completa o simple (95 % de los casos), que consiste en la existencia de una copia extra del cromosoma 21 completo. La causa más frecuente de este tipo de trisomía es una no-disyunción meiótica, que puede ser de origen materno (en un 93 % de los casos) o paterno, pero también puede ocurrir la no-disyunción en las primeras divisiones embrionarias y dar lugar a un mosaicismo (1,5 % de los casos), en el que un porcentaje variable de células del individuo será aneuploide y el resto euploide.
- Trisomía parcial, debida a translocaciones (3,5 % de los casos). Éstas pueden ser robertsonianas, que ocurren cuando se produce una fusión de los brazos largos o bien de los brazos cortos a nivel del centrómero entre dos cromosomas acrocéntricos, o recíprocas, cuando se produce un intercambio de material cromosómico entre el cromosoma 21 y cualquier otro cromosoma.
- Microtrisomías, donde pequeñas partes del cromosoma 21 se encuentran triplicadas. La región triplicada se encuentra entre 3 y 5 Mb. La incidencia de estas trisomías se desconoce hasta el momento.

Se conoce que el origen de la trisomía del cromosoma 21 ocurre, principalmente, como consecuencia de una no-disyunción durante la ovogénesis, originándose en un 77 % de los casos, en la meiosis I y un 23 % en la meiosis II. En este punto se ha demostrado una relación clara entre la edad materna y el proceso de no-disyunción meiótica, aunque las causas son desconocidas hasta el momento. El riesgo de tener un hijo con SD aumenta de forma lineal

hasta los 38 años de edad de la madre y, a partir de esta edad, el riesgo aumenta de manera exponencial ([Hook, 1983](#)).

1.1.5. Correlación genotipo-fenotipo

Actualmente, existen dos hipótesis que tratan de explicar los efectos causados por la presencia de un cromosoma 21 extra en los distintos fenotipos del SD. La primera de ellas, “la hipótesis de la dosis génica”, cada vez más respaldada, es considerada por muchos como la hipótesis central. Consiste en explicar el fenotipo de SD como el efecto causado por la sobreexpresión de determinados genes presentes en el cromosoma 21. La segunda, la “amplificación de la inestabilidad del desarrollo”, aboga más bien por un efecto inespecífico mediado por un desequilibrio cromosómico en la homeostasis genética ([Shapiro, 1999](#)).

Tomando como cierta la hipótesis de la dosis génica, el fenotipo SD vendría causado por una dosis excesiva, tanto de genes como de secuencias no codificadoras (microRNAs, secuencias reguladoras, etc.) contenidos en el cromosoma 21. A esto habría que añadir los efectos epistáticos causados sobre otros productos genómicos localizados en otros cromosomas, con su correspondiente efecto de composición alélica (ver revisión ([Antonarakis et al., 2004](#))).

1.1.6. Región Crítica del síndrome de Down (DSCR)

La secuencia del cromosoma 21 humano fue publicada en mayo de 2000 ([Hattori et al., 2000](#)). Es el cromosoma más pequeño de todos y representa, aproximadamente, el 1,5 % del genoma humano. De los 225 genes que conforman el cromosoma 21, el 35 % tienen una homología en *Drosophila melanogaster* y en *Caenorhabditis elegans* y el 17 % en *Saccharomyces cerevisiae*. Caracterizar la expresión espacial y temporal de los genes implicados en la trisomía 21 podría suponer un gran avance en el conocimiento de cómo el aumento de dosis génica está implicado en los fenotipos del SD. Desde que Lejeune descubrió la copia extra del cromosoma 21 ([Lejeune et al., 1959](#)), se pensó que la existencia de tres copias de un gen conllevaría una sobreexpresión 1,5 veces mayor. Sin embargo, esto no es del todo cierto, ya que en estudios realizados en modelos animales trisómicos, se ha observado que muchos genes se sobreexpresan en menor proporción de 1,5 veces y que una pequeña cantidad lo hace en mayor proporción. De esta manera, los principales objetivos que se plantean son: conocer qué genes del cromosoma 21

están implicados en la deficiencia intelectual del SD y entender la variabilidad fenotípica entre los individuos con SD.

Se pudo acotar, así, una región de 33 genes, con una extensión de 5,4 Mb. Dicha región se denominó “Región Crítica del síndrome de Down” (DSCR, *Down syndrome Critical Region*), dado que su repetición era suficiente para causar los fenotipos presentes en pacientes con dicho síndrome (Delabar et al., 1993). Posteriormente, esta región se redujo a 1,2 Mb y 10 genes que, en monosomía, causan microcefalia y retraso mental (Matsumoto et al., 1997). La asignación de DSCR ha sido motivo de controversia, ya que existen individuos con trisomía parcial de regiones no incluidas en dicha región que presentan algunos de los fenotipos SD (Barlow et al., 2001). Además, se ha descrito que el modelo murino trisómico Ts1Rhr, para la región DSCR, no presenta las mismas alteraciones en hipocampo que las observadas en SD o en el modelo trisómico Ts65Dn (Olson et al., 2007). En estudios en los que se ha realizado un análisis de la expresión manteniendo la individualidad de las muestras, se observa que la mayoría de los genes presenta variabilidad interindividual, tanto en las muestras trisómicas como en las euploides (Sultan et al., 2007). Estos resultados han permitido establecer distintas categorías de genes:

- Genes con niveles de sobreexpresión significativos respecto a los euploides y poca variabilidad en su expresión. Se postula que son buenos candidatos para los rasgos comunes presentes en SD.
- Genes que presenten cierto solapamiento en sus niveles de expresión con los euploides. Estos genes serían los responsables de aquellos fenotipos variables presentes en SD.
- Genes con niveles de expresión indistinguibles de los de los genes euploides. Estos tendrían un efecto modulador en el fenotipo SD.

Esta variabilidad de la expresión de los genes, tanto en los ratones trisómicos como en los individuos con SD, se vería explicada, en gran medida, por la composición alélica diferencial entre individuos. Se sugiere que la aparición de los distintos fenotipos presentes en SD sería consecuencia de sobrepasar un determinado umbral en la expresión de genes localizados en el cromosoma 21 humano. Como resultado, existirían determinadas combinaciones alélicas que sobrepasarían ese umbral y, por lo tanto, darían lugar a la aparición de un determinado fenotipo y otras combinaciones que, al no sobrepasar ese umbral, tendrían un efecto silencioso sobre el mismo fenotipo (ver revisión (Antonarakis et al., 2004)).

Algunos de los genes localizados en la DSCR que ayudan a explicar las alteraciones del sistema nervioso central presentes en SD son: *App*, que codifica la proteína precursora del β -amiloide, involucrada en la formación de placas seniles presentes en individuos con SD y enfermedad de Alzheimer, *Sod1*, que codifica una superóxido dismutasa, enzima clave en el metabolismo de los radicales libres de oxígeno, involucrada en procesos de estrés oxidativo, *Ets-2*, protooncogén que codifica un factor de transcripción crucial en el proceso de la osteogénesis, *DSCR1/RCAN1*, que codifica la proteína inhibidora de la calcineurina, implicada en la vía de transducción mediada por NFATc, *Dyrk1A*, del que más adelante se hablará con detalle, que codifica una proteína quinasa. Entre sus sustratos se encuentran importantes factores de transcripción. Estudios realizados tanto en modelos murinos transgénicos como en mutantes de pérdida de función en distintas especies, sugieren un importante papel de *Dyrk1A* en la fisiología del SNC.

Esquema 1. Influencia de la composición alélica en la aparición de fenotipos SD. Esquema modificado de (Antonarakis et al., 2004).

1.2. Modelos murinos y celulares de SD

La existencia de diversos problemas éticos y prácticos para trabajar con tejido humano, impide llevar a cabo estudios neuropatológicos en las primeras etapas de vida. Por este motivo, el

avance en el conocimiento sobre el SD ha sido posible gracias a la generación de modelos animales y celulares, que nos permiten la accesibilidad a todos los tejidos en diferentes estados del embrión y la manipulación genética. Uno de los organismos que se ha utilizado de forma extensiva en experimentación ha sido el ratón, el cual comparte un 99 % de sus genes con el ser humano. En estudios de genómica comparativa se ha puesto de manifiesto la sintenia entre el cromosoma 21 humano (HSA21) y el 16 murino (MMU16) en un 80 %, mientras que el 20% restante era sinténico con los cromosomas MMU10 y MMU17 (ver revisión ([Dierssen et al., 2001](#))). La manipulación genética en modelos murinos va encaminada a la sobreexpresión génica, en un esfuerzo por entender la contribución de un gen único, grupos de genes o segmentos genómicos a la patología provocada por la trisomía del HSA21. Hoy en día, existen 4 categorías de modelos murinos para el estudio del SD:

- Modelos trisómicos, completos o parciales, del MMU16 (Ts16, Ts65Dn, Ts1Cje, Ms1Ts65 y Ts1Rhr).
- Modelos transcromosómicos, que contienen total o parcialmente el HSA21 (Tc1).
- Modelos de sobreexpresión YAC/BAC/PAC, que contienen varios genes del HSA21.
- Modelos de sobreexpresión de gen único.

Esquema 2. Representación de los genes presentes en el HSA21 ortólogos en los cromosomas murinos (MMU 16, 17, 10) y de los modelos murinos trisómicos. Esquema extraído de (Antonarakis et al., 2004).

1.2.1. Modelos trisómicos (MMU16)

El ratón con trisomía Ts16 fue generado por una translocación robertsoniana espontánea (Gropp, 1975). Posee tres copias completas del MMU16, homólogas de la mayor parte del HSA21. La principal limitación de este modelo es su letalidad embrionaria, ya que los ratones mueren durante la gestación, hecho que impide estudiar rasgos típicos de estadios postnatales, como el retraso mental o, en estadios más avanzados, la neuropatología asociada a la enfermedad de Alzheimer. Así, los estudios con estos ratones quedan limitados a estados fetales y al desarrollo de líneas celulares, que detallaremos más adelante. Las investigaciones con este

modelo han proporcionado datos sobre alteraciones que aparecen durante el desarrollo prenatal, como malformaciones cardíacas, oculares y craneofaciales, además de alteraciones en la morfogénesis cerebral (neocórtex, cerebelo e hipocampo), características de los individuos con SD (Haydar et al., 1996).

El ratón Ts65Dn, considerado como el modelo de SD por antonomasia, fue generado por una translocación recíproca entre los cromosomas MMU16 y MMU17, tras ser irradiados los testículos de ratones control (Davisson et al., 1990), y es trisómico para la mayoría de los genes conservados en el extremo distal del MMU16. Sin embargo, este modelo es también trisómico en una parte del MMU17, lo que conlleva la presencia de tres copias de 19 genes no homólogos del HSA21, que pueden interferir en el fenotipo de este ratón y conducir a interpretaciones erróneas de los resultados. Sin embargo, la reproducibilidad de los fenotipos obtenidos por distintos grupos ha demostrado la validez del modelo. Estos ratones presentan ciertas alteraciones similares a las presentes en los individuos con SD, como son la infertilidad exclusiva de los machos, un retraso en el desarrollo, la aparición de rasgos dismórficos y alteraciones en el Sistema Nervioso Central (Richtsmeier et al., 2000). Asimismo, existen alteraciones en el córtex, donde se ha descrito una reducción en la densidad sináptica (Kurt et al., 2000). Recientemente se ha demostrado que el tratamiento crónico con fluoxetina mejora la memoria espacial y la plasticidad sináptica en el hipocampo de este modelo murino adulto (Begenisic et al., 2014), así como durante su desarrollo embrionario (Guidi et al., 2014).

Además se han generado otros modelos de ratón, como el Ts1Cje (Sago et al., 1998), que contiene 86 genes del cromosoma 16 en trisomía, y que presenta un fenotipo similar al observado en el modelo Ts65Dn, permitiendo acotar la región de los genes responsables de estas alteraciones. Se han detectado alteraciones dendríticas en el hipocampo de estos ratones, debido a la hiperactivación de la ruta Akt-mTOR (Troca-Marin et al., 2011; Troca-Marin et al., 2014). También se ha descrito en este modelo una disfunción mitocondrial en el cerebro y una hiperfosforilación de tau (Shukkur et al., 2006). El modelo Ms1Ts65 (obtenido mediante cruces entre el monosómico Ms1Cje y el trisómico Ts65Dn) (Sago et al., 2000) posee menos similitudes con el fenotipo de los otros modelos trisómicos, aunque se han detectado alteraciones a nivel cerebelar, con una reducción en la densidad de las células granulares (Olson et al., 2004). Por último, en el modelo Ts1Rhr, trisómico parcial para la región DSCR (Olson et al., 2007), se han descrito alteraciones en el volumen cerebelar, al igual que en los otros modelos de ratones trisómicos citados (Aldridge et al., 2007).

1.2.2. Modelos transcromosómicos

Estos modelos murinos permiten la sobreexpresión de parte de los genes del HSA21 que se encuentran localizados en MMU10 y MMU17. El modelo Tc1 permite reproducir alteraciones relacionadas con el SD, como la cardiopatía congénita o déficits de memoria y aprendizaje, pero tienen el inconveniente de presentar un elevado mosaicismo, de manera que solo un tercio de las neuronas tienen el cromosoma extra (O'Doherty et al., 2005).

1.2.3. Modelos transgénicos de YACs, BACs y PACs

Estos modelos se generaron a partir de cromosomas artificiales de levadura (YAC, *Yeast Artificial Chromosome*), de bacteria (BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*) y del bacteriófago P1 (PAC, *P1 bacteriophage Artificial Chromosome*) y contienen distintos fragmentos cromosómicos de un tamaño aproximadamente de 2 Mb del HSA21 (Smith et al., 1997). Entre los distintos modelos generados, cabe destacar el modelo transgénico YAC152F7tel, que contiene varios genes en transgénesis (entre ellos el gen *Dyrk1A*) y presenta alteraciones tales como hiperactividad durante el desarrollo, déficits en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje y un mayor volumen cerebelar (Branchi et al., 2004).

1.2.4. Modelos transgénicos de sobreexpresión de gen único

Existe una gran variedad de modelos de ratón transgénico con ganancia de función para genes del HSA21 (Vacano et al., 2012). El estudio de estos ratones transgénicos ofrece la ventaja de poder analizar las implicaciones bioquímicas y fenotípicas de la sobreexpresión de los genes de manera individual.

1.2.4.1. Modelo TgDyrk1A

Este modelo presenta el cDNA sobreexpresado de *Dyrk1A* humano, bajo el control del promotor heterólogo de la metalotioneína Ia bovina (*sMT-Ia*) (Altafaj et al., 2001).

Esquema 3. Construcción desarrollada para la generación de los ratones TgDyrk1A.

Se establecieron distintas líneas transgénicas de ratones y se observó una expresión generalizada del transgén en todos aquellos tejidos estudiados (corazón, cerebro, hígado, etc.). En un estudio más detallado de la sobreexpresión de DYRK1A en el SNC, la proteína mostró patrones de localización y de expresión similares a los animales control. Sin embargo, se detectó la sobreexpresión de la proteína en áreas motoras, tanto del romboencéfalo (corteza cerebelar, núcleos profundos cerebelares o múltiples núcleos motores de la médula y del puente) como del mesencéfalo (diversos núcleos motores, como el trigémino o el oculomotor).

Los análisis de comportamiento realizados en el modelo TgDyrk1A (Martinez de Lagran et al., 2004), revelaron:

- Alteraciones en el neurodesarrollo: retraso de la adquisición de una actividad locomotora madura.
- Alteraciones en la coordinación motora, tanto en etapas del neurodesarrollo como adultas.
- Hiperactividad.
- Alteraciones en el aprendizaje motor y en el comportamiento locomotor.
- Alteraciones en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, en concreto en la memoria de referencia.

Estas alteraciones pueden relacionarse con una disfunción de distintas estructuras cerebrales, como las relacionadas con distintos procesos motores (cerebelo, núcleo estriado o corteza motora), las relacionadas con inhibición de la conducta espontánea (corteza prefrontal) o con alteraciones de memoria y aprendizaje (hipocampo). Por otra parte, la inyección en el estriado de ratones adultos de un virus adeno-asociado (AVVshDyrk1A, que contiene una secuencia que inhibe *Dyrk1A*), normaliza los niveles de expresión de DYRK1A, restaurando así la hiperactividad y las alteraciones motoras del animal (Ortiz-Abalia et al., 2008).

Además, existe un modelo murino de sobreexpresión única de *Dyrk1A*, el cual presenta en trisomía el gen *Dyrk1A* humano completo clonado en un BAC. En este modelo se han descrito alteraciones en LTP y LTD, procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje (Ahn et al., 2006), y por otro lado, se ha descrito en los cerebros de dichos animales, la hiperfosforilación de la proteína tau (Liu et al., 2008; Ryoo et al., 2007; Wegiel et al., 2008) y la fosforilación de APP en el residuo Thr668 mediada por DYRK1A (Ryoo et al., 2008). Estos resultados implican a esta quinasa en los procesos neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer, también presentes en los individuos con SD.

Junto a los modelos TgDyrk1A y BAC podemos destacar, por último, la existencia de un modelo de haploinsuficiencia de *Dyrk1A*, que se generó sustituyendo por recombinación homóloga un fragmento genómico de 3,2 Kb (que contiene los exones 7 y 8 del gen) por un gen resistente a neomicina (Fotaki et al., 2002). Los ratones heterocigóticos para *Dyrk1A* (*Dyrk1A*^{+/-}) presentan un cerebro de menor tamaño, un retraso significativo en el desarrollo de algunos reflejos y una marcada hipoactividad (Fotaki et al., 2004). Además, la letalidad embrionaria de los ratones *knockout* (*Dyrk1A*^{-/-}), ya que mueren a E10,5, indica el papel fundamental de *Dyrk1A* durante la embriogénesis.

1.2.5. Modelos celulares de SD

Como se ha mencionado previamente, el estudio con el modelo de SD Ts16 se limita a la etapa prenatal, ya que los animales mueren a los 18 días de gestación. Sin embargo, se dispone de líneas celulares inmortalizadas procedentes de estos ratones, que nos ayudan a conocer mejor los mecanismos implicados en la patogénesis del SD. Estas líneas celulares han sido desarrolladas en el laboratorio del Dr. Pablo Caviedes, del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile, están patentadas y se comercializan a través de un acuerdo con la Universidad del Sur de Florida. El establecimiento de las líneas celulares inmortalizadas es una excelente herramienta para mantener *in vitro* la condición trisómica de una manera indefinida.

Dichas líneas se establecieron mediante un sistema de transformación, mediado por factores solubles presentes en un medio de cultivo condicionado por células tumorales de tiroides de rata UCHT1 (Caviedes and Stanbury, 1976), que inducen transformación celular estable *in vitro*, conservando las características de diferenciación del tejido de origen. El laboratorio del Dr. Pablo Caviedes ha inmortalizado las células de diferentes partes del sistema nervioso central,

como son corteza, hipocampo, médula espinal o ganglios de la raíz dorsal, mediante este procedimiento original. Todas estas células poseen marcadores específicos de células neurales, como son NSE (enolasa específica neuronal), ChAT (colina acetiltransferasa), SYP (sinaptofisina), MAP-2 (proteína asociada a microtúbulos-2) y carecen de marcadores gliales típicos, como GFAP (proteína ácida fibrilar de la glía) o galactocerebrósido (Saud et al., 2006).

En estudios realizados con estas líneas se ha demostrado que expresan receptores funcionales de neurotransmisores. Además, en las líneas celulares trisómicas se han observado alteraciones en las propiedades eléctricas de la membrana y fallos en el sistema de neurotransmisores. Estos defectos son debidos, probablemente, a la sobreexpresión de determinados genes, algunos de los cuales pueden afectar a la composición de membrana o a la función de determinados receptores (Caviedes et al., 1990a). De hecho, utilizando cultivos primarios de neuronas de ratones Ts16, se ha observado una disminución en la captación de colina mediante el transportador de alta afinidad de colina (CHT), además de un descenso en la liberación de acetilcolina cuando tiene lugar una despolarización (Allen et al., 2000). Asimismo, la línea celular trisómica (CTb) presenta un aumento de calcio basal intracelular y respuestas alteradas tras la estimulación de receptores de glutamato, posiblemente como consecuencia de una alteración en los mecanismos reguladores de calcio citosólico (Cardenas et al., 1999).

Para la realización de esta Tesis Doctoral se dispuso de dos líneas celulares: una derivada de corteza cerebral de ratones de tipo silvestre (CNh) y otra derivada de corteza cerebral de fetos de ratones con trisomía 16 (CTb).

1.3. DYRK1A

El gen *Dyrk1A* (*Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1 A*) se localiza en la región cromosómica q22.13 del HSA21, en la región DCSR. Su secuencia, de 147,8 Kb de DNA genómico, contiene 17 exones que codifican un transcrito mayoritario que da lugar a una proteína de 763 aminoácidos, con una masa molecular en torno a 90 kDa (Guimera et al., 1999). Se han descrito diversos transcritos como resultado del *splicing* alternativo de dicho gen, aunque no existen diferencias funcionales asociadas a ninguna de estas variantes (ver revisión (Aranda et al., 2011)).

1.3.1. Familia de proteínas DYRK

DYRK1A es una proteína quinasa que pertenece a la familia de proteínas DYRK, cuya homología del dominio quinasa permite dividirla en tres subfamilias: DYRK, HIPKs (*homeodomain-interacting protein kinases*) y PRP4s (*pre-mRNA processing protein 4 kinases*) (ver revisión (Aranda et al., 2011)). La familia de proteínas DYRK, evolutivamente muy conservada, se caracteriza por su especificidad dual, es decir, pueden fosforilar tanto a sus sustratos en residuos de serina o treonina (Ser/Thr), como autofosforilarse en residuos de tirosina (Tyr), serina o treonina (Ser/Thr) (Aranda et al., 2011; Becker and Joost, 1999; Himpel et al., 2000). La familia de proteínas DYRK pertenecen a su vez al grupo de quinasas CMGC: CDKs (*cyclin-dependent kinases*), MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), GSKs (*glycogen synthase kinases*) y CLK (CDK-like kinases) (Manning et al., 2002).

Esquema 4: A) Divergencia evolutiva de las distintas familias pertenecientes al grupo CMGC. B) Árbol filogenético con las tres subfamilias de DYRK. Esquema modificado de (Aranda et al., 2011).

Al menos 5 miembros de la familia DYRK han sido identificados en mamíferos (ver revisión (Aranda et al., 2011)): DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3 y DYRK4. Todos ellos comparten un motivo conservado cerca del dominio quinasa, que se conoce como “DYRK homology (DH)-box”.

1.3.2. Estructura y mecanismo de activación de DYRK1A

El dominio quinasa se localiza en el centro de la estructura primaria de la proteína y contiene un motivo conservado Tyr-X-Tyr (Tyr-319-Tyr-321) en el dominio de activación (Becker and Joost, 1999). Además, posee una señal de localización nuclear (NLS) dividida en dos partes: una de ellas se localiza en el dominio N-terminal y la otra dentro del dominio quinasa. Consta también de una región de polihistidina, que actúa como una diana de translocación nuclear (Alvarez et al., 2003) y de un motivo PEST. Los dominios PEST son regiones proteicas ricas en residuos de prolina, ácido glutámico, serina y treonina, que se han asociado con el control de la estabilización proteica (Rechsteiner and Rogers, 1996). A la región C-terminal, rica en serinas y treoninas, no se le ha asociado ninguna actividad. La proteína está altamente conservada en humano y ratón, existe un 99 % de homología al alinear ambas secuencias en UniProt (EMBL-EBI, Laboratorio Europeo de Biología Molecular- Instituto Europeo de Bioinformática).

Esquema 5: Estructura de la proteína DYRK1A.

Como se ha mencionado anteriormente, la quinasa DYRK1A fosforila residuos de serina o treonina (Ser/Thr) de sustratos exógenos y requiere para su completa activación la autofosforilación en el residuo Tyr321 y en otros residuos de serina y treonina (Ser/Thr) (Aranda et al., 2011; Becker and Joost, 1999; Himpel et al., 2000). La capacidad de autofosforilación es independiente de otros dominios o de la presencia de cofactores (Gockler et al., 2009) y se pierde cuando la proteína está completamente traducida, pudiendo únicamente, a partir de entonces, fosforilar residuos de serina y treonina (Ser/Thr). Existen bastantes datos que indican que la regulación de *Dyrk1A* debe depender, entre otras cosas, de cambios rápidos en los niveles de mRNA o de proteína. La presencia de secuencias desestabilizadoras (AUUUA) en la región 3'-UTR del mRNA de *Dyrk1A* (Kentrup et al., 1996), así como la región PEST de la proteína (Rechsteiner and Rogers, 1996), apoyan esta hipótesis.

1.3.3. Localización subcelular de DYRK1A

Existen muchos estudios sobre la distribución subcelular de DYRK1A que muestran que se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de las neuronas y las células gliales en el cerebro de ratón adulto (Hammerle et al., 2008; Marti et al., 2003). Sin embargo, en el pollo se ha descrito un cambio de localización de DYRK1A del núcleo al citoplasma durante la diferenciación de las células de Purkinje (Hammerle et al., 2003). Y en el cerebro humano, DYRK1A se localiza en el núcleo y el citoplasma de las neuronas y, en el caso de los astrocitos y las células endoteliales, únicamente en el citoplasma (Wegiel et al., 2004). Estudios de fraccionamiento bioquímico en tejido cerebral murino indican que la proteína DYRK1A citosólica está presente en tres fracciones: una pequeña fracción soluble, otra asociada a la membrana plasmática sináptica y una tercera asociada a vesículas (Aranda et al., 2008; Kaczmarek et al., 2014; Murakami et al., 2009). La existencia de sustratos, citosólicos y nucleares, confirma la doble localización de DYRK1A, sugiriendo la participación del gen en gran variedad de procesos celulares.

1.3.4. Patrón de expresión de DYRK1A

La proteína DYRK1A se expresa de manera generalizada en mamíferos, tanto en tejido embrionario (en diferentes estadios del desarrollo) como en el individuo adulto, con una mayor prevalencia en corazón, pulmón, cerebro y músculo esquelético (Okui et al., 1999). Mediante estudios de hibridación *in situ*, se ha descrito que DYRK1A se expresa de manera ubicua en los estadios embrionarios del cerebro de ratón. Posteriormente, se expresa en regiones concretas, como son bulbo olfatorio, cerebelo, corteza cerebral, la capa de células piramidales del hipocampo y núcleos hipotalámicos en el cerebro adulto (Guimera et al., 1999). Este patrón dinámico de expresión de DYRK1A durante el desarrollo se confirmó con estudios de expresión realizados en pollo (Hammerle et al., 2002) y ratón (Hammerle et al., 2008) en las etapas embrionaria y postnatal.

El cambio en el patrón de expresión de DYRK1A, de ubicuo en el embrión a más restringido en el adulto, conduce a pensar que, durante el neurodesarrollo, el gen *Dyrk1A* puede ejercer un efecto sobre el control de la proliferación y la maduración neuronales (Hammerle et al., 2011; Park et al., 2010; Yabut et al., 2010), mientras que en el adulto puede estar circunscrito a funciones más específicas, como son los procesos relacionados con el aprendizaje y la memoria y/o la función motora (Marti et al., 2003).

1.3.5. Función de DYRK1A

Muchas de las funciones de esta quinasa se conocen al analizar el papel de sus homólogos en otras especies, tales como *Yak1P* (*Saccharomyces cerevisiae*) (Wegiel et al., 2004), *Pomp1* (*Schizosaccharomyces pombe*) (Bahler and Pringle, 1998), *mbk-1* (*Caenorhabditis elegans*) (Raich et al., 2003) y *YakA* (*Dictyostelium discoideum*) (van Es et al., 2001). Al gen *mnb* (minibrain) en *Drosophila melanogaster* (Tejedor et al., 1995) se le ha atribuido un papel clave en la neurogénesis.

El análisis de mutantes, tanto de pérdida como de ganancia de función, ha permitido identificar posibles funciones de DYRK1A. En ratones, la anulación completa de DYRK1A es letal, mientras que la inactivación de un solo alelo presenta un retraso general del desarrollo, acompañado de una reducción en el tamaño del cerebro y una marcada hipoactividad (Fotaki et al., 2002). Además, en este mismo modelo se ha observado un menor tamaño del árbol dendrítico, con una disminución significativa del número de espinas dendríticas (Benavides-Piccione et al., 2005). En humanos, en pacientes con mutaciones en DYRK1A se encontró discapacidad intelectual, así como retraso en el crecimiento y microcefalia (Courcet et al., 2012; Fujita et al., 2010; Moller et al., 2008; van Bon et al., 2011). Estos datos apuntan a un importante papel de DYRK1A en la fisiología del SNC, tanto en etapas de neurodesarrollo como adultas.

1.3.6. DYRK1A en neuropatologías

Como se ha mencionado anteriormente, *Dyrk1A* es uno de los genes localizados en la Región Crítica del síndrome de Down (DSCR) del HSA21, cuya presencia en trisomía se asocia con las alteraciones neuropatológicas presentes en los pacientes con SD (ver tabla X). En el cerebro de estos pacientes, la presencia de una copia extra de *Dyrk1A* permite mantener niveles elevados de mRNA y proteína (Dowjat et al., 2007; Guimera et al., 1999). El fenotipo de los modelos murinos de sobreexpresión de DYRK1A (Ahn et al., 2006; Altafaj et al., 2001), junto con el patrón de expresión durante la neurogénesis (Hammerle et al., 2008; Hammerle et al., 2002) y su presencia en el SNC (Marti et al., 2003; Okui et al., 1999; Wegiel et al., 2004), han permitido proponer a *Dyrk1A* como el gen responsable de la aparición de algunas características de tipo neurológico y conductual en SD (ver revisión (Rachidi and Lopes, 2008)).

Existen datos que demuestran que DYRK1A está involucrado en la enfermedad de Alzheimer. Entre ellos, podemos destacar la aparición precoz de síntomas neuropatológicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer en los pacientes con SD en la cuarta década de vida, aunque se

conocen estudios que describen depósitos de β -amiloide ya en la segunda década (Rumble et al., 1989). También se ha visto una asociación entre *Dyrk1A* y el fenotipo neuropatológico de tipo Alzheimer en la población japonesa, tras la búsqueda de marcadores genéticos del HSA21 (Kimura et al., 2007). Asimismo, el aumento de expresión de DYRK1A se correlaciona con un incremento de la proteína tau fosforilada (Liu et al., 2008; Ryoo et al., 2007; Wegiel et al., 2008; Wegiel et al., 2011). Además, el péptido β -amiloide y su precursora APP presentan niveles elevados en modelos murinos de ganancia de función de DYRK1A (Ryoo et al., 2008). Estos datos están en concordancia con el hecho de que tanto tau como APP son sustratos *in vitro* de DYRK1A.

Finalmente, se ha visto que DYRK1A fosforila proteínas relacionadas con otras enfermedades neurodegenerativas, tales como la huntingtina Hip-1 en la enfermedad de Huntington (Kang et al., 2005) o la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson y la demencia de cuerpos de Lewy (Kim et al., 2006).

1.4. Desarrollo del Sistema Nervioso Central en SD.

El SNC es una entidad anatómica, protegida eficazmente de los traumas externos mediante formaciones óseas, como son el cráneo y la columna vertebral. Está encargado de recibir y transmitir impulsos, coordinando de esta forma las diferentes actividades del organismo. Estas conexiones se establecen durante el desarrollo embrionario y el postnatal. Hace más de un siglo, Santiago Ramón y Cajal emprendió una serie de estudios anatómicos que culminaron con una apreciación más precisa de la estructura y la organización del SNC. Sin embargo, aún hoy existen muchas incógnitas sobre el desarrollo del SNC y los estudios más recientes tratan de descubrir los procesos celulares y moleculares que sirven de base a la formación de los circuitos que ya descubrió Ramón y Cajal .

Cuando el sistema nervioso comienza a desarrollarse, ya se han generado tres capas celulares principales: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo. El sistema nervioso se origina por una modificación y sucesiva evolución del ectodermo del embrión, mediante un proceso conocido como neurulación. La invaginación de la blástula crea la placa neural que, al cerrarse sobre sí misma, formará el tubo neural, que posteriormente dará lugar al encéfalo y a la médula espinal. En la línea donde el tubo neuronal se despliega del ectodermo, un cierto número de células

migran por el exterior del tubo neural. Éstas son las células de la cresta neural, que formarán el sistema nervioso periférico.

El neuroepitelio, es decir, la zona modificada del ectodermo durante el desarrollo, está formado por una sola capa de células, denominadas neuroepiteliales, que cumplen los dos requisitos de células progenitoras o madre: autorrenovación (capacidad de dividirse un número ilimitado de divisiones) y multipotencialidad (capacidad de generar diferentes tipos de células diferenciadas). La estructura que forman las células neuroepiteliales es la de un epitelio pseudoestratificado, en el que, al menos inicialmente, todas las células mantienen contacto tanto con la superficie apical como con la basal. El núcleo de las células migra arriba y abajo en el eje ápico-basal durante el ciclo celular, en el fenómeno conocido como “migración intercinética nuclear”. Además, estas células están altamente polarizadas, debido a una distribución muy organizada en el eje ápico-basal de las proteínas de membrana.

La neurogénesis se inicia con las primeras divisiones celulares simétricas proliferativas, en las que cada célula neuroepitelial genera dos de estos progenitores, expandiendo así el número de células de este tipo. A continuación ocurren muchas divisiones asimétricas, que generan una célula neuroepitelial y una neurona o una célula neuroepitelial y un progenitor neurogénico diferenciado (y sin la capacidad ilimitada de división celular), como la glía radial y los precursores neuronales pequeños (Salehi et al., 2006). La expansión de estos progenitores genera otra capa proliferativa, adyacente a la zona ventricular (ZV), conocida como la zona subventricular (ZSV). Esta zona comienza a generarse en el ratón a partir del día 12,5 del periodo de gestación. En la ZV también se han identificado otros precursores denominados células de la glía radial (RGC). A medida que se estrecha el epitelio cerebral, las células neuroepiteliales se alargan y se convierten en las RGC. Las RGC pueden dar lugar a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos, desde los progenitores intermedios.

La corticogénesis, o desarrollo de la corteza cerebral, dura 8 días en el ratón (desde el día 11,5 hasta el día 19 de la gestación), continuando la expansión del córtex visual durante 60 días. En primates, aparece a los 55 días de gestación (E55) una capa fibrilar externa (OFL) y la ZV se va reduciendo progresivamente desde E65 hasta E72. Mientras tanto, la ZSV aumenta en profundidad y a partir de E72 se divide en dos capas, la capa interna subventricular (ISVZ) y la capa externa subventricular (OSVZ), por la intrusión de una nueva capa fibrilar (IFL) (Dehay and Kennedy, 2007).

Esquema 7: Diferencias entre roedores y primates en la organización anatómica durante el desarrollo de la corteza cerebral. Esquema modificado de (Dehay and Kennedy, 2007).

Estudios histológicos de cerebros de personas con SD han mostrado una formación aberrante de la corteza cerebral, producida en parte por una alteración celular en las capas II y III de la corteza (Golden and Hyman, 1994). Este defecto de corticogénesis observado en personas con trisomía 21 se reproduce en el ratón Ts16, ya que se ha visto un retraso en la formación del córtex entre los días E13 y E16 de gestación (Haydar et al., 1996). A los 13 días de gestación, se ha observado un menor tamaño de los ventrículos en el ratón Ts16 en relación al ratón euploide, aunque el grosor de la corteza es similar. Sin embargo, a los 16 días de gestación se observa un

menor engrosamiento de la corteza en el ratón trisómico, donde la placa cortical (Pc), la subplaca (SP) y la zona intermedia (ZI) están reducidas (ver esquema 8). Este efecto observado en los ratones trisómicos está acompañado de una alteración en la migración neuronal ([Behar and Colton, 2003](#)).

Esquema 8: Fotomicrografías del desarrollo cortical de ratones euploides y trisómicos Ts16. A) 13 días de gestación. B) 16 días de gestación. Esquema modificado de ([Haydar et al., 1996](#)).

La regulación de la corticogénesis y del modelado de la corteza cerebral está aparentemente controlada por las moléculas señalizadoras BMPs (*bone morphogenetic proteins*), Wnts (proviene de la combinación *int* y *Wg*), Shh (*sonic hedgehog*) y FGFs (*fibroblast growth factors*), entre otras. Estas moléculas actúan en las zonas proliferativas neurogénicas, generando factores para el correcto posicionamiento celular de la corteza ([Dehay and Kennedy, 2007](#)). Además, *Dyrk1A* actúa como inhibidor de la degradación de EGFR (*epidermal growth factor receptor*) durante la división asimétrica de las células madre neurales ([Ferron et al., 2010](#)), proponiendo a esta quinasa como diana terapéutica en el estudio molecular de glioblastomas dependientes de EGFR, receptor responsable del inicio y crecimiento del tumor ([Pozo et al., 2013](#)).

Algunos autores proponen que las anomalías observadas en el SD se deben a la disfunción de determinados sustratos que dirigen la migración neuronal, tales como el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Esta neurotrofina no ejerce su efecto en modelos trisómicos Ts16 debido a la desregulación de su receptor TrkB (Dorsey et al., 2002). Además, otros autores relatan la existencia de un *feedback* positivo glutamatérgico en el modelo murino Ts1Cje, que contribuye a la sobreproducción de BDNF (Troca-Marin et al., 2011) y, como consecuencia, a alteraciones en la plasticidad sináptica de las dendritas de las neuronas del hipocampo.

1.4.1. Implicación de DYRK1A en el neurodesarrollo

En 1995 se describió el papel que el gen *mnb* (minibrain), homólogo de DYRK1A en *Drosophila melanogaster*, juega en la neurogénesis postembrionaria. El gen *mnb* regula el número de células que se generan en el desarrollo de los diferentes tipos neuronales. Las moscas mutantes para *mnb* se caracterizan por una marcada reducción del tamaño de los lóbulos ópticos y de los hemisferios cerebrales centrales (Tejedor et al., 1995). Esta reducción resulta de una disminución en el número de células generadas durante los procesos de proliferación que ocurren en el desarrollo postembrionario. La descripción del patrón de expresión durante el desarrollo de *mnb* refuerza su papel en la regulación de la proliferación de los progenitores neurales. *Mnb* se expresa durante el desarrollo del pollo en células proliferativas en las tres zonas neurogénicas del cerebro fetal: tubo neural, placa neural y placodas craneales y su expresión siempre precede a las oleadas de neurogénesis. Además, se encontró que la distribución del mRNA de *Dyrk1A* durante la división celular de las células neuroepiteliales estaba polarizada, de manera que la expresión de *Dyrk1A* marcaría el cambio entre la fase de proliferación y la de diferenciación neural (Hammerle et al., 2002; Tejedor and Hammerle, 2011). Esta misma regulación espacio-temporal de la expresión de *Dyrk1A* sucede en el desarrollo del SNC en el embrión de ratón, donde además la expresión de *Dyrk1A* pasa de ser transicional en los progenitores tempranos a ser constitutiva ya en las neuronas maduras (Hammerle et al., 2008). De hecho, la sobreexpresión puntual de DYRK1A en progenitores neurales de córtex embrionario, tanto de pollo como de ratón, conducen a una parada en la proliferación y a una diferenciación temprana de los mismos (Hammerle et al., 2011; Park et al., 2010; Yabut et al., 2010), así como a una incorrecta laminación del neocórtex (Kurabayashi and Sanada, 2013). Además, la sobreexpresión de *Dyrk1A* reduce la expresión de REST/NRSF (*neuron restrictive silencing factor*), regulador clave durante el desarrollo embrionario (Canzonetta et al., 2008). Todos estos indicios

conducen a pensar que es necesaria una correcta expresión de *Dyrk1A* durante el desarrollo de los progenitores neurales, para que se produzca un número correcto de progenie diferenciada.

Esquema 9: Implicación de *Dyrk1A* en el desarrollo de la corteza cerebral en cerebros de ratones euploides (a) y trisómicos (b). Esquema modificado de (Dierssen, 2012).

Durante el desarrollo cerebral de mamíferos, se origina un número adecuado de neuronas que migran a su correspondiente destino. DYRK1A está fuertemente implicado en la proliferación celular en la zona ventricular (ZV) y se expresa de forma transitoria (fase DYRK1A ON) en los precursores neurales localizados en la zona subventricular (ZSV), dando lugar a progenitores neurales o directamente a neuronas (ver revisión (Tejedor and Hammerle, 2011)). La expresión de DYRK1A, provocada presumiblemente por estímulos neurogénicos, aumenta la

expresión de p27, promoviendo la salida del ciclo celular y facilitando la generación de nuevas neuronas. La posterior disminución de los niveles de DYRK1A (fase DYRK1A OFF) permite a las neuronas diferenciarse (Hammerle et al., 2011). Sin embargo, en diversos estudios realizados en cerebro de fetos con SD y en el modelo murino Ts65Dn se muestra una diferenciación prematura de nuevas neuronas, lo que genera un menor número de neuronas y una maduración reducida de las capas corticales. La sobreexpresión de DYRK1A en ratones de tipo silvestre, inducida por electroporación (Yabut et al., 2010), inhibe la proliferación e induce una diferenciación neuronal precoz. Estos mecanismos pueden perturbar el proceso de corticogénesis en SD (ver revisión (Tejedor and Hammerle, 2011)).

1.5. El ácido oleico en el Sistema Nervioso Central

1.5.2.1. Características generales

El ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) o ácido *cis*-9-octadecenoico según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), es un ácido graso formado por 18 átomos de carbono y un doble enlace en disposición *cis* en el carbono 9 (18:1, Δ^9). Es soluble en metanol y disolventes orgánicos pero no lo es en agua ni en disoluciones acuosas por sí solo. Es uno de los ácidos grasos monoinsaturados con una mayor presencia en la naturaleza. El doble enlace en esta disposición es suficiente para incrementar de forma considerable la fluidez de las membranas biológicas.

1.5.2.2. Biosíntesis y localización

La síntesis de ácido oleico es inducida en los astrocitos por la albúmina, que está presente en el cerebro en condiciones fisiológicas exclusivamente durante el desarrollo (Tabernero et al., 2002b). Se ha demostrado en astrocitos que la albúmina aumenta la síntesis de ácido oleico a partir de lactato, glucosa y 3-hidroxibutirato, de una forma dosis-dependiente (Tabernero et al., 2001).

Esquema 10: Mecanismo de síntesis del ácido oleico en astrocitos.

La primera reacción de la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el citosol, es dependiente de ATP y está catalizada por la acetil-CoA carboxilasa, enzima con una alta actividad durante el periodo neonatal temprano. A continuación, mediante una serie de condensaciones y reducciones, el complejo multienzimático ácido graso sintasa (AGS) cataliza la síntesis de una molécula de ácido palmítico (palmitoil-CoA) a partir de una molécula de acetil-CoA y siete de malonil-CoA, con gasto de 14 NADPH(H⁺). El complejo AGS es un complejo multienzimático que cataliza reacciones comunes a todos los organismos y presenta una organización variable. En el retículo endoplasmático se cataliza la elongación del ácido palmítico para formar estearil-CoA, de 18 átomos de carbono. El palmitil-CoA y el estearil-CoA sirven como precursores de los dos ácidos grasos monoinsaturados más comunes: ácido oleico (18:1, cΔ9) y ácido palmitoleico (16:1, cΔ9). El doble enlace en *cis* se introduce por la estearil-CoA desaturasa (SCD-

1 o Δ^9 -desaturasa) que es la enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados (Tabernero et al., 1993).

El ácido oleico sintetizado en los astrocitos depende de la actividad de SCD-1, cuya expresión está regulada por el factor de expresión SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*) y cuya activación se produce cuando la albúmina capta el propio ácido oleico recién sintetizado (Tabernero et al., 1993; Velasco et al., 2003). Así, el complejo albúmina-ácido oleico se libera al espacio extracelular y queda disponible como sustrato para la neurona (Tabernero et al., 2002b). De este modo, este ácido graso induce la diferenciación de neuronas en cultivo primario.

El ácido oleico forma parte de los fosfolípidos de la membrana neuronal, en forma de fosfatidilcolina, fundamentalmente. Se incorpora preferentemente en las bases de las prolongaciones somáticas neuronales, denominadas neuritas, lo que sugiere que éstas requieren un incremento en la fluidez de la membrana en los sitios donde emergen nuevos axones y/o dendritas.

El ácido retinoico y los ácidos grasos de cadena larga, así como algunos de sus metabolitos, pueden actuar regulando la expresión de determinados genes, mediante varios tipos de receptores nucleares, de los cuales los PPARs ("receptores activados por proliferadores de peroxisomas") son los mejor caracterizados (Muoio et al., 2002; Tan et al., 2002). Estos receptores tienen como ligandos endógenos los ácidos grasos, con una mayor afinidad por los de cadena larga no saturados que por los saturados (Gottlicher et al., 1992; Hostetler et al., 2005; Kliewer et al., 1997). Nuestro grupo de investigación demostró que el ácido oleico requiere del PPAR α para ejercer su efecto neurotrófico y que el ácido oleico induce la translocación al núcleo del PPAR α (Bento-Abreu et al., 2007).

1.5.2.3. Efecto axonogénico durante la diferenciación neuronal

El ácido oleico es capaz de promover *in vitro* patrones similares a los observados *in vivo* en la diferenciación neuronal. En este sentido, se observó que el ácido oleico se incorporaba en la base del cono de crecimiento de los axones, promoviendo la agrupación de los somas neuronales, el alargamiento de los axones y el crecimiento de las neuritas (Medina and Tabernero, 2002; Tabernero et al., 2001).

Esquema 11: Efecto axonogénico en neuronas, promovido por el complejo albúmina-ácido oleico generado por los astrocitos.

La presencia de ácido oleico formando un complejo con albúmina produce un incremento de las proteínas marcadoras de diferenciación neuronal, MAP-2 y GAP-43, acompañado también de un aumento en la expresión de sus mRNAs (Bento-Abreu et al., 2007; Rodríguez-Rodríguez et al., 2004; Tabernero et al., 2001). Por otra parte, el complejo albúmina-ácido oleico es posible que tenga beneficios farmacológicos, ya que el tratamiento con este complejo mejora significativamente los daños provocados tras una lesión medular (Avila-Martin et al., 2011), inhibiendo la proliferación de la microglía y estimulando la innervación serotoninérgica.

Recientemente se ha descrito que la albúmina está presente en la zona subventricular (ZSV) y en el parénquima cerebral circundante durante el primer día de vida postnatal, disminuyendo a partir del día tercero. Conjuntamente con este hecho, la albúmina induce la axonogénesis en el estriado, produciendo un aumento significativo de la expresión de GAP-43, así como del grosor de los fascículos axonales. Este fenómeno depende de la actividad de SCD-1 y, todo ello en su conjunto, parece indicar que es el ácido oleico sintetizado en la ZSV, en respuesta a la presencia de albúmina, el que controla la maduración neuronal en el estriado durante la etapa perinatal del desarrollo cerebral (Polo-Hernandez et al., 2010). Por último, se ha descrito la presencia de niveles menores de ácido oleico en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Cunnane et al., 2012).

1.5.2.4. Proteínas transportadoras de ácidos grasos: la albúmina

La albúmina es la proteína más abundante del suero y representa cerca del 60 % del total de las proteínas plasmáticas. Su vida media en circulación es de 20 días y su concentración se sitúa en torno a 0,6 mmol/L. Tiene una masa molecular de 65-67 KDa. Está formada por 585 aminoácidos, no posee restos glucídicos y tiene carga negativa neta en el plasma sanguíneo (a pH 7,4).

La albúmina se sintetiza en el hígado como pre-proalbúmina, sufre dos cortes consecutivos, en el retículo endoplasmático y en el Golgi, y se secreta directamente a la circulación. La síntesis de albúmina está regulada por su propia concentración plasmática y, además, por la ingesta de alimentos (Gekle, 2005).

1.5.2.4.1. Estructura y unión a ácidos grasos

La estructura primaria de la albúmina contiene escasos residuos de triptófano y metionina pero abundantes residuos polares, como la lisina, la arginina y los ácidos glutámico y aspártico. La estructura terciaria de la proteína muestra una serie de hélices α estabilizadas con 17 puentes disulfuro. Dicha disposición crea varios subdominios de tres hélices α continuas en paralelo, de forma que un par de subdominios enfrentados entre sí dan lugar a un dominio cilíndrico. La estructura tridimensional de la albúmina fue determinada cristalográficamente por He y Carter en 1992 (He and Carter, 1992), quienes describieron tres dominios homólogos, que se unen para

dar lugar al plegamiento con forma de corazón, aunque en solución la conformación cambia ligeramente, adquiriendo una forma elipsoidal, que le confiere una viscosidad menor.

La función principal de la albúmina es la unión y transporte de ligandos, tanto endógenos como exógenos. Esto se debe, en gran parte, a su gran flexibilidad, que le permite cambiar su conformación con facilidad.

La albúmina humana posee siete sitios de unión a ácidos grasos de cadena larga, tres de los cuales presentan alta afinidad por el ácido oleico, y once sitios de unión a ácidos grasos de cadena media (Bhattacharya et al., 2000). De los siete sitios de unión comunes para la mayoría de ácidos grasos, cinco poseen cadenas laterales básicas que interaccionan con el grupo carboxilo del ácido y son candidatos para ser sitios de alta afinidad. La unión depende de dos factores: es directamente proporcional a la relación molar ácido graso/albumina, y depende de la estructura de la cadena hidrocarbonada del ácido graso. Esto quiere decir que para una misma razón molar ácido graso/albumina, la afinidad aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada, y para una misma longitud, la inserción de un único doble enlace en *cis* aumenta la fuerza de unión. No obstante, la inserción de un segundo doble enlace reduce la afinidad con respecto a su equivalente saturado. Por este motivo, el ácido graso fisiológico con mayor afinidad por la albúmina parece ser el ácido oleico (Curry et al., 1999).

Esquema 12: Estructura terciaria de la albúmina sérica humana con siete moléculas de ácido oleico unidas.

La mayoría de los ácidos grasos captados por las células, que forman complejos con la albúmina, se esterifican y se incorporan a la célula en forma de fosfolípidos, ésteres de colesterol, glicoesfingolípidos o se oxidan como fuente de energía. Las membranas plasmáticas mantienen, aproximadamente, una proporción 1:1 de ácidos grasos saturados e insaturados. Las

alteraciones en esta relación producen cambios en la fluidez de la membrana, lo cual altera su funcionalidad.

1.5.2.4.2. La albúmina en el cerebro

La albúmina no está presente en el cerebro en condiciones normales, a pesar de su importante presencia en el plasma sanguíneo. No obstante, durante el desarrollo, en condiciones de hipoxia o tras la ruptura de la barrera hematoencefálica, la albúmina se acumula en el cerebro (Tabernero et al., 1999). El cerebro del neonato, al contrario que el del adulto, capta específicamente albúmina sérica durante el periodo postnatal, coincidiendo con la etapa de máximo desarrollo (en especies “no precoces”, como los modelos murinos). Se ha descrito la presencia de altas concentraciones de albúmina en el cerebro durante los primeros días de vida postnatal (Mollgard et al., 1984; Velasco et al., 2003). Curiosamente, se ha indicado que los individuos con SD tienen menor concentración de albúmina que los individuos que no padecen la enfermedad (Clarke and Bannon, 2005).

En experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio, se observó que la albúmina era internalizada en un proceso mediado por un receptor glicoproteico (Tabernero et al., 2002a; Tabernero et al., 2002b). Posteriormente, se describió que ese receptor era la megalina (Bento-Abreu et al., 2008) y que la internalización de la albúmina en los astrocitos se producía mediante endocitosis mediada por caveolas (Bento-Abreu et al., 2009).

La albúmina tienen un papel regulador de la proliferación en astrocitos y controla los niveles intracelulares de calcio (Nadal et al., 1995). En este sentido, se observó que en cultivos primarios de astrocitos, la albúmina aumenta significativamente la utilización de glucosa y lactato mediante la activación de la piruvato deshidrogenasa (PDH) (Tabernero et al., 1999). Este efecto es específico y dosis-dependiente. Sin embargo, solo aumenta discretamente otras vías metabólicas, tales como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o el ciclo de las pentosas fosfato, indicando que ejerce su efecto específicamente sobre la reacción catalizada por la PDH. Además, el aumento de la actividad de la PDH promovido por la albúmina es neutralizado por ácidos grasos. También se ha observado que la albúmina, en ausencia de factores neurotróficos exógenos, es capaz de inhibir *in vitro* la muerte por apoptosis, en un proceso mediado por glutamato, permitiendo a las neuronas en cultivo mantener su programa de diferenciación (Tabernero et al., 2002a).

1.6. Neurotransmisión colinérgica

Las neuronas colinérgicas tienen un papel esencial tanto en el Sistema Nervioso Central como en el Periférico y se han implicado en importantes procesos, como fenómenos de activación cortical, el paso de sueño a vigilia y la memoria (Sarter and Parikh, 2005). Se realizaron estudios en los que el uso de antagonistas de receptores muscarínicos, como la escopolamina o la atropina, alteraban las capacidades cognitivas (Deutsch, 1971), reflejando así la importancia del sistema colinérgico en los procesos cognitivos.

En 1929 se caracterizó la estructura química de la acetilcolina (ACh) y fue el inicio de la señalización química de una célula a otra y del descubrimiento de los neurotransmisores. Todas las regiones de la corteza cerebral están inervadas por neuronas colinérgicas, por lo que no es de extrañar que la función cortical esté fuertemente influida por ACh. Por otra parte, las lesiones en el núcleo basal de Meynert en modelos animales provocan pérdida de memoria, que se revierte tras la administración de agonistas colinérgicos. Las vías corticales procedentes de este núcleo juegan un papel fundamental en los procesos de aprendizaje, mediante cambios en la liberación cortical de ACh, que modulan la respuesta cortical a un determinado estímulo (Perry et al., 1999). Las vías colinérgicas del hipocampo parecen estar también involucradas en procesos de memoria y asociación. En conjunto, la inervación colinérgica de áreas corticales y límbicas sugieren su participación en procesos de memoria y de componentes emocionales.

La ACh se sintetiza en el citoplasma de las neuronas colinérgicas a partir de colina y acetil-CoA, por la colina acetiltransferasa (ChAT) (Collier et al., 1972). El tejido nervioso no es capaz de sintetizar colina, por tanto procede de la dieta y llega a las neuronas a través del torrente sanguíneo.

1.6.1. Localización y regulación de la colina acetiltransferasa

ChAT es una proteína citosólica, anclada en parte a las membranas neuronales (Oda, 1999) y que se encuentra fosforilada en las neuronas colinérgicas (Bruce and Hersh, 1989; Schmidt and Rylett, 1993). Las distintas fosforilaciones acarrear cambios en la actividad catalítica, localización subcelular e interacciones con otras proteínas. La fosforilación en el residuo Ser440 catalizada por la proteína quinasa C (PKC) regula la actividad catalítica de ChAT, así como su

INTRODUCCION

The diagram illustrates the ChAT signaling pathway. At the top, ChAT (blue oval) is shown being phosphorylated by p5-pT kinases (orange oval) to form ChAT-P (purple oval with 'P'). ChAT-P is then dephosphorylated by p5-pT phosphatase (orange oval) back to ChAT. ChAT-P is also shown being ubiquitinated (green oval with 'ubiquitin') and degraded by a Proteasome (green cylinder). The ubiquitination process is labeled 'regulatory ubiquitination?'. ChAT is also shown being ubiquitinated by VCP (yellow oval) and degraded. The pathway involves the conversion of ACh to Choline and Acetate by AChE (pink Y-shape) at the bottom. ChAT is regulated by various factors, including Ca²⁺ (green oval), PMA (black oval), CaM K (orange oval), PKC (green oval), c/n PKC (teal oval), and CHT1 (green oval). The diagram illustrates the regulation of ChAT by various factors, including Ca²⁺, PMA, CaM K, PKC, c/n PKC, and CHT1, and the role of ChAT in the synthesis and release of ACh.

36

1.6.2. Receptores colinérgicos

La ACh es transportada hacia el interior de las vesículas sinápticas por el transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) (Bravo et al., 2004) y se libera al espacio sináptico en respuesta a una despolarización. La liberación de acetilcolina es dependiente de la concentración intracelular y el gradiente de Ca^{2+} . La acetilcolina se une a su receptor postsináptico y es rápidamente hidrolizada en parte a colina y acetato, por la acetilcolinesterasa (AChE). El acetato es recaptado por el terminal presináptico para sintetizar acetil-CoA, así como la colina es recaptada por el transportador CHT.

Las señales intracelulares mediadas por ACh ocurren a través de dos clases de receptores, clasificados farmacológicamente como nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). Estos receptores, cuya función principal es la transducción de señales, actúan a través de dos mecanismos totalmente distintos. El receptor nicotínico es un canal iónico, activado por ligando y responsable de transmitir la señal hacia el interior celular. El receptor muscarínico ejerce su efecto en función del tipo de proteína G a la que se encuentre acoplado. Así, la activación de los receptores M1, M3 y M5 conduce a la producción del segundo mensajero AMPc, que, a su vez, es capaz de activar la proteína quinasa A. Además, el complejo agonista-receptor activa la fosfolipasa C (PLC) y, de este modo, estimula la producción de otros segundos mensajeros: inositol trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Sin embargo; la activación de los receptores M2 y M4 conlleva la inhibición de la adenilato ciclasa y la consecuente reducción de los niveles de AMPc.

2

PLAN DE TRABAJO

De acuerdo con las consideraciones descritas en la Introducción, el Plan de Trabajo quedó establecido como sigue:

- 1.- Estudios de caracterización de las células trisómicas.
- 2.- Estudio del papel del ácido oleico en modelos celulares de síndrome de Down.
- 3.- Estudio de la implicación de *Dyrk1A* en el mecanismo de acción del ácido oleico.

3

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL.

3.1.1. Especie ensayada y condiciones del animalario.

Se emplearon ratones hembra de tipo silvestre cruzadas con heterocigotos TgDYRK1A, que fueron generados en el laboratorio de la Dra. Cristina Fillat, como se describe en (Altafaj et al., 2001). Los animales se mantuvieron en estantes ventilados, empleando ciclos luz-oscuridad de 12 horas. La humedad osciló entre el 45 y el 65 %. La temperatura se controló entre los 20 y los 25 °C.

Los animales fueron alimentados con una dieta sólida estándar (17 % proteínas; 3 % lípidos; 58,7 % glúcidos; 4,3 % celulosa; 5 % sales minerales y 12 % humedad). Los animales tuvieron en todo momento acceso libre al agua de bebida y a la comida.

Se emplearon fetos de 15,5 días de gestación (E15,5) para la realización de los cultivos primarios de neuronas. Los fetos fueron obtenidos tras dislocación cervical de la madre. En todos los casos, los sacrificios de los animales fueron realizados siguiendo las normativas vigentes para la experimentación y el sacrificio de animales, según las directrices europeas (Convenio 123, Decisión 1999/575/CE y Directiva 2003/65/CE), la legislación española (Ley 32/2007 y Real Decreto 1201/2005) y la de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (Decreto 266/1998).

3.1.2. Medios instrumentales.

El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo de purificación de agua *Milli-Q^R Integral 3 System* (Millipore Ibérica, Madrid, España), con dispensadores y filtros de agua *Ellix* (agua purificada tipo II) y agua *Milli-Q* (agua ultrapura tipo I).

Las pesadas se realizaron en las balanzas analíticas Acculab, modelo *Atilon ATL-224-I* y Sartorius, modelo *1207 MP*, GmbH, Alemania).

El pH se determinó con un medidor de protones HACH, modelo *HQ440d multi* (HACH LANGE GmbH, Düsseldorf, Alemania).

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas Eppendorf, modelos *minispin*, *Centrifuge 5415R*, *Centrifuge 5702*, *Centrifuge 5430* (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) y en una ultracentrífuga *Beckman Coulter Optima TLX* (Beckman Instruments, Fullerton, USA) del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG, centro mixto USAL/CSIC).

Las cabinas de flujo laminar utilizadas fueron del modelo *TC 48* (Gelaire Flow Laboratories, McLean, USA) y del modelo *CULTair BC100* (Cultek, S.L.U., Madrid, España).

El material de vidrio fue esterilizado mediante calor seco, durante un mínimo de 12 horas, en una estufa-horno de esterilización, termostatizada a 170 °C, Selecta, modelo *S-20*, o en una estufa de secado y/o esterilización, modelo *UNB-200* de MEMMERT (MEMMERT GmbH, Nuremberg, Alemania).

El agua, el material de disección y el resto de utensilios y material, para los que eran requeridas condiciones de asepsia, se esterilizaron por medio de calor húmedo, en autoclaves Selecta, modelo 437 o modelo *Autester ST*.

Se utilizaron bombonas de nitrógeno y dióxido de carbono, suministradas por Air Liquide España (Valladolid, España).

El cultivo primario de neuronas se realizó empleando material estéril y fabricado específicamente a tal fin. Las neuronas se sembraron en placas Petri de 35 mm de diámetro, de la casa comercial BD Falcon, modelo 353001 "*Easy Grip Tissue Culture Dish*" (Becton & Dickinson Labware Europe, Le Pont D'Claix, Francia). En el caso de las líneas celulares, las células se sembraron en placas *Nunclon™Δ Surface*, modelo 153066, de la casa comercial Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

Los medios de cultivo y tampones empleados fueron filtrados a través de filtros de botella de 0,2 µm de diámetro de poro (*NALGENE*, Thermo Scientific). Para volúmenes pequeños de soluciones estériles se utilizaron filtros de jeringa de 0,2 µm de diámetro de poro (Acrodisc Pall Gelman Laboratory, Michigan, USA).

Los medios y disoluciones de cultivos fueron calentados en un baño termostatzado a 37 °C, modelo *Precisdig*, Selecta. Para otros experimentos a diferentes temperaturas, se ha utilizado un

baño con termostato acoplado, modelo *Haake Fisons* (Berlín, Alemania) y un bloque térmico para calentar tubos en seco (Selecta).

El conteo de células, previo a la siembra en placas, se realizó mediante un dispositivo automático *Countess* (Invitrogen, Life Technologies), en el que se adaptaron distintos protocolos para el diámetro y forma celular tanto de las neuronas como de las líneas celulares.

Las células se mantuvieron a 37 °C y con flujo constante de CO₂ al 5 % en incubadores automáticos de CO₂, modelos *Galaxy S* y *Galaxy 170* (RS Biotech, Northants, Reino Unido).

Para las agitaciones mecánicas fuertes, se emplearon dispositivos tipo vórtex, modelo *Finevortex* de la casa comercial FinePCR (Seúl, Corea).

La observación periódica de las células se realizó mediante un microscopio de contraste de fases modelo *Nikon TS100* (Nikon, China). Además, se empleó un microscopio de fluorescencia invertido modelo *Nikon Eclipse TS2000*, captándose las imágenes con un programa informático TCS-SP (Leica Microscopy Systems) y una cámara de vídeo digital modelo *Leica DC 350F* (Leica Microsystems).

Para los análisis de microscopía confocal se utilizó el microscopio láser confocal *Leica DM-IRE2* (Leica), del Instituto de Neurociencias de Castilla y León. Los resultados se analizaron empleando el programa de análisis *LCS Lite Leica*.

Se utilizó un lector de placas acoplado a un fluorímetro, modelo *Appliskan* tipo 2001 (Thermo Scientific), en el que se utilizaron placas multipocillo de 6, 12 o 96 pocillos, de la misma casa comercial.

Se empleó un espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific) para la cuantificación de RNA y cDNA. También se utilizó un fluorímetro *Qubit* (Invitrogen, Life Technologies) para la cuantificación de proteínas. En este caso, se utilizaron tubos de 0,5 mL, específicos para este dispositivo (*Qubit assay tubes*), proporcionados por la misma casa comercial (Invitrogen, Life Technologies).

Para los ensayos de *Western blot*, se utilizó un sistema de electroforesis vertical modelo *X-Cell4 Surelock Midi-Cell* de Invitrogen, conectado a una fuente de alimentación modelo *Power Pac 300* de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, USA).

La transferencia de los geles pudo ser realizada con un dispositivo *iBlot* (Invitrogen, Life Technologies), en cuyo caso se emplearon *iBlot Gel Transfer Stacks* con membranas de nitrocelulosa (Invitrogen, Life Technologies).

Las incubaciones de las membranas de nitrocelulosa con anticuerpos primarios o secundarios se realizaron en un *Navigator* (Fredericton, Canadá).

Para sonicar las muestras empleadas en los ensayos de *Western blot* se utilizó un baño de sonicación modelo *Bandelin Sonorex* (Bandelin GmbH, Berlín, Alemania).

El revelado de las películas de autorradiografía (Fujifilm) se llevó a cabo manualmente, con líquidos de la marca Fujifilm, *X-Fix-Fixer & Replenisher* y *Anatomix Developer Replenisher* (FujiHunt-Fujifilm, Europe WV, Bélgica) o empleando una máquina de quimioluminiscencia Micro Chemi 4.2 (DNR Bio-Imaging Systems, Ltd).

Para llevar a cabo la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT y PCR, respectivamente) se utilizó un termociclador modelo *GeneCycler* (Bio-Rad). Los viales de plástico de 0,2 mL para PCR se adquirieron en Biotools (Biotools-B&M Labs SA, Madrid, España). El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue un transiluminador de luz UV *Universal Hood II* (Bio-Rad).

Para los ensayos de PCR cuantitativa se utilizó un termociclador *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf), las placas multipocillo se adquirieron en Applied Biosystems (Life Technologies).

Para los ensayos de radioactividad se utilizó un contador de centelleo de la casa Beckman Coulter, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

El análisis de imágenes se llevó a cabo mediante el programa *ImageJ* (NIH Image), desarrollado por el Área de Servicios a la Investigación del *National Institute of Health* (Bethesda, USA).

3.1.3. Productos.

Los productos utilizados para la preparación de disoluciones y tampones que no se detallan a continuación, fueron adquiridos en las casas comerciales Sigma (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España), Panreac Química (Barcelona, España) o Merck (Darmstadt, Alemania).

3.1.3.1. Productos utilizados para la preparación de los cultivos celulares.

El medio de cultivo para el crecimiento de las neuronas fue un medio definido, empleando un medio mínimo modificado que tenía como base el medio *DMEM* (Medio Eagle modificado por Dulbecco), con la mezcla de nutrientes *F-12 Ham* (Sigma), al que se añadió piruvato (Sigma), L-glutamina (Sigma) y el complemento *N-2* (Gibco, Life Technologies). El medio de cultivo para las líneas celulares fue también *DMEM F-12 Ham*, al que también se añadió piruvato, L-glutamina y el complemento *N-2*, en las concentraciones indicadas en el apartado 3.2.1.1. de Métodos. El suero fetal bovino (FBS) era de la casa comercial Gibco (Life Technologies).

La albúmina sérica bovina (BSA), el complejo BSA-ácido oleico y los fosfolípidos incubados en los cultivos celulares (*L- α -phosphatidylethanolamine*; *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*; *L- α -phosphatidylinositol* y *2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine*), eran de la casa Sigma.

La DNasa I, la tripsina, y la albúmina bovina (Fracción V), que se utilizaron en los cultivos primarios de neuronas, fueron suministrados por Roche Diagnostics (Madrid, España).

La poli-L-lisina, utilizada para recubrir el fondo de las placas de cultivo, con objeto de facilitar la fijación de las células, procedía de la casa Sigma.

La mezcla de penicilina G, estreptomycin y anfotericina, que se utilizaron como antibióticos, procedieron de la casa Sigma.

3.1.3.2. Productos utilizados en la determinación de la viabilidad, muerte celular y especies reactivas de oxígeno.

En la determinación de la viabilidad celular por el método de MTT, se empleó el reactivo de MTT, la sal de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, de la casa comercial Sigma y el DMSO de la casa comercial Fluka (Fluka-Sigma).

La determinación de la apoptosis tardía por el método de TUNEL se realizó empleando en las incubaciones la transferasa terminal de desoxinucleótidos (TdT) y los nucleótidos dUTP-biotinilados, de la casa comercial Roche, en ambos casos.

El complejo estreptavidina conjugada con cianina 2 (Cy2) provenía de la casa comercial Jackson (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA).

El reactivo que se utilizó para la detección de especies reactivas de oxígeno fue la 2',7'-diclorofluoresceína diacetato, de la casa comercial Invitrogen (Life Technologies).

3.1.3.3. Productos empleados en los ensayos de radioactividad.

La [3,4- ^{14}C] glucosa fue suministrada por la casa GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA) y el [1- ^{14}C] ácido oleico procedía de DuPont NEN (Boston, MA, USA).

El líquido de centelleo empleado en las mediciones de radioactividad provino de la casa Beckman. Para retener el CO_2 se empleó hiamina, de la casa Sigma.

3.1.3.4. Productos empleados en el análisis de proteínas, inmunocitoquímica y localización de ácido oleico.

La inhibición de proteasas durante la recogida de las proteínas se consiguió con una mezcla de inhibidores sin EDTA (*Protease Inhibitor Cocktail Set III*), de la casa Calbiochem (Calbiochem-Merck, USA), a la que se añadió PMSF y ortovanadato, procedentes de la casa Sigma, el fluoruro sódico provino de la casa Panreac.

La cuantificación de proteínas se realizó con el fluorímetro *Qubit* y se emplearon los kits comerciales suministrados por la casa comercial Invitrogen (Life Technologies).

Para los ensayos de *Western blot*, se utilizaron geles comerciales preparados “precast”, *NuPAGE® Novex 8 % y 10 % Bis-Tris Midi-Gel*, de la casa comercial Invitrogen (Life Technologies). Asimismo, se utilizaron los productos *NuPAGE®* de dicha casa comercial, para la preparación de las muestras, junto con los tampones de electroforesis y de transferencia.

Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la tabla 3. Para el bloqueo de los anticuerpos primarios se empleó leche en polvo desnatada calcio *Sveltesse* (Nestlé, Barcelona, España).

Los anticuerpos secundarios contra inmunoglobulina de ratón y conejo conjugados con peroxidasa y el sustrato quimioluminiscente luminol, provinieron de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). El anticuerpo secundario conjugado con *Alexa Fluor® 488* contra inmunoglobulinas de conejo fue suministrado por Invitrogen (Life Technologies) (tablas 4 y 5).

El marcador fluorescente de retículo endoplasmático *RE-Tracker® Red*, el marcador fluorescente de DNA *4'-6-diamidino-2-fenilindol* (DAPI), el marcador de ácidos nucleicos *TO-PRO®-3* y el marcador mitocondrial fluorescente *MitoTracker®* procedían de la casa comercial Invitrogen (Life Technologies).

El paraformaldehído y el metanol utilizado para fijar las células procedían de la casa Merck. El Triton X-100 para la permeabilización de las células fue suministrado por la casa Sigma.

El medio de montaje y conservador de la fluorescencia para las observaciones al microscopio fue *SlowFade Gold Antifade Reagent* (Invitrogen, Life Technologies).

El ácido oleico marcado con biotina, empleado en los ensayos de inmunodetección, se adquirió en Cayman Chemical (Michigan, USA).

Los portaobjetos y cubreobjetos utilizados para el montaje de las inmunocitoquímicas fueron adquiridos en Thermo Scientific.

MARCADOR	DONADOR	TIPO	CONCENTRACIÓN	PROCEDENCIA
ChAT	Conejo	Policlonal	1:2000	Millipore
GAP-43	Conejo	Policlonal	1:500	Millipore
DYRK1A	Conejo	Policlonal	1:500	Abcam
GAPDH	Ratón	Monoclonal	1:5000	Ambion
SREBP-1	Ratón	Monoclonal	1:1000	BD Biosciences
Trk B	Ratón	Monoclonal	1:1000	BD Biosciences
VDAC	Conejo	Policlonal	1:500	Calbiochem
GRP78	Conejo	Policlonal	1:1000	Abcam

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en inmunodetección para ensayos de *Western blot* e inmunocitoquímica.

MARCADOR	DONADOR	TIPO	CONCENTRACIÓN	PROCEDENCIA
α -Ratón	Cabra	HRP	1:5000	Santa Cruz
α -Conejo	Cabra	HRP	1:10000	Santa Cruz

Tabla 4. Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano utilizados en inmunodetección para ensayos de *Western blot*.

MARCADOR	DONADOR	FLUORÓFORO	CONCENTRACIÓN	PROCEDENCIA
Conejo	Cabra	Alexa Fluor® 488	1:1000	Invitrogen
-	-	Cy2	1:500	Jackson

Tabla 5. Anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo utilizados en inmunocitoquímica, ensayos TUNEL e inmunodetección de ácido oleico conjugado con biotina.

3.1.3.5. Productos empleados para el silenciamiento del mRNA.

Los RNAs de interferencia de cadena corta (*small interfering RNA* o siRNA) fueron adquiridos en GeneLink-Bionova (Madrid, España). Los siRNAs utilizados para el silenciamiento del mRNA de Dyrk1A eran 5'-CACUGAAGCUCCUACACAATT y 5'-UUGUGUAGGAGCUUCAGUGTT.

El reactivo de transfección fue *Lipofectamina 2000* y el medio de transfección *Opti-MEM®*, ambos suministrados por Invitrogen y empleados según sus indicaciones.

3.1.3.6. Productos empleados en el fraccionamiento celular y determinación de fosfatidilcolina.

El kit para la determinación colorimétrica de fosfatidilcolina fue suministrado por Abcam (Cambridge, UK). Las distintas fracciones obtenidas por ultracentrifugación se resuspendieron en un tampón incluido en el kit.

3.1.3.7. Productos utilizados para el análisis del mRNA.

El reactivo *Trizol* para la extracción del RNA, así como los hexanucleótidos empleados como oligonucleótidos (*Random Hexamer Primers*), los desoxirribonucleótidos (dNTPs), el ditiotreitól (DTT), y la transcriptasa inversa (*SuperScript II Reverse Transcriptase*) utilizados en la RT-PCR, procedían de Invitrogen (Life Technologies).

El inhibidor de RNAsas era de Ambion (Life Technologies), mientras que el dietilpirocarbonato (DEPC) utilizado para inactivar las RNAsas era de Sigma.

Los oligonucleótidos utilizados como oligonucleótidos, tanto en las PCR estándar como en las cuantitativas, fueron adquiridos en Sigma. En las tablas 6 y 7 se indican sus secuencias.

La mezcla Master Mix que contenía la polimerasa de DNA *Taq*, utilizada en la PCR estándar, fue adquirida en Promega (Promega Biotech Ibérica S.L, Madrid, España). La mezcla de reactivos *SYBR® Green*, que contenía la polimerasa empleada en la PCR cuantitativa, procedía de Applied Biosystems (Life Technologies).

El resto de reactivos y productos utilizados en la preparación de las soluciones y tampones para biología molecular estaban libres de DNAsas y RNAsas y procedían de la casa comercial Sigma. La agarosa utilizada para preparar los geles en las electroforesis era de Laboratorios CONDA (Madrid, España). El marcador de ácidos nucleicos *SYBR® Safe* y el marcador de DNA de alto peso molecular fueron adquiridos en Invitrogen (Life Technologies).

El kit “DNeasy Blood and Tissue” para purificar el DNA genómico a partir de tejido fetal se adquirió en Qiagen (Hilden, Alemania).

Gen diana	Cadena sentido (5'→3')	Cadena antisentido (5'→3')
<i>CK alpha</i>	AGGGCCTACCTGTGGTGTA	GACCACCCCTGATGACACTG
<i>Pcyt1a</i>	CGACCTCATCCAGAAGTGGG	CAGCATGTGCTTCAGTGCTC
<i>CPT</i>	AACACCATCACCTCATCGG	ATGTCCAGTATGGTGCCCTC
<i>β-actina</i>	AGCCATGTACGTAGCCATCC	ACCCTCATAGATGGGCACAG

Tabla 6 . Oligonucleótidos empleados para PCR cuantitativa.

El genotipado de los fetos se realizó mediante PCR estándar, empleando los oligonucleótidos específicos que se detallan en la siguiente tabla:

Gen diana	Cadena sentido (5'→3')	Cadena antisentido (5'→3')
<i>TgDyrk1A</i>	GTCCAAACTCATCAATGTATC	CTTGAGCACAGCACTGTTG
<i>β-actina</i>	GAGCACCTGTGCTGCTACCGAGG	GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCACGCT

Tabla 7 . Oligonucleótidos empleados para PCR estándar.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Preparación de los cultivos celulares.

3.2.1.1. Composición de las disoluciones.

Todas las disoluciones empleadas se prepararon con H₂O ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2, excepto en los casos en que se indique otro pH, y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro 0,22 µm).

Solución de Earle (EBSS)

NaCl	116 mM
KCl	5,4 mM
NaH ₂ PO ₄	1,0 mM
MgSO ₄	1,5 mM
NaHCO ₃	26 mM
Rojo fenol	10 mg/L
D-glucosa	15 mM

Solución de disgregación (solución A)

Albúmina (Fracción V)	3 µg/mL
DNAsa tipo I	20 µg/mL
EBSS	50 mL

Solución de tripsinización (solución B)

Tripsina	0,25 µg/mL
DNAsa tipo I	60 µg/mL
Albúmina (Fracción V)	3 µg/mL
EBSS	20 mL

Medio de cultivo de neuronas (medio definido)

Piruvato sódico	1 mM
L-glutamina	2,5 mM
Penicilina G	50 U/mL
Estreptomicina	37,5 U/mL
Anfotericina B	0,23 µg/mL
DMEM F-12 Ham	50 mL

Suplemento *N*-2, que contenía:

-Transferrina humana	10 mM
-Insulina	10 nM
-Progesterona	20 nM
-Putrescina	0,1 mM
-Selenio	30 nM

Medio de crecimiento estándar de líneas celulares

FBS	5 % (v/v)
L-glutamina	2,5 mM
D-glucosa	15 mM
DMEM F-12 Ham	50 mL

Medio de cultivo de líneas celulares (medio definido)

Piruvato sódico	1 mM
L-glutamina	2,5 mM
D-glucosa	15 mM
Penicilina G	50 U/mL
Estreptomicina	37,5 U/mL
Anfotericina B	0,23 µg/mL
DMEM F-12 Ham	50 mL

Suplemento *N*-2, que contenía:

-Transferrina humana	10 mM
-Insulina	10 nM
-Progesterona	20 nM
-Putrescina	0,1 mM
-Selenio	30 nM

Tampón fosfato salino (PBS)

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄	7,8 mM
KH ₂ PO ₄	1,7 mM
Penicilina G	50 U/mL
Estreptomicina	37,5 U/mL
Anfotericina B	0,23 µg/mL

3.2.1.2. Preparación de los cultivos de las líneas celulares.

Las CNh (células de la corteza cerebral de ratones euploides) y las CTb (células de la corteza cerebral procedentes de fetos con trisomía 16) fueron descritas anteriormente por Cardenas y col. (Cardenas et al., 1999). Estas líneas celulares han sido desarrolladas en el laboratorio de Dr. Pablo Caviedes (Universidad de Chile) y están patentadas según un acuerdo con la Universidad de Florida del Sur.

Se sembraron las células en condiciones de crecimiento estándar en placas Petri de 90 mm de diámetro, a una densidad de $1,0 \times 10^5$ y se introdujeron en un incubador a 37 °C, con un 5 % de CO₂. A dicha densidad celular, las células estaban en confluencia y preparadas para hacer una resiembra a los siete días.

Las células se lavaron previamente con PBS y se trataron con dos mL de tripsina por placa Petri de 90 mm de diámetro, durante un minuto. Tras parar la tripsinización con medio de crecimiento estándar, las células se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. Posteriormente, se determinó la densidad celular mediante un contador automático de células *Countess* (Invitrogen), en el que se adaptó un protocolo con el diámetro y forma celular de las líneas celulares. Más adelante, las células se sembraron en placas Petri de 35 mm de diámetro, recubiertas con poli-L-lisina ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a una densidad entre $0,1-0,5 \times 10^6$ y en un volumen de entre uno y dos mL de medio definido, en función del experimento. Por último, al medio definido se añadió BSA 2 % (p/v) o el complejo BSA-ácido oleico 33 μM , y en los casos en los que se realizaron ensayos de silenciamiento, estas incubaciones se llevaban a cabo 24 horas después de la transfección con *Lipofectamina 2000*. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C, con un 5 % de CO₂, con una duración de entre 24 y 96 horas.

3.2.1.3. Preparación del cultivo primario de neuronas procedentes de ratones normales y transgénicos que sobreexpresan *Dyrk1A*.

Los cultivos de neuronas se realizaron según el método previamente descrito por Tabernero y col. (Tabernero et al., 1993). Los fetos (de tipo silvestre y transgénicos) se obtuvieron por histerectomía de la madre en el día 15,5 de gestación (E15,5). Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente, con excepción de la tripsinización, que se llevó a cabo a 37 °C.

Los fetos se limpiaron con etanol al 70 %, se decapitaron, se extrajeron y se trataron los cerebros de forma individual, retirándoles las meninges y los vasos sanguíneos visibles. Cada cerebro se colocó en un pocillo de una placa multipocillo, que contenía solución de disgregación (solución A).

El tejido de cada pocillo en solución A se disgregó utilizando un bisturí y posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a $500 \times g$. El tejido disgregado se incubó durante 15 minutos a 37°C en solución de tripsinización (solución B). Posteriormente, se detuvo la tripsinización añadiendo al tejido disgregado *DMEM* suplementado con FBS al 10 % (v/v).

Finalizada la tripsinización, se centrifugó cada tejido disgregado durante 5 minutos a $500 \times g$, se retiró el sobrenadante, se resuspendió cada tejido disgregado en la solución A y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta pasteur siliconada. Se esperó entonces 4 minutos y se recogió el sobrenadante repitiendo dos veces más ese tratamiento. Se reunieron los sobrenadantes correspondientes a cada tejido y se centrifugaron a $500 \times g$ durante 5 minutos. Las neuronas obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo de neuronas (medio definido).

Una pequeña alícuota de cada suspensión celular se mezcló con azul de tripano al 0,2 % (p/v) para la determinación de la viabilidad celular y del número de células por cerebro extraído.

A continuación, las neuronas se sembraron en placas Petri recubiertas con poli-L-lisina ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), en medio definido, en presencia de BSA al 2 % (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico $50 \mu\text{M}$. Las neuronas se sembraron a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/ cm^2 en placas de 35 mm de diámetro, en un volumen total de 1 mL de medio definido. Las neuronas se mantuvieron en un incubador a 37°C , con un 5 % de CO_2 , entre 24 y 96 horas.

3.2.2. Estudio de la apoptosis mediante la técnica TUNEL.

La técnica TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotine Nick End Labeling*) aprovecha una característica morfológica de las células apoptóticas como es la fragmentación de la cromatina. El fundamento de esta técnica consiste en la utilización de la transferasa terminal de desoxinucleótidos (TdT), que transferirá desoxiuridina trifosfato dUTP-biotinilado hasta los extremos 3'-OH de los fragmentos de DNA. Posteriormente, se producirá una reacción con estreptavidina marcada con

un fluoróforo (Cy2) que permitirá visualizar, con un microscopio de fluorescencia invertido, las células TUNEL positivas.

El protocolo de TUNEL requiere varios lavados con PBS y cada uno a diferentes tiempos. Después de la incubación con los tratamientos correspondientes, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos. Se lavaron dos veces con PBS y se incubaron las placas con etanol a -20 °C durante 5 minutos. Se lavaron las placas con PBS y se incubaron con tampón TUNEL (Tris 30 mM y pH 7,2; cacodilato de sodio 140 mM; cloruro de cobalto 1 mM y Triton X-100 0,3 % (p/v)) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las células se incubaron con la enzima TdT (800 U/mL) y el dUTP-biotinilado (1 µM), diluidos en tampón TUNEL, durante 1 hora y 30 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se paró la reacción realizando dos lavados, de 10 minutos cada uno, con citrato sódico salino. Posteriormente, se hicieron dos lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS. Después se incubó con estreptavidina conjugada con cianina 2 (Cy2) 1:500 disuelta en PBS, durante 2 horas. Pasado este tiempo se hicieron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS. Se incubó con DAPI (2,5 µg/mL) durante 5 minutos para marcar el DNA nuclear. Se hicieron dos lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS y finalmente se montaron las placas con el agente *SlowFade Gold Antifade Reagent*. Las placas, entonces, se visualizaron con un microscopio de fluorescencia invertido con los filtros adecuados, tomándose varias imágenes por placa.

Finalmente, se contaron las células apoptóticas (marcadas con Cy2) y se compararon con el número de células totales (observadas mediante DAPI).

3.2.3. Determinación de la actividad de piruvato deshidrogenasa.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio permitieron evaluar el efecto de la albúmina sobre el destino de la glucosa en neuronas, a través de distintas vías metabólicas (Tabernero et al., 2002a). Para ello, se determinó la lipogénesis y el grado de oxidación de la glucosa, utilizando glucosa marcada con ¹⁴C en diferentes carbonos. La producción de ¹⁴CO₂ a partir de [3,4- ¹⁴C] glucosa permitió medir el grado de oxidación de glucosa a través de la piruvato deshidrogenasa, ya que los carbonos 3 y 4 son específicamente descarboxilados en la reacción catalizada por esta enzima (Cheeseman and Clark, 1988; Hothersall et al., 1979; Hothersall et al., 1981).

Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2 % (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M, durante 24 horas. Posteriormente se retiró el medio y se lavaron los frascos dos veces con PBS. A continuación, se añadió a cada frasco 1,5 mL de medio de incubación (que contenía tampón *Elliot*, glucosa 5 mM y 100-300 dpm/nmol de [3,4- 14 C] glucosa) y se incubaron durante una hora a 37 °C con tapones de caucho, a los que previamente se había incorporado un tubo con 100 μ L de hiamina impregnada en papel de filtro. Tras la incubación, se inyectó ácido perclórico 5 M a cada frasco. Se dejaron en reposo durante 5 minutos para que todo el bicarbonato generado se evaporase en forma de $^{14}\text{CO}_2$, el cual quedó impregnado en el papel de filtro con hiamina. Por último, se rellenaron con líquido de centelleo los tubos que contenían el papel de filtro y las muestras se analizaron en un contador de centelleo.

Tampón *Elliot*, en tampón fosfato sódico 10,8 mM, pH 7,6.

NaCl	122 mM
KCl	4,8 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
MgSO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	1,3 mM

Para los cálculos de radioactividad se tuvo en cuenta la radioactividad inespecífica, que viene definida como las desintegraciones por minuto (dpm) del medio de incubación sin células. A partir de la cantidad de glucosa sin marcar y la glucosa marcada radioactivamente empleadas en cada frasco se determinó la radioactividad específica (dpm/nmol). Finalmente, los nanomoles de glucosa se calcularon a partir de las dpm generadas en cada condición respecto a la radioactividad específica y frente al número de células de cada muestra.

Además, se realizaron ensayos en paralelo en los que se incubaron células para determinar el número de ellas en cada condición, mediante el contador automático *Countess*.

3.2.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno.

El reactivo que se utilizó para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) fue la 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), cuya longitud de onda de excitación es de 492-495 nm y cuyo máximo pico de emisión es de 517-527 nm. Se suministra como compuesto reducido y no fluorescente hasta que los grupos acetato se retiran por acción de esterasas intracelulares y la

oxidación de la molécula ocurre en el interior celular. La oxidación puede ser detectada siguiendo el incremento de fluorescencia con un fluorímetro, utilizando una fuente de excitación y el filtro apropiado para isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Para tal fin, las células se incubaron en medio definido en placas de 12 pocillos, en presencia de BSA 2 % (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M, durante 4, 24, 48, 72 y 96 horas. A dichos tiempos se retiró el medio definido y se añadió 3 μ L/mL de H₂DCFDA disuelto en *Hanks* durante una hora a 37 °C. La medición de fluorescencia se realizó a 535 nm, utilizando un lector de placas acoplado a un fluorímetro *Appliskan*, en el momento de añadir la H₂DCFDA y tras la incubación. Para realizar los cálculos, ambas medidas de fluorescencia se restaron y se normalizaron respecto al porcentaje de viabilidad celular en cada condición. La viabilidad se determinó mediante ensayos colorimétricos con MTT, que se realizaron después del ensayo fluorimétrico.

Tampón Hanks, pH 7,4.

NaCl	134,2 mM
KCl	5,26 mM
KH ₂ PO ₄	0,43 mM
NaHCO ₃	4,09 mM
Na ₂ HPO ₄	0,33 mM
Glucosa	10,0 mM
Hepes	10,0 mM
CaCl ₂	2,0 mM

Esquema 14: Estados redox de H₂DCFDA.

3.2.5. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT.

El método del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) fue propuesto por Mosmann y col. (Mosmann, 1983) para evaluar los efectos citotóxicos de una sustancia, así como para realizar estudios de proliferación celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cristales de formazán, de color azul oscuro-violeta. Después de la solubilización de dichos cristales en DMSO, se obtiene un medio de color violeta, cuya mayor o menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con MTT, las células se incubaron en placas de 12 pocillos en medio definido, en presencia de BSA 2 % (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M, durante 4, 24, 48, 72 y 96 horas. A dichos tiempos, se retiró el medio y las células se incubaron en 0,5 mg/mL de MTT disuelto en PBS, durante 75 minutos, en oscuridad, a 37 °C y en un incubador de CO₂. Posteriormente se aspiró el medio, se añadieron 500 μ L de DMSO y se dejaron las células en agitación leve y oscuridad durante 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm con un lector de placas acoplado a un fluorímetro Appliskan.

Esquema 15. Fundamento bioquímico del método de determinación de la viabilidad celular con MTT.

3.2.6. Determinación de la expresión y localización de ChAT mediante inmunocitoquímica.

Después de la incubación con los tratamientos correspondientes, las células y las neuronas se fijaron con paraformaldehído al 4 %, durante 20 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con metanol a -20 °C durante 10 minutos. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche (anticuerpo policlonal de conejo contra ChAT, 1:2000, disuelto en solución de anticuerpos). La solución de anticuerpos estaba compuesta por FBS 10 % (v/v); azida sódica 0,02 % (p/v) y lisina 0,1 M.

A continuación, se incubó un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo, durante una hora a temperatura ambiente sin agitación. El anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG de conejo; conjugado con *Alexa Fluor® 488* (1:1000 diluido en PBS). Finalmente, el DNA nuclear se tiñó con DAPI (2,5 µg/mL en PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente. En las preparaciones destinadas para su observación en microscopio láser confocal, se añadió el compuesto *TO-PRO®3* (1:1000) junto con el anticuerpo secundario. Las células se montaron utilizando un agente preservador de la fluorescencia, *SlowFade Gold Antifade Reagent*. Entre cada paso de la inmunocitoquímica, las células se lavaron tres veces con PBS a temperatura ambiente.

Las preparaciones fueron observadas con un microscopio de fluorescencia invertido o con un microscopio láser confocal, obteniéndose imágenes de fluorescencia o confocales, respectivamente. La cuantificación de la expresión proteica se realizó empleando el programa informático de análisis de imagen *Image J*.

3.2.7. Silenciamiento del mRNA de *Dyrk1A* mediante la técnica del RNA de interferencia.

El mecanismo del RNA de interferencia (RNAi) consiste en el bloqueo de la expresión de un gen específico. Se ha observado en todos los tipos de células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Se cree que este mecanismo está implicado en la protección del genoma frente a las infecciones víricas; además juega un papel en la regulación de la proliferación, muerte y diferenciación.

Actualmente, el RNAi es una herramienta útil para llevar a cabo el silenciamiento de un gen específico. El mecanismo de actuación del RNAi en la célula se representa en el esquema 16. En

primer lugar, el RNA de doble cadena (dsRNA) es digerido por una enzima denominada *Dicer*, similar a la RNAsa III. Así se obtienen pequeños fragmentos de doble cadena de RNA, de 20-25 nucleótidos, denominados siRNA (*small interfering RNA*). Estos se ensamblan en un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que contiene una endorribonucleasa, la cual separa la doble cadena de siRNA. Finalmente, la monocadena de siRNA se une a su cadena complementaria en el mRNA de la célula y el complejo RISC digiere el mRNA diana.

Esquema 16. Fundamento molecular del método de silenciamiento con siRNA.

El silenciamiento del mRNA de *Dyrk1A* se llevó a cabo en el momento de resembrar las líneas celulares en medio definido sin la mezcla de antibióticos. Se validaron tres secuencias diferentes específicas de *Dyrk1A*. Finalmente, se utilizó siempre la misma secuencia para realizar los experimentos de silenciamiento y se especifica en el apartado 3.1.3.5. de Productos.

Los siRNAs se resuspendieron en agua libre de nucleasas a una concentración inicial de 30 μM , se diluyeron en medio comercial *Opti-MEM*® a una concentración final de 20 nM y se incubó la mezcla durante 5 minutos. Como control de las transfecciones de siRNA se utilizó una secuencia de siRNA que carece de mRNA diana, designado como NT-siRNA (non target-siRNA). Por otro lado, se preparó 0,03 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ de *Lipofectamina 2000* disuelto en *Opti-MEM*®, siguiendo las indicaciones del fabricante y se incubó durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se mezclaron los medios que contenían el siRNA y la *Lipofectamina 2000* (1:1) y se

incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la mezcla se añadió al cultivo celular (200 μ L/mL de medio definido). Al cabo de 8 horas de transfección, se substituyó el medio de cultivo por medio definido con la mezcla de antibióticos. Las células se incubaron a 37 °C en un incubador de CO₂, el tiempo necesario para ser procesadas para los siguientes experimentos. La adición de BSA 2% (p/v) o BSA-ácido oleico 33 μ M al medio definido no se realizó hasta pasadas 24 o 48 horas de transfección con *Lipofectamina 2000*. En los casos en los que se silenció la expresión de *Dyrk1A* durante 72 horas, transcurrido ese tiempo las células se lavaron con PBS y se trataron con tripsina durante un minuto. Tras detener la tripsinización, las células se levantaron y centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos. Posteriormente, se determinó la densidad celular mediante un contador automático de células *Countess* (Invitrogen). Más adelante, las células se sembraron en placas Petri de 35 mm de diámetro, recubiertas con poli-L-lisina (1 μ g/cm²), a una densidad de entre 0,1 y 0,5 x 10⁶, en función del experimento. Por último, al medio definido se añadió BSA 2 % (p/v) o el complejo BSA-ácido oleico 33 μ M.

3.2.8. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo *Western blot*.

El análisis de la expresión de proteínas por transferencia tipo *Western blot* se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (SDS-PAGE).

Extracción de proteínas.

Las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron con un tampón RIPA para la extracción de proteínas. A dicha solución de extracción se le añadió una mezcla comercial de inhibidores de proteasas 1:100 (v/v), PMSF 1 mM, NaF 1 mM y ortovanadato 0,1 mM. Los lisados se resuspendieron en tampón *Laemmli* 4x (Tris-HCl 0,18 M y pH 6,8; glicerol 5 M; SDS 3,7 % (p/v); β -mercaptoetanol 0,6 M o DTT 9 mM y azul de bromofenol 0,04 % (v/v)). Los lisados se calentaron durante 5 minutos a 100 °C, después se sonicaron 5 minutos, luego se centrifugaron a 14000 x g durante 15 minutos a 4 °C y, por último, se almacenaron a -20 °C.

Tampón RIPA

Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
NP-40	1 %

DOC	0,25 %
SDS	0,1 %

Cuantificación de proteínas con fluorímetro *Qubit*

Este método se basa en la unión selectiva de proteínas a un reactivo fluorescente, incluido en el kit de determinación. Se utiliza un protocolo muy selectivo, ya que con la medición no hay interferencias con ácidos nucleicos o sustancias como el DTT o el β -mercaptoetanol. La cuantificación se realiza en un fluorímetro *Qubit* (Invitrogen), el cual ya está adaptado para el reactivo correspondiente a proteínas.

El protocolo consiste en la dilución del reactivo fluorescente en el tampón de medida proporcionado por la casa comercial, para preparar la mezcla de trabajo. A continuación, se realiza una curva patrón con estándares de BSA, también proporcionados por la casa comercial. Antes de las mediciones, las muestras diluidas se agitan en un vórtex durante tres segundos, se dejan incubando en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y, por último, se mide en el fluorímetro, seleccionando la opción de análisis para proteínas. La cuantificación se realiza por extrapolación de los resultados de las muestras con la curva patrón de los estándares.

Esquema 17. Protocolo de preparación de muestras con el método *Qubit*.

Preparación de las muestras para la electroforesis.

Los geles utilizados para la electroforesis fueron geles comerciales *NuPAGE*® “precast”, al 8 % y 10 % de poliacrilamida, de la casa Invitrogen.

Para cada muestra se utilizaron 20-30 µg de proteínas resuspendidas en el tampón *Laemmli* 4x. Se calentó la mezcla durante 5 minutos a 100 °C para su desnaturalización y, tras realizar una rápida centrifugación, se mantuvieron en hielo.

Electroforesis de proteínas

Las muestras se aplicaron en los distintos pocillos del gel comercial “precast”, incluyendo un marcador de pesos moleculares (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 y 10 KDa). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, a voltaje constante (entre 60 y 120 V, dependiendo de las proteínas a separar) y durante el tiempo considerado conveniente para separar adecuadamente las proteínas de interés.

El tampón utilizado para la electroforesis fue un tampón *NuPAGE*® *MOPS SDS Running Buffer* (20x). Además, se añadió a la cubeta un antioxidante (2,5 µL/mL de tampón *MOPS*), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Electrotransferencia

Una vez terminada la electroforesis, el gel con las proteínas se incubó durante 10 minutos en un tampón de equilibrado, para optimizar la transferencia de proteínas de medio y alto peso molecular. El tampón de equilibrado está compuesto por la solución de transferencia *NuPAGE*®, a la que se ha añadido un antioxidante 1:1000 *NuPAGE*® y metanol al 10 % (v/v). Las proteínas separadas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Dicha membrana se encuentra dentro del *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose*, empleados en el *iBlot*. Se aplicó un voltaje fijo de 20 V durante 10 minutos, de manera que las proteínas van pasando a la membrana atraídas por la carga eléctrica positiva, quedando inmovilizadas en la misma posición que ocupaban en el gel.

Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana

La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante tinción con Rojo *Ponceau* al 10 % (v/v). A continuación, la membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo al 7 % (p/v) en TTBS (Tween Tris-base 20 mM; NaCl 500 mM; pH 7,5).

Inmunodetección

Para detectar las proteínas en la membrana, se incubó con el anticuerpo primario contra la proteína de interés, durante 14 horas a 4 °C.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-GAP-43 (1:500), anti-ChAT (1:2000); anti-DYRK1A (1:500), anti-GAPDH (1:5000), anti-SREBP-1 (1:1000), anti-Trk B (1:1000), anti-VDAC (1:500) y anti-GRP78 (1:1000). Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución de anticuerpos, compuesta por FBS 10% (v/v); azida sódica 0,02 % (p/v) y lisina 0,1 M.

A continuación, se incubó un anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón o conejo, conjugado con peroxidasa de rábano, durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de ratón se utilizó a una concentración de 1:5000 y el anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina de conejo se utilizó a una concentración de 1:10000, preparados en TTBS. En este punto se forma un complejo proteína-anticuerpo primario-anticuerpo secundario.

La inmunodetección se realizó mediante quimioluminiscencia. En este sistema, el sustrato quimioluminiscente luminol, añadido a las membranas, es oxidado por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia del sustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en condiciones alcalinas. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol excitado decae a su estado fundamental por emisión de luz. La luz emitida es detectada en una película de autorradiografía, siendo esta luz proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana, en condiciones de exposición subsaturante. El revelado de las bandas detectadas por la película se realizó manualmente, con líquidos de revelado fotográfico; y de forma automática, mediante el empleo de un aparato de quimioluminiscencia Micro Chemi 4.2.

Finalmente, se cuantificaron las bandas en las películas de autorradiografía, mediante un escáner de doble haz y el programa informático de análisis de imagen *Image J*.

3.2.9. Genotipado de los ratones transgénicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El DNA genómico se obtuvo a partir de tejido fetal y purificado con el kit *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo de purificación fue el siguiente: se cortaron 25 mg de tejido fetal de cada feto por separado y se añadió a cada tubo 180 μ L de tampón de lisis *ATL*. El tejido se trocó en pequeñas piezas para facilitar la lisis. Se añadió a cada tubo 20 μ L de proteinasa K. Se mezcló inmediatamente en un vórtex y se incubó a 56 °C en un bloque térmico en agitación durante toda la noche, hasta que el tejido se lisó por completo. Posteriormente, se utilizó RNasa A (100 mg/mL), 4 μ L por tubo, para eliminar el RNA, se mezcló en un vórtex y se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente. Se mezclaron de nuevo las muestras durante 15 segundos y se añadió 200 μ L de tampón de prelavado *AL*. Luego se añadió 200 μ L de etanol (96-100 %) y se mezcló inmediatamente en un vórtex. Se recogieron las muestras con pipeta y se llevaron a las columnas *DNeasy Mini spin column* para realizar tres lavados seguidos. Las muestras se centrifugaron a 6000 x g durante un minuto. Se añadieron de nuevo a cada columna 500 μ L de tampón de lavado *AW1* y se centrifugaron durante un minuto a 6000 x g. Se realizó un último lavado de la columna, añadiendo 500 μ L de tampón de lavado *AW2* y se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 20000 x g, para secar las membranas de las columnas. Por último, se pipetearon 100 μ L de tampón de elución *AE* directamente sobre la membrana, se incubaron las muestras durante un minuto a temperatura ambiente y se centrifugaron a 6000 x g durante un minuto. Este último paso se repitió para conseguir la máxima cantidad de DNA.

El DNA genómico obtenido en cada muestra se cuantificó utilizando el fluorímetro *Qubit* (Invitrogen). El genotipado de los fetos se realizó mediante PCR. Para la amplificación se utilizó una mezcla de reactivos *PCR Master Mix*, que contenía DNA *Taq* polimerasa 50 U/mL, dNTPs 400 μ M, MgCl₂ 3mM y tampón de reacción. La mezcla de reacción estaba formada por 1 μ L de cDNA molde (200-300 ng), 5 μ L de la pareja de oligonucleótidos específicos 10 μ M, 12,5 μ L de *PCR Master Mix* y 6,5 μ L de H₂O libre de nucleasas, para llegar a un volumen final de 25 μ L por muestra. La secuencia de oligonucleótidos se especifica en la tabla 7.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 5 minutos de desnaturalización a 94 °C, 32 (*TgDyrk1A*) o 35 (β -*actina*) ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 54 °C (*TgDyrk1A*) o a 55 °C (β -*actina*) durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72 °C. La amplificación del DNA se visualizó en geles de agarosa al 2 %. Al amplificar el DNA genómico de un ratón *TgDyrk1A* se obtuvo un producto de 490 pb.

3.2.10. Captación de ácido oleico.

Las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M, 9000-12000 dpm/nmol de [1- 14 C] ácido oleico y BSA 2 % (p/v), durante 1, 4, 24 y 48 horas. A dichos tiempos, las células se lavaron tres veces con PBS y se recogieron en 300 μ L de un tampón que contenía NaOH 10 mM y Triton X-100 0,1 % (p/v). Se llevaron 50 μ L de cada muestra a viales de plástico, que se rellenaron con líquido de centelleo. Se mezclaron las muestras en un vórtex durante un minuto y se analizaron en un contador de centelleo.

Para los cálculos de radioactividad se tuvo en cuenta la radioactividad inespecífica, que viene definida como las dpm del medio de incubación sin células. A partir de la cantidad de ácido oleico sin marcar y de ácido oleico radioactivo empleado en cada placa, se determinó la radioactividad específica (dpm/nmol). Finalmente, los nanomoles de ácido oleico se calcularon a partir de las dpm generadas en cada condición respecto a la radioactividad específica, teniendo en cuenta el volumen de tampón con el que se recogieron las células y la cantidad de proteínas en ese volumen.

3.2.11. Detección de ácido oleico conjugado con biotina.

Las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 15 μ M, ácido oleico conjugado con biotina 15 μ M y BSA 2 % (p/v), durante 24 horas. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (p/v) durante 20 minutos. Después, se hicieron dos lavados con PBS y se permeabilizaron las membranas tras el tratamiento con metanol a -20 °C durante 10 minutos. Después de dos lavados con PBS, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con Cy2 (1:500 en PBS) y Triton X-100 0,1 % (p/v), durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación, se hicieron tres lavados con PBS y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (1:5000 en PBS) durante dos minutos o con *TO-PRO*®-3 (1:1000

en PBS) durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Por último, se hicieron dos lavados de PBS y las células se montaron utilizando un agente preservador de la fluorescencia, *SlowFade Gold Antifade Reagent*. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio láser confocal, obteniéndose imágenes confocales. Se utilizaron en todos los casos controles sin ácido oleico conjugado con biotina, para establecer los niveles de ganancia/pérdida durante la toma de imágenes.

En los casos en los que se analizó el marcaje mitocondrial, las células se incubaron, previamente a la fijación con paraformaldehído, con el colorante fluorescente específico *MitoTracker*® 3 μ M, durante 30 minutos a 37 °C. En los casos en los que se marcó el retículo endoplasmático, se utilizó el colorante fluorescente *RE-Tracker*® Red 1 μ M, durante 20 minutos, después de haber fijado las células.

Esquema 18. Complejo ácido oleico-biotina (*cis*-9-octadecenoil-*N'*-biotinoil-1,5-diaminopentano)

3.2.12. Determinación de fosfatidilcolina mediante ensayo colorimétrico.

El kit de la casa comercial Abcam proporciona los reactivos necesarios para determinar la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) mediante reacción enzimática, liberándose así colina, que es oxidada por *OxiRed*, que absorbe a 570 nm.

Las células se incubaron en medio definido en presencia de distintos ácidos grasos a una concentración 33 μ M, todos ellos formando un complejo con BSA 2 % (p/v). Las células se recogieron a diferentes tiempos en 100 μ L de tampón comercial proporcionado con el kit.

En cada ensayo enzimático se preparó una curva estándar con diluciones sucesivas (a partir de PC estándar que proporciona el kit) y un control que carecía de enzima. Además, se preparó una mezcla de reacción que, por cada muestra, contenía 44 μL de tampón de ensayo, 2 μL de enzima, 2 μL de mezcla de reacción y 2 μL de *OxiRed*. En una placa de 96 pocillos se añadieron 50 μL de muestra y 50 μL de mezcla de reacción a cada pocillo. Una vez que se añadieron todos los reactivos, se incubó la placa multipocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz y en leve agitación. Posteriormente, se midió la densidad óptica a 570 nm con un lector de placas acoplado a un fluorímetro *Appliskan*.

Para obtener las concentraciones de PC de cada muestra, los valores de densidad óptica se calcularon mediante regresión lineal de la curva estándar. Por último, las concentraciones de PC se normalizaron respecto a la cantidad de proteína que contenía cada muestra.

Esquema 19. Regresión lineal de una curva estándar de concentración de PC frente a densidad óptica a 570 nm.

3.2.13. Fraccionamiento celular y purificación de membranas plasmáticas.

El fraccionamiento celular y la purificación de membranas plasmáticas se realizó según el método descrito por Suárez y col. (Suarez et al., 2001). Brevemente, las células se recogieron en un tampón de homogeneización, al que se añadió previamente una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail Set III*) y PMSF 1 mM.

Tampón de homogeneización, pH 7.4

Sacarosa	250 mM
EGTA	2 mM

Azida sódica 5 mM
HEPES 20 mM

Posteriormente, las células se homogeneizaron (20 pases) con un homogeneizador tipo *Potter-Elvehjem* de 5 mL y se centrifugaron a 700 x g durante 5 minutos. El sobrenadante (SN₁) se recuperó y el precipitado se resuspendió en el mismo tampón. A continuación, se realizó una segunda homogeneización y una posterior centrifugación. El sobrenadante (SN₂) se unió a la fracción SN₁ y se centrifugó a 24000 x g durante una hora. El precipitado representó una fracción enriquecida en membranas mitocondriales y de retículo endoplasmático, denominada fracción HDM. Por otra parte, el sobrenadante se centrifugó a 190000 x g durante una hora, el nuevo precipitado representó una fracción enriquecida en membranas endosomales y plasmáticas de bajo peso molecular, denominada fracción LDM. Ambas fracciones se resuspendieron en 150 µL de solución para extracción de proteínas (para ensayos de *Western blot*) o de tampón comercial para la determinación de PC por análisis colorimétrico.

Esquema 20: Separación de fracciones tras purificar las membranas celulares. Marcaje de distintos marcadores de orgánulos, mediante ensayos de *Western blot*.

3.2.14. Análisis del mRNA de proteínas específicas mediante transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa.

Extracción del RNA

La extracción del RNA total de las células en cultivo se llevó a cabo con *Trizol*, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Brevemente, se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de *Trizol*, se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 segundos y después de una incubación a temperatura ambiente, de dos minutos en reposo, todas las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Una vez recogida la fase acuosa, se precipitó el RNA por adición de 0,5 volúmenes de isopropanol (2-propanol) por volumen de *Trizol*. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con un volumen de etanol al 75 %. A continuación, las muestras se agitaron con un vórtex y se centrifugaron a 7500 x g, durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado de RNA se dejó secar parcialmente a temperatura ambiente y se resuspendió en H₂O DEPC (agua estéril a la que se había añadido dietilpirocarbonato (DEPC) para evitar la acción de las RNAsas) y se incubó durante 10 minutos a 60 °C en un bloque térmico. Más tarde, se añadieron 0,05 volúmenes del inhibidor de RNAsas *RNAse Inhibitor* por cada volumen de H₂O DEPC resuspendido y se realizó un tratamiento con DNasa (siguiendo las indicaciones del kit, que consistían en añadir tampón de DNasa al 10 % y un volumen de DNasa e incubar durante 30 minutos a 37 °C en un baño termostatzado). Tras ese tiempo, se añadieron 0,1 volúmenes de tampón de inactivación, las muestras se agitaron con un vórtex y por último, se centrifugaron a 10000 x g durante un minuto. Los sobrenadantes se recogieron en tubos eppendorf estériles.

Cuantificación del RNA

El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación de absorbancias 260/280 y 260/230 nm.

Transcripción inversa (RT)

La realización de la transcripción del RNA total a cDNA se realizó utilizando la transcriptasa inversa (*SuperScript II Reverse Transcriptase*), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de RNA total se mezcló con 200 ng de oligonucleótidos hexaméricos aleatorios (*Random Hexamer Primers*) y se llevó a un volumen total de 11 µL con H₂O DEPC. La

mezcla se incubó durante 10 minutos a 70 °C y, seguidamente, se enfrió en un baño de hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 9 µL de una mezcla compuesta por 4 µL de tampón de la transcriptasa, 0,66 µL de transcriptasa *SuperScript II Reverse Transcriptase*, 1 µL de la mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1 µL del inhibidor de RNAsas *RNAasin Ribonuclease Inhibitor*, 0,34 µL de H₂O DEPC y 2 µL de ditiotritol (DTT).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador y consistió en un paso inicial de anillamiento (10 minutos a 20 °C), seguido de elongación (45 minutos a 42 °C) y desnaturalización (5 minutos a 99 °C). Al final de la reacción, las muestras se mantuvieron a -20 °C.

Cuantificación del cDNA

El cDNA obtenido de cada muestra se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se comprobó la calidad del mismo por la relación de absorbancias 260/280 y 260/230 nm.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación por PCR del cDNA del gen de interés, se utilizó una mezcla de reactivos *PCR Master Mix* que contenía DNA *Taq* polimerasa 50 U/mL, dNTPs 400 µM, MgCl₂ 3mM y tampón de reacción. La mezcla de reacción estaba formada por 1 µL de cDNA molde; 2,5 µL de la pareja de oligonucleótidos específicos 10 µM; 12,5 µL de *PCR Master Mix* y 9 µL de H₂O libre de nucleasas, para llegar a un volumen final de 25 µL por muestra.

El programa de PCR consistió en una primera etapa de desnaturalización (5 minutos a 94 °C), seguida de una segunda etapa de 40 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94 °C), anillamiento (30 segundos) y extensión (45 segundos a 72 °C) para terminar con una tercera etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. La temperatura de anillamiento osciló entre 55 y 60 °C, dependiendo de los oligonucleótidos empleados, y la secuencia de éstos se especifica en la tabla 6. De esta forma se validaron todos los oligonucleótidos antes de realizar los ensayos de PCR cuantitativa.

Electroforesis de DNA

Los productos de PCR fueron analizados mediante una electroforesis de DNA en un gel de agarosa al 2 % (p/v), en tampón TAE (0,04 M Tris acetato a pH 8,3 y 1 mM EDTA), en presencia de bromuro de etidio al 0,005 % (v/v). Los productos de PCR fueron fotografiados utilizando un transiluminador de luz ultravioleta. Se realizó una electroforesis simultánea de cada muestra para amplificar el gen β -actina, que sirvió como control de carga.

3.2.15. Cuantificación del mRNA de proteínas específicas mediante PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa (qPCR) o *real-time PCR* es una PCR tradicional preparada para poder cuantificar las muestras obtenidas, ya que esta última tiene como principal inconveniente la no cuantificación de los productos generados. En lugar de la PCR tradicional, la qPCR no requiere procesos posteriores para analizar el resultado, tales como electroforesis y análisis de imagen.

La qPCR consiste, esencialmente, en una PCR convencional a la que se añade una sonda fluorescente que permite la cuantificación de los productos de PCR generados ciclo a ciclo, mediante un análisis a tiempo real. Para ello, requerimos el uso de un termociclador (*Mastercycler ep realplex*, Eppendorf) acoplado a un sistema de detección de fluorescencia.

Además de una adecuada obtención, procesamiento y purificación de las muestras, es necesario obtener una alta eficiencia de la reacción, que viene determinada por la idoneidad de los oligonucleótidos. Para ello, calculamos la eficiencia con cuatro concentraciones diferentes de cDNA (1000, 500, 100 y 10 ng/ μ L) para una misma pareja de oligonucleótidos. Así, obtuvimos una recta patrón para establecer el rango dinámico de las muestras. De esta forma, decidimos trabajar en todos los ensayos partiendo de muestras de cDNA a una concentración de 500 ng/ μ L.

El parámetro fundamental de análisis en una qPCR es el ciclo umbral (C_t), que es el ciclo al cual la fluorescencia (que aumenta a lo largo de la qPCR) es estadísticamente significativa por encima del fondo de ruido. De este modo, el C_t determina el ciclo inicial de amplificación y es inversamente proporcional al número inicial de copias del molde. Se empleó el fluoróforo SYBR® Green, que es un agente intercalante de DNA de doble cadena, que se excita a 497 nm y emite un pico de fluorescencia máxima a 520 nm.

La mezcla de reacción consistió en: 10 μL de la mezcla *SYBR® Green Master Mix* (que contiene la polimerasa), 0,8 μL de la pareja de oligonucleótidos específicos 10 μM , 8,2 μL de H_2O libre de nucleasas y 1 μL de cDNA 500 ng/ μL . También se prepararon controles negativos libres de cDNA o de oligonucleótidos.

El programa de PCR consistió en una primera etapa de desnaturalización (5 minutos a 94 °C), seguida de una segunda etapa de 40 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94 °C), anillamiento (30 segundos a 60 °C) y extensión (45 segundos a 72 °C), para terminar con una tercera etapa de extensión final de 10 minutos a 72 °C. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se especifica en la tabla 6. Se validaron tres genes de referencia o *housekeeping*, de los cuales se utilizó la β -actina en todos los ensayos como gen endógeno. Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó un método de cuantificación relativa o “método de las *Ct*” (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008), que consistió en normalizar las *Ct* del gen objeto de estudio o *target* y del gen endógeno o *housekeeping* para cada condición a estudiar.

3.2.16. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los datos utilizamos *Microsoft Office Excel 2007* y el programa *SPSS 18* para Windows. En este último caso, tras la recolección de los datos, éstos fueron organizados en una matriz y clasificados en variables. La variable independiente fue una variable categórica cualitativa (línea celular, tratamiento empleado o tiempo de incubación) y la variable dependiente fue una cuantitativa continua (% de expresión proteica o génica). Consideramos las medidas independientes (no pareadas). Una vez organizados los datos en la matriz, procedimos a la determinación de diferencias estadísticas entre las categorías o grupos.

Para el análisis estadístico se utilizó el test *t* de Student cuando el número de grupos o categorías fue igual a 2 ($k = 2$), o el test ANOVA de un factor cuando el número de categorías a comparar fue mayor de 2 ($k > 2$). Para todas las comparaciones consideramos las diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados se presentan como medias $\pm$ error estándar de la media de, como mínimo, tres experimentos independientes. Para determinar el nivel de significación, tras realizar un análisis de varianza, se realizó ensayo *post-hoc*, como es el test de Bonferroni.

Esquema 21. Representación gráfica de los ciclos C_t y las temperaturas de amplificación de los genes estudiados.

4.1 Caracterización de las células trisómicas.

Las líneas celulares derivadas del modelo murino de síndrome de Down Ts16, son una herramienta útil para conocer en profundidad los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis del SD. Las líneas celulares CNh y CTb derivan de la corteza cerebral de fetos de ratones silvestres y de ratones con trisomía 16, respectivamente. Estas células han sido caracterizadas en el laboratorio del Dr. Caviedes, poseen marcadores específicos de células neurales y carecen de marcadores gliales típicos (Saud et al., 2006). Dado que desconocemos cómo se comportan en cultivo, su fenotipo, supervivencia o muerte celular a lo largo del tiempo, nos propusimos inicialmente realizar unos ensayos para caracterizar estas células.

4.1.1 Fenotipo, supervivencia y muerte celular.

Las condiciones en las que se mantienen las líneas celulares son en general muy diversas y existen numerosos medios de cultivo para este propósito (Jayme and Blackman, 1985). Teniendo en cuenta que las líneas celulares CNh y CTb tienen características neuronales, decidimos utilizar un medio de cultivo de uso común en nuestro laboratorio para el cultivo de neuronas. Este medio contiene sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, D-glucosa, HEPES, piruvato sódico y está suplementado además con N-2 y L-glutamina (ver apartado 3.2.1.1. de Métodos). En primer lugar decidimos analizar el fenotipo de estas células en dicho medio en presencia o ausencia del factor neurotrófico ácido oleico.

Para ello, las dos líneas celulares se incubaron en medio definido en presencia de albúmina sérica bovina (BSA), que se utilizó como control, o en presencia de ácido oleico, que se administró formando un complejo con BSA, y se mantuvieron durante 96 horas en un incubador a 37 °C y 5 % CO₂, para observar el fenotipo celular a lo largo del tiempo.

Tal y como se observa en la figura 1, el comportamiento de ambas líneas celulares en presencia de BSA es prácticamente indistinguible en el transcurso de la incubación. Sin embargo, cuando cultivamos las células en presencia del complejo BSA-ácido oleico el comportamiento varía con el tiempo. Así, mientras que en las células CNh la agrupación celular comienza a las 48 horas de cultivo, en las células CTb comienza a las 72 horas (figura 2). Además, podemos observar que las células de la línea CNh adquieren un fenotipo totalmente agrupado a las 96 horas de cultivo,

mientras que las células CTb comienzan a agruparse entre sí, como les sucedía a las CNh a las 72 horas.

Figura 1: Fotomicrografías de las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) y se tomaron imágenes a diferentes tiempos utilizando un microscopio invertido. Barra de calibrado: 100 μ m.

Figura 2: Fotomicrografías de las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M y se tomaron imágenes a diferentes tiempos utilizando un microscopio invertido. Barra de calibrado: 100 μ m.

Para comprobar que en nuestras condiciones de cultivo, y más concretamente en presencia de ácido oleico, no existía muerte celular, se realizaron ensayos de TUNEL. Este tipo de ensayos permite la identificación de cuerpos apoptóticos. En general, el método TUNEL indica apoptosis en estadios tardíos de células que, claramente, van a morir por apoptosis de manera irreversible.

Se incubaron las células en medio definido en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico. Se fijaron a diferentes tiempos y posteriormente se realizó la tinción inmunocitoquímica correspondiente a la técnica TUNEL, empleándose DAPI para teñir los núcleos celulares. A continuación, se tomaron imágenes a distintos tiempos, utilizando un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

En la figura 3 se representan fotomicrografías de la línea CNh en presencia de albúmina a distintos tiempos. En ellas se observa un ligero incremento de células TUNEL positivas a partir de las 72 horas en cultivo. En la figura 4, se representan fotomicrografías de la línea CTb en presencia de albúmina a distintos tiempos. A partir de las 72 horas en cultivo, en la línea CTb se aprecia un incremento de células apoptóticas en comparación con la línea CNh .

En las figuras 5 y 6 se representan fotomicrografías de las líneas CNh y CTb en presencia de ácido oleico a distintos tiempos. Cuando las dos líneas celulares se incuban en presencia del complejo BSA-ácido oleico, el número de células apoptóticas observado es menor que en la condición con BSA en ambas líneas celulares (figuras 5 y 6). Además, se distingue un aumento en la proliferación celular a partir de las 48 horas en presencia de ácido oleico en los dos tipos celulares. Sin embargo, el complejo BSA-ácido oleico no inducía muerte celular por apoptosis. La figura 7 resume la cuantificación de los resultados obtenidos, tras realizar recuentos de células apoptóticas (TUNEL+) y células totales a distintos tiempos.

Figura 3: Determinación de la muerte celular por apoptosis en la línea celular euploide (CNh) en presencia de BSA. Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v). A los tiempos indicados, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) y se realizó la técnica de TUNEL, tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados y se tomaron varias imágenes por placa. Se contaron las células apoptóticas (TUNEL) y se compararon con el número de células totales (DAPI). Barra de calibrado: 100 μ m. CF: Contraste de fases.

Figura 4: Determinación de la muerte celular por apoptosis en la línea celular trisómica (CTb) en presencia de BSA. Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v). A los tiempos indicados, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) y se realizó la técnica de TUNEL, tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados y se tomaron varias imágenes por placa. Se contaron las células apoptóticas (TUNEL) y se compararon con el número de células totales (DAPI). Barra de calibrado: 100 μ m. CF: Contraste de fases.

Figura 5: Determinación de la muerte celular por apoptosis en la línea celular euploide (CNh) en presencia de ácido oleico. Las células se incubaron en medio definido, en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M. A los tiempos indicados, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) y se realizó la técnica de TUNEL, tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados y se tomaron varias imágenes por placa. Se contaron las células apoptóticas (TUNEL) y se compararon con el número de células totales (DAPI). Barra de calibrado: 100 μ m. CF: Contraste de fases.

Figura 6: Determinación de la muerte celular por apoptosis en la línea celular trisómica (CTb) en presencia de ácido oleico. Las células se incubaron en medio definido, en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M. A los tiempos indicados, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) y se realizó la técnica de TUNEL, tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados y se tomaron varias imágenes por placa. Se contaron las células apoptóticas (TUNEL) y se compararon con el número de células totales (DAPI). Barra de calibrado: 100 μ m. CF: Contraste de fases.

Figura 7: Determinación del número de células totales (A) y de células apoptóticas (B) en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M. A los tiempos indicados, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v) y se realizó la técnica de TUNEL, tal y como se describe en Material y Métodos. Se tomaron varias imágenes por placa y se contaron el número de células apoptóticas (TUNEL) y de células totales (DAPI). Los datos se obtuvieron tras realizar contejes mediante el programa de imagen *ImageJ* y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los distintos grupos respecto a CNh en presencia de BSA a cada tiempo se expresa como *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 (Test *t* de Student).

4.1.2 Velocidad de la vía glucolítica.

Estudios previos en la literatura indican que existe una disfunción mitocondrial en la corteza cerebral de los ratones Ts16 (Bambrick and Fiskum, 2008), asociada a un descenso en los niveles de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), hecho que se relaciona con el estrés oxidativo. La PDH cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del piruvato. Con el objetivo de medir la actividad de la PDH en las líneas CNh y CTb, se determinó la producción de CO₂ marcado radioactivamente durante la incubación con D-[3,4-¹⁴C] glucosa.

Para ello, se incubaron las células en frascos de cultivo con medio definido durante 24 horas, en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico. La determinación de la incorporación de glucosa en CO₂ se describe en Material y Métodos. Tras una hora de incubación con D-[3,4-¹⁴C] glucosa, la reacción se paró inyectando HClO₄ 5 M. Las tiras de papel (bañadas en hiamina, que retiene el CO₂ impregnado) se introdujeron en viales que contenían líquido de centelleo.

La figura 8 muestra el análisis de los datos obtenidos en un contador de centelleo. En ella se observa que en la línea celular trisómica (CTb) la producción de CO₂ es mayor que en la línea euploide (CNh), con independencia de la condición analizada. Esta diferencia es significativa cuando las células se incubaron sólo en medio definido, ya que la cantidad de CO₂ producido se duplica en CTb en dicha condición. Asimismo, se aprecia cómo el desequilibrio en la cantidad de CO₂ producido entre las dos líneas celulares se reduce en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico de forma progresiva. Los valores en la línea celular euploide (CNh) descienden paulatinamente en el transcurso de la incubación realizada, pasando de unos 9 nanomoles de CO₂ en medio definido a valores en torno a 7 nanomoles de CO₂ en presencia del complejo BSA-ácido oleico. Estos resultados muestran una cierta regularidad en esta vía, de forma que el ácido oleico es capaz de regular la vía glucolítica, mediante retroalimentación negativa de la piruvato deshidrogenasa (PDH), de ahí que se observe una menor actividad de esta enzima en presencia del ácido graso.

Figura 8: Actividad de piruvato deshidrogenasa (PDH) en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se sembraron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 24 horas. Posteriormente, las células se incubaron en medio Elliot con glucosa 5 mM y 100-300 dpm/nmol de [3,4- ¹⁴C] glucosa durante 1 hora. Después del tiempo de incubación, se inyectó ácido perclórico 5M para liberar el ¹⁴CO₂ generado, tal y como se describe en Material y Métodos. Las muestras se analizaron en un contador de centelleo. Se recogieron muestras de forma paralela para determinar el número de células mediante un contador automático. Los resultados se expresan como nanomoles de CO₂ por millón de células y por hora de incubación y son medias $\pm$ SEM (n=8). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las células trisómicas respecto a las células euploides se expresa como **p<0,01 (Test *t* de Student).

4.1.3 Producción de especies reactivas de oxígeno.

Desde hace décadas, se sabe que en SD existe un desequilibrio a nivel mitocondrial, lo que se traduce en una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Kedziora and Bartosz, 1988). El aumento de ROS está asociado a un incremento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD-1), cuyo gen se localiza en el cromosoma 21 humano. Además, otros autores señalan un aumento en la generación de anión superóxido en neuronas de ratones Ts16, probablemente como consecuencia de un fallo en el complejo I mitocondrial de la cadena de transporte de electrones (Schuchmann and Heinemann, 2000).

Teniendo en cuenta estos precedentes, en este trabajo nos planteamos conocer si existían diferencias en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) entre las dos líneas

celulares estudiadas. Para ello, las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico a diferentes tiempos. Para cuantificar la producción de ROS, las células se incubaron en presencia del fluoróforo 2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Paralelamente, se realizaron ensayos de colorimetría con MTT (ver apartado 3.2.5. de Material y Métodos) para medir la viabilidad celular y así normalizar los datos obtenidos de producción de ROS.

En la figura 9 se representa la producción de ROS y el porcentaje de viabilidad celular en las líneas celulares CNh y CTb desde las 4 hasta las 48 horas en cultivo. Los resultados obtenidos muestran que en las dos líneas celulares la producción de ROS en medio definido es mayor que en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico. Así, la incubación con BSA o complejo BSA-ácido oleico disminuye drásticamente la fluorescencia emitida con el tiempo, sin afectar significativamente la viabilidad celular.

La figura 10 muestra la producción de ROS y el porcentaje de viabilidad celular a las 72 y 96 horas de cultivo. A partir de las 72 horas, la producción de ROS en la línea celular trisómica en medio definido se duplica respecto a la misma condición en CNh, siendo estas diferencias de fluorescencia aún más significativas a las 96 horas. Del mismo modo, a estos tiempos de cultivo se sigue manteniendo el efecto protector de la BSA que se había observado previamente. Con respecto a la viabilidad celular, a las 72 horas cultivo se observa un incremento en el número de células vivas en presencia del complejo BSA-ácido oleico. Este efecto se produce en las dos líneas celulares. Por otra parte, a las 96 horas de cultivo se observan diferencias significativas de viabilidad entre ambas líneas celulares en presencia de BSA y del complejo BSA-ácido oleico. Así, existe un mayor número de células en la línea CTb en comparación con la línea CNh.

Figura 9: Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M. A diferentes tiempos, las células se incubaron con DCF (diclorofluoresceína) durante una hora. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al porcentaje de viabilidad celular en cada condición, mediante el ensayo colorimétrico con MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los datos son medias $\pm$ SEM (n=3) y la significatividad de las diferencias entre los distintos grupos respecto a CNh en cada condición y tiempo se expresa como *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 (Test *t* de Student).

Figura 10: Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M. A diferentes tiempos, las células se incubaron con DCF (diclorofluoresceína) durante una hora. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al porcentaje de viabilidad celular en cada condición, mediante el ensayo colorimétrico con MTT, tal y como se describe en Material y Métodos. Los datos son medias $\pm$ SEM (n=3) y la significatividad de las diferencias entre los distintos grupos respecto a CNh en cada condición y tiempo se expresa como *p<0,05; **p<0,01 y ***p<0,001 (Test *t* de Student).

4.2 Efecto del ácido oleico sobre la expresión de la colina acetiltransferasa (ChAT) en modelos de síndrome de Down.

El déficit colinérgico es característico tanto en pacientes con SD como en modelos murinos. Así, estudios previos describen la degeneración de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal de ratones Ts16 (Corsi and Coyle, 1991; Fiedler et al., 1994), junto a una menor producción del neurotransmisor acetilcolina durante la despolarización de la vesícula presináptica. Del mismo modo, estudios neuroquímicos de sinapsis han demostrado que los cerebros de pacientes con SD muestran una reducción significativa de la actividad de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) en la corteza cerebral (Yates et al., 1983). La enzima ChAT es limitante en la formación del neurotransmisor acetilcolina, dada su capacidad para transferir una molécula de acetato a colina a partir de acetil-CoA. Teniendo en cuenta su relevancia como proteína marcadora de diferenciación colinérgica, decidimos estudiar su expresión en modelos de SD.

4.2.1 Efecto del ácido oleico sobre la expresión de ChAT en células trisómicas.

Trabajos previos realizados por (Massarelli et al., 1988) ponen de manifiesto la importancia del ácido oleico en el sistema colinérgico. Teniendo en cuenta estos precedentes, planteamos la hipótesis de si el ácido oleico podía aumentar los niveles de ChAT en nuestro modelo celular con trisomía. Para ello, se incubaron las líneas celulares, CNh y CTb en medio definido en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico durante 72 horas y se analizó la expresión de ChAT mediante análisis de transferencia tipo *Western blot* e inmunocitoquímica, tal y como se describe en Material y Métodos.

En la figura 11 se representan imágenes del análisis mediante inmunocitoquímica de los niveles de ChAT en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico en las dos líneas celulares. Podemos observar que la expresión de ChAT (verde) es mayor en la línea celular euploide en presencia del complejo BSA-ácido oleico. Con la intención de cuantificar este incremento en la expresión de ChAT en presencia de BSA-ácido oleico se utilizó el programa de análisis *Image J*. Se midieron las áreas fluorescentes en todas las condiciones y se observó que existe un incremento significativo de un 40 % en la expresión de ChAT en las células euploides en presencia del complejo BSA-ácido oleico, respecto a la misma línea celular en presencia de BSA (figura 12A). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de ChAT entre las condiciones de BSA y el complejo BSA-ácido oleico de las células trisómicas.

Figura 11: Expresión de la colina acetiltransferasa (ChAT) en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 72 horas. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído 4% (p/v). La inmunocitoquímica de la proteína ChAT (verde) se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Para la visualización fluorescente de los núcleos celulares se utilizó DAPI (azul). Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia. Barra de calibrado: 30 μ m.

Con el fin de comprobar que el incremento en la expresión de ChAT mediado por el complejo BSA-ácido oleico no era debido a un aumento en el número de células, se realizó un recuento del número de células ChAT positivas y del número total de núcleos por fotomicrografía. Los datos obtenidos nos muestran que no existen diferencias en el número de células que expresan la proteína ChAT en todas las condiciones estudiadas, tal y como se aprecia en la figura 12B.

Figura 12: Expresión de la colina acetiltransferasa (ChAT) en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 72 horas. **A)** Intensidad de la expresión de ChAT en las diferentes condiciones. Los resultados se obtuvieron a partir de la medición de áreas fluorescentes, mediante el programa de imagen *ImageJ*. La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las células CNh en presencia de ácido oleico con respecto a las mismas células en presencia de BSA se expresa como ** $p < 0.01$ (Test *t* de Student). **B)** Número de células ChAT positivas en relación a la población celular total. La inmunocitoquímica de la proteína ChAT se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Para la visualización fluorescente de los núcleos celulares se utilizó DAPI. Se tomaron 5 fotomicrografías por placa y se contaron el número de núcleos, así como el número de células ChAT positivas.

Para confirmar que el complejo BSA-ácido oleico no incrementaba la expresión de ChAT en las células trisómicas, se realizaron análisis de transferencia tipo *Western blot*. Para ello, los dos tipos celulares se incubaron en medio definido en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron en un tampón para la extracción de proteínas y posteriormente se procesaron tal y como se describe en Material y Métodos. En la figura 13, se resumen los resultados obtenidos. En ellos, se observa un incremento de expresión de ChAT en torno a un 60 % en la línea CNh en presencia del complejo BSA-ácido oleico, respecto a la misma línea celular en presencia de BSA. Sin embargo, en la línea celular trisómica los niveles de ChAT son similares en las distintas condiciones de incubación. Tomados en su conjunto, estos resultados confirman los obtenidos previamente en los análisis mediante inmunocitoquímica, confirmando que el complejo BSA-ácido oleico no es capaz de incrementar la expresión de ChAT en la línea celular trisómica.

Figura 13: Expresión de la colina acetiltransferasa (ChAT) en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 72 horas. Posteriormente, las células se recogieron en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados son expresados como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=5). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las células CNh en presencia de ácido oleico con respecto a las mismas células en presencia de BSA se expresa como ***p<0.001 (Test *t* de Student).

4.2.2 Efecto del silenciamiento de *Dyrk1A* sobre la expresión de ChAT en células trisómicas.

Diversos genes del cromosoma 21 o su combinación e interacción con otros genes de otros cromosomas marcan el mecanismo biológico de los distintos fenotipos que se observan en SD (ver revisión (Antonarakis et al., 2004)). Teniendo en cuenta los datos obtenidos en estudios experimentales durante los últimos años, se ha propuesto que el gen *Dyrk1A* podría desempeñar un papel importante en las alteraciones neurológicas del SD, tanto durante la gestación como en la vida adulta, debido a su participación en diversos aspectos estructurales y funcionales del Sistema Nervioso Central (SNC) (ver revisión (Dierssen and de Lagran, 2006)). DYRK1A (*dual-specificity tyrosine (Y)-regulated kinase*) ha sido propuesta como uno de los genes del cromosoma 21 humano con un papel relevante en las funciones cerebrales alteradas en SD (ver revisión (Rachidi and Lopes, 2008)). DYRK1A está sobreexpresado en los cerebros de pacientes con SD (Dowjat et al., 2007; Guimera et al., 1999) y está implicado en neurogénesis (Hammerle et al., 2008; Hammerle et al., 2002; Tejedor et al., 1995), así como en procesos de memoria y aprendizaje (Kleschevnikov et al., 2004).

Con el objetivo de profundizar en las bases moleculares que regulan la expresión de ChAT en respuesta a la incubación con ácido oleico, se estudiaron los efectos de este ácido graso cuando silenciábamos la expresión de *Dyrk1A* en las líneas celulares CNh y CTb.

Para ello, las células se incubaron en medio definido sin antibiótico y se transfectaron con pequeñas secuencias de interferencia de RNA, específicas para *Dyrk1A* (*Dyrk1A*-siRNA), durante 24 horas. Como control de la transfección se utilizó un oligonucleótido validado como “non-target” (NT-siRNA), que carece de mRNA diana. Posteriormente, las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico durante 48 horas. Por último, se tomaron distintas fotomicrografías con un microscopio invertido para determinar el fenotipo de ambas líneas celulares. Como se observa en la figura 14, el ácido oleico promueve una agrupación celular en las células trisómicas tras silenciar *Dyrk1A*, similar a la observada en la línea celular euploide sin transfectar en presencia de ácido oleico.

Figura 14: Fenotipo de las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb) tras la inhibición de la expresión de *Dyrk1A* mediante un siRNA específico. La expresión de *Dyrk1A* se silenció mediante transfección con un RNA de interferencia específico (*Dyrk1A*-siRNA) durante 24 horas, tal y como se describe en Material y Métodos. También se utilizó un control sin diana (NT-siRNA) y un control sin trasfectar (CONTROL). Posteriormente, las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 48 horas. Barra de calibrado: 100 μ m.

Posteriormente, las células incubadas en presencia del complejo BSA-ácido oleico se recogieron en un tampón para la extracción de proteínas y se realizaron ensayos de tipo *Western blot* para cuantificar los niveles de DYRK1A. La figura 15 muestra que los niveles de DYRK1A están aumentados en las células trisómicas. Este incremento es de un 40 % respecto a las células CNh, tanto en las células sin transfectar (CONTROL) como en el control de la transfección (NT-siRNA). Estos valores están en concordancia con la presencia de una copia extra del gen *Dyrk1A* en las células trisómicas. Mediante la transfección de siRNA específicos de *Dyrk1A* se consiguió una reducción de la expresión de la proteína DYRK1A en torno al 75 % en células CNh y un 70 % en células CTb.

Cuando analizamos la expresión de ChAT en las células trisómicas en presencia del complejo BSA-ácido oleico, se observa que los niveles de expresión de la proteína están reducidos en las condiciones control y NT-siRNA de células trisómicas en comparación a las células euploides, de forma similar a lo que habíamos visto anteriormente con células sin transfectar. Sin embargo, tras silenciar la expresión de DYRK1A en ambas líneas celulares, la expresión de ChAT fue similar en ambos casos. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de DYRK1A previene la expresión de ChAT promovida por el ácido oleico en las células trisómicas.

Figura 15: Análisis de la expresión de las proteínas DYRK1A y ChAT en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb) tras la inhibición de la expresión de *Dyrk1A* mediante un siRNA específico. La expresión de *Dyrk1A* se silenció mediante transfección con un RNA de interferencia específico (Dyrk1A-siRNA) durante 24 horas, tal y como se describe en Material y Métodos. También se utilizó un control sin diana (NT-siRNA) y un control sin trasfectar (CONTROL). Posteriormente, las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 48 horas. Por último, las células se recogieron en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos con respecto a CNh en la condición CONTROL se expresa como **p<0.01 y *** p<0.001 (Test *t* de Student).

4.2.3 Efecto del ácido oleico en neuronas procedentes de ratones transgénicos que sobreexpresan *Dyrk1A*.

Los ratones transgénicos que sobreexpresan *Dyrk1A* (TgDyrk1A) exhiben características del SD, tales como retraso en el neurodesarrollo, anomalías motoras y déficits cognitivos (Altafaj et al., 2001; Martínez de Lagran et al., 2004), tal y como se ha descrito en el apartado 1.2.4.1. de la Introducción.

Figura 16: Diferenciación neuronal promovida por el ácido oleico en cultivo primario de neuronas procedentes de fetos de tipo silvestre y transgénicos. A) Reacción en cadena de la polimerasa, para amplificar los genes *Dyrk1A* y *β-actina* de distintos fetos. Los resultados se visualizaron en un gel de agarosa, utilizando un transiluminador de luz UV. **B)** Fotomicrografías de neuronas procedentes de fetos de tipo silvestre (WT) y fetos transgénicos de *Dyrk1A* (TgDyrk1A) tras 72 horas en medio definido en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 50 μ M. Se tomaron 3 imágenes por placa. Barra de calibrado: 50 μ m.

Para evaluar el posible papel de DYRK1A en la regulación de la expresión de ChAT promovida por el ácido oleico, analizamos los niveles de ChAT en cultivos primarios de neuronas procedentes de ratones de tipo silvestre y de ratones que sobreexpresan *Dyrk1A* (TgDyrk1A).

Para conocer qué fetos sobreexpresaban *Dyrk1A* y cuáles eran de tipo silvestre, se analizó cada uno de ellos de forma independiente. Una vez realizada la histerectomía a la gestante, se realizó un cultivo primario a partir del cerebro de cada feto. El resto del tejido se utilizó para genotipar los fetos. Para ello, se extrajo el DNA y mediante PCR se analizó la presencia o ausencia del gen *Dyrk1A* insertado. En la figura 16A, se muestran los 10 primeros fetos analizados. Finalmente, se analizaron 23 fetos, de los cuales 8 fueron positivos para el transgénico *Dyrk1A* y 15 fueron fetos de tipo silvestre.

Como se ha mencionado anteriormente, cada cerebro fue tratado de forma individual y las neuronas procedentes del mismo se incubaron en medio definido en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico. A las 72 horas de cultivo, se tomaron fotomicrografías con un microscopio invertido, para evaluar el efecto neurotrófico del ácido oleico. En la figura 16B se observa que en las neuronas procedentes de fetos de tipo silvestre, el complejo BSA-ácido oleico promueve diferenciación neuronal, mediante la agrupación de los cuerpos neuronales y las prolongaciones axonales y dendríticas. Este efecto, por el contrario, no se observó en las neuronas procedentes de los fetos transgénicos.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el ácido oleico induce la expresión de la proteína asociada al crecimiento axonal (GAP-43) en cultivos primarios de neuronas de rata (Tabernero et al., 2001). GAP-43 se localiza fundamentalmente en los axones y sobre todo, en los conos de crecimiento. Su expresión es máxima durante los procesos de crecimiento axonal, tanto durante el desarrollo neuronal como en procesos de regeneración (Skene and Virag, 1989). Teniendo en cuenta estos precedentes, se analizó mediante ensayos de *Western blot* la expresión de GAP-43 en los cultivos de las neuronas procedentes de los fetos de tipo silvestre y de los fetos transgénicos. Después de 72 horas en cultivo en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico, las neuronas se recogieron en un tampón para la extracción de proteínas.

En la figura 17, se observa que la expresión del marcador axonal GAP-43 está aumentada, aproximadamente un 30 %, en las neuronas procedentes de fetos de tipo silvestre en presencia del complejo BSA-ácido oleico, mientras que permanece inalterada en las neuronas TgDyrk1A. Estos resultados nos permiten concluir que la sobreexpresión de *Dyrk1A* en las neuronas de fetos TgDyrk1A impide que el ácido oleico actúe como factor neurotrófico.

Figura 17: Expresión de la proteína asociada al crecimiento axonal GAP-43 en cultivo primario de neuronas procedentes de fetos de tipo silvestre y transgénicos. Las neuronas se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 50 μ M durante 72 horas. Posteriormente, las neuronas se recogieron en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las neuronas de fetos de tipo silvestre (WT) en presencia del complejo BSA-ácido oleico con respecto al mismo grupo en presencia de BSA se expresa como **p<0.01 (Test *t* de Student).

Con el fin de comprobar si el ácido oleico induce la expresión de ChAT en los cultivos de neuronas procedentes de fetos TgDyrk1A, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica y de tipo *Western blot*. Para ello, las neuronas se incubaron en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico durante 72 horas. Posteriormente, las neuronas se fijaron y se tomaron imágenes con un microscopio láser confocal (figura 18A). En estas imágenes se comprueba que existe un aumento de la expresión de ChAT (verde) en las neuronas de fetos de tipo silvestre en presencia del factor neurotrófico ácido oleico en comparación con las neuronas incubadas únicamente con BSA. Sin embargo, no se observan diferencias de expresión de ChAT en los cultivos de neuronas de fetos TgDyrk1A en las dos condiciones estudiadas. Además, el análisis de los niveles de ChAT mediante *Western blot* mostró un aumento de los niveles de expresión de esta proteína en presencia del complejo BSA-ácido oleico en las neuronas de fetos de tipo silvestre, pero no así en las neuronas procedentes de fetos TgDyrk1A (figura 18B). Tomados en su conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *Dyrk1A* impide la diferenciación colinérgica promovida por el ácido oleico.

Figura 18: Expresión de la colina acetiltransferasa (ChAT) en cultivo primario de neuronas procedentes de fetos de tipo silvestre y transgénicos. Las neuronas se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 50 μ M durante 72 horas. **A)** Inmunocitoquímica de la proteína ChAT (verde), que se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se tomaron con un microscopio láser confocal. Barra de calibrado: 50 μ m. **B)** Las neuronas se recogieron en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las neuronas de fetos de tipo silvestre (WT) en presencia del complejo BSA-ácido oleico respecto al mismo grupo en presencia de BSA se expresa como **p<0.01 (Test *t* de Student).

4.3 Estudio del efecto del ácido oleico sobre la síntesis de fosfatidilcolina en células trisómicas.

4.3.1. Captación de ácido oleico. Implicación de *Dyrk1A*.

Tras caracterizar la disfunción colinérgica que presentaban las células trisómicas, nos planteamos la hipótesis de si la falta de efecto del ácido oleico se debía a una posible anomalía en su entrada al interior celular. Además, teniendo en cuenta que la sobreexpresión de DYRK1A estaba modulando el efecto del ácido oleico en las células procedentes del ratón Ts16, decidimos analizar si el mecanismo de entrada del ácido oleico al interior celular en las células trisómicas estaba mediado por la actividad de DYRK1A.

Para ello, las células CNh y CTb se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico y ácido oleico marcado radioactivamente conjugado con BSA, tal y como se describe en el apartado 3.2.10. de Material y Métodos. Las muestras se recogieron y se analizaron en un contador de centelleo para conocer la cantidad de ácido oleico que habían captado las células a diferentes tiempos.

En la figura 19A, se observa que la tendencia que tienen las células trisómicas para captar ácido oleico es similar a las células euploides. Además, a partir de las 24 horas se produce un ligero incremento no significativo en la captación de ácido oleico por parte de las células trisómicas con respecto a las células euploides. Este resultado sugiere que el hecho de que el ácido oleico no ejerza su efecto neurotrófico sobre las células trisómicas, de la misma forma que en las células CNh, no es debido a una menor captación del ácido graso por parte de las células trisómicas.

Figura 19 : Captación de ácido oleico en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). **A)** Las células se sembraron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M y 9000-12000 dpm/nmol de [1^{14} C] ácido oleico en presencia de BSA 2 % (p/v). Las muestras se recogieron a diferentes tiempos y se analizaron en un contador de centelleo. En esta misma muestra se analizó el contenido de proteínas mediante un fluorímetro. Los resultados se expresan como nanomoles de ácido oleico por miligramo de proteína presente en la muestra y son medias $\pm$ SEM (n=9). **B)** Utilizando siRNA específicos, se silenció la expresión de *Dyrk1A* (Dyrk1A-siRNA) en las células CTb durante 72 horas, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). También se utilizó una condición control sin transfección (CONTROL). Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M y 9000-12000 dpm/nmol de [1^{14} C] ácido oleico en presencia de albúmina 2 % (p/v). Después del tiempo de incubación, las muestras se recogieron y se analizaron en un contador de centelleo. En esta misma muestra se analizó el contenido de proteínas mediante un fluorímetro. Los resultados se expresan como nanomoles de ácido oleico por miligramo de proteína y son medias $\pm$ SEM (n=9). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos de la cantidad de ácido oleico captado en las células CTb respecto a las células CNh CONTROL o CTb NT-siRNA se expresa como *p<0,05 (Test *t* de Student).

Por otra parte, quisimos conocer si la sobreexpresión de *Dyrk1A* estaba mediando la captación de ácido oleico en las células trisómicas. Para ello, se silenció la expresión de *Dyrk1A* en las células CTb durante 72 horas. Posteriormente, las células se incubaron durante una hora en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico y ácido oleico marcado radioactivamente conjugado con BSA. Tal y como se observa en la figura 19B, la captación de ácido oleico es significativamente mayor en las células trisómicas que en las células euploides (aproximadamente un 20 %). Además, al silenciar la expresión de *Dyrk1A* en las células trisómicas, los niveles de captación son prácticamente idénticos a los de las células euploides.

4.3.2. Localización de ácido oleico. Implicación de *Dyrk1A*.

Una vez cuantificada la captación de ácido oleico, decidimos analizar su localización celular, así como su destino preferente en el interior celular. Para ello, las células se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico conjugado con biotina, durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron ensayos de detección con estreptavidina, que se encuentra conjugada con un fluoróforo (Cy2) (verde). Los núcleos celulares se tiñeron con *TO-PRO*[®]-3 (azul). El protocolo completo se detalla en el apartado 3.2.11. de Material y Métodos. A continuación, se tomaron imágenes utilizando un microscopio láser confocal. Los niveles de ganancia/pérdida se ajustaron con un control que sólo contenía la propia biotina que contiene la célula.

La figura 20 muestra la localización del ácido oleico conjugado con biotina en las dos líneas celulares. En las imágenes obtenidas, se observa un mayor marcaje de ácido oleico en la membrana plasmática de las células euploides respecto a las trisómicas, delimitando el contorno de la célula. Asimismo, también podemos visualizar el ácido oleico-biotina en el interior celular, principalmente alrededor del núcleo. Sin embargo, en las células trisómicas el marcaje del ácido oleico conjugado con biotina es más difuso, a lo largo de toda la extensión celular, sin poder observar una localización concreta.

Los resultados obtenidos anteriormente sugieren que el ácido oleico (AO-Biotina) tiende a localizarse en la membrana plasmática de las células euploides, a diferencia de lo que sucede en las células trisómicas. Por este motivo, nos preguntamos si la expresión de *Dyrk1A* pudiera estar impidiendo la correcta localización del ácido graso en la membrana plasmática.

Figura 20 : Localización intracelular del ácido oleico en células euploides (CNh) y trisómicas (CTb). Las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 15 μ M y ácido oleico conjugado con biotina 15 μ M en presencia de albúmina 2 % (p/v) durante 24 horas. La detección de ácido oleico conjugado con biotina se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Por último, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Cy2 (verde) y se tiñeron los núcleos celulares con *TO-PRO*[®]-3 (azul). En los casos que se indica, se silenció la expresión de *Dyrk1A* (*Dyrk1A*-siRNA) en las células CTb durante 72 horas, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). Las imágenes se tomaron con un microscopio láser confocal. Barra de calibrado: 25 μ m.

Para ello, se transfectaron las células CTb con siRNA específico de *Dyrk1A* y se silenció su expresión durante 72 horas. Como control de la transfección, se utilizó un siRNA que carecía de mRNA diana (NT-siRNA). Posteriormente, se sembraron las células mediante tripsinización y se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico conjugado con biotina durante 24 horas. Tal y como se observa en la figura 20, el silenciamiento de *Dyrk1A* en las células CTb promueve un mayor marcaje de ácido oleico en la membrana plasmática, visualizándose con precisión el contorno de la célula. Además, tal y como sucedía en la línea CNh, la distribución del ácido oleico es menos difusa, localizándose en el interior celular alrededor del núcleo. Estos resultados sugieren que la proteína quinasa DYRK1A podría participar activamente en la localización intracelular del ácido oleico.

El ácido oleico entra a la matriz mitocondrial por traslocación, donde sufre el proceso de β -oxidación, que conduce a la liberación de moléculas de acetyl-CoA, que ingresan en el ciclo de Krebs (Berg et al., 2012). Por otro lado, en el retículo endoplasmático liso tiene lugar la principal síntesis de lípidos complejos (Berg et al., 2012). Para profundizar en los estudios de localización subcelular del ácido oleico, decidimos comprobar si este ácido graso conjugado con biotina, cuando es captado en las células trisómicas, se localiza en otros orgánulos, como la mitocondria o el retículo endoplasmático.

Para ello, las células se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico conjugado con biotina, durante 24 horas. En los casos en los que se silenció la expresión de *Dyrk1A* en la línea celular trisómica, la transfección con siRNA específicos se realizó durante 24 horas y posteriormente se añadió el complejo BSA-ácido oleico conjugado con biotina, durante 24 horas. Posteriormente, las células se incubaron con el colorante *MitoTracker*[®] (rojo), para visualizar la localización de las mitocondrias o con el marcador fluorescente *RE-Tracker*[®] Red (rojo) para la detección del retículo endoplasmático. Por último, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Cy2 (verde) y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (azul). El procedimiento completo se detalla en el apartado 3.2.11. de Material y Métodos.

En figura 21 se muestra las imágenes obtenidas con microscopio láser confocal. En ellas se observa la colocalización entre el ácido oleico (AO-Biotina) y el marcador *Mitotracker*[®] en ambas líneas celulares. En la superposición de las imágenes (MERGE) se aprecia que el grado de colocalización es mayor en las células euploides respecto a las células trisómicas. Asimismo, cuando silenciamos la expresión de *Dyrk1A*, se aprecia un aumento en la colocalización de ácido

oleico en las mitocondrias en comparación con las células trisómicas sin transfectar. Este resultado sugiere que, además de la localización en la membrana plasmática, el ácido oleico se está oxidando en la mitocondria.

Figura 21: Colocalización intracelular del ácido oleico en mitocondria de células euploides (CNh) y trisómicas (CTb). Las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 15 μ M y ácido oleico conjugado con biotina 15 μ M en presencia de albúmina 2 % (p/v) durante 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron varias veces, y se incubaron con *MitoTracker*[®] (rojo) durante 30 minutos. La detección de ácido oleico conjugado con biotina se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Por último, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Cy2 (verde) y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (azul). En los casos que se indica, utilizando siRNA específicos, previamente se silenció la expresión de Dyrk1A (Dyrk1A-siRNA) en las células CTb, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). Las imágenes se tomaron con un microscopio láser confocal. Barra de calibrado: 25 μ m.

En el estudio de la colocalización del ácido oleico con el marcador fluorescente del retículo endoplasmático (figura 22), la superposición de las imágenes nos indica que existe similar marcaje en los dos tipos celulares. Sin embargo, al silenciar la expresión de *Dyrk1A* en la línea celular trisómica, se observa mayor colocalización que en las células que no han sido silenciadas.

Figura 22: Colocalización intracelular del ácido oleico en retículo endoplasmático de células euploides (CNh) y trisómicas (CTb). Las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 15 μ M y ácido oleico conjugado con biotina 15 μ M en presencia de albúmina 2 % (p/v) durante 24 horas. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído 4 % (p/v) y se incubaron con el marcador de retículo endoplasmático RE-Tracker® Red (rojo), durante 20 minutos. La detección de ácido oleico conjugado con biotina se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Por último, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con el fluoróforo Cy2 (verde) y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (azul). En los casos que se indica, previamente se silenció la expresión de *Dyrk1A* (*Dyrk1A*-siRNA) en las células CTb, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). Las imágenes se tomaron con un microscopio láser confocal. Barra de calibrado: 25 μ m.

4.3.3. Incorporación de ácido oleico en fosfatidilcolina.

En el modelo de mosaico fluido de la estructura de las membranas celulares (Singer and Nicolson, 1972), los fosfolípidos y el colesterol modulan la fluidez de la membrana plasmática. Así, las membranas con alto contenido en colesterol son más rígidas; sin embargo, las membranas con alto contenido en fosfolípidos con las cadenas laterales insaturadas producen un incremento de la fluidez (Alberts et al., 2008). Por otro lado, cada vez son más los trabajos que sugieren que los fosfolípidos desempeñan también un papel crucial como fuentes o moduladores de señales intracelulares (Bohdanowicz and Grinstein, 2013; Hannich et al., 2011). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio determinaron que la mayor incorporación de ácido oleico se producía en forma de fosfolípido en las membranas neuronales. De entre todas las especies fosfolipídicas presentes, la fosfatidilcolina (PC) era el fosfolípido que mayor cantidad de ácido oleico incorporaba (Tabernero et al., 2001).

4.3.3.1. Efecto del ácido oleico sobre la concentración de fosfatidilcolina en células trisómicas. Papel de *Dyrk1A*.

Dado que trabajos previos realizados con cultivos primarios de neuronas mostraban que el ácido oleico se incorpora preferentemente en las bases de las prolongaciones somáticas neuronales (Tabernero et al., 2001), podríamos sugerir que es necesario un incremento en la fluidez de la membrana en los sitios donde emergen nuevos axones y/o dendritas. En este sentido, se ha realizado una cuantificación del número de células que poseen 2 o más prolongaciones en presencia de ácido oleico en los dos tipos celulares. Los resultados obtenidos muestran que las células euploides forman más prolongaciones y más extensas, en comparación con las células trisómicas (Lantigua, 2013). Como el fosfolípido mayoritario que compone las membranas celulares es la fosfatidilcolina (PC) nos propusimos determinar los niveles de este fosfolípido en extractos totales de células euploides y trisómicas.

Para ello, las células se incubaron en medio definido en presencia de diferentes ácidos grasos, tales como el ácido oleico, ácido palmítico o ácido esteárico. Todos ellos se incubaron formando un complejo con BSA. Posteriormente, se recogieron las células a distintos tiempos para la determinación de PC mediante un ensayo colorimétrico. Para la realización de este ensayo, se siguieron las instrucciones del fabricante tal y como se detalla en el apartado 3.2.11. de Material y Métodos.

En la figura 23 se representa la cantidad de PC en las células euploides y trisómicas en presencia de diferentes ácidos grasos. Como se observa en las primeras 4 horas de incubación, no existen diferencias significativas en la cantidad de PC entre ambos tipos celulares en presencia del complejo BSA-ácido oleico. Sin embargo, a partir de las 24 horas de incubación se produce un incremento en la cantidad de PC en las células euploides, comparadas con las células trisómicas. Este efecto se mantiene hasta las 48 horas en cultivo.

Cuando incubamos las líneas celulares en presencia de otros ácidos grasos, tales como BSA-ácido palmítico o BSA-ácido esteárico, observamos que se produce un ligero incremento en la cantidad de PC en presencia de los dos tipos de ácidos grasos a lo largo del tiempo. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los dos tipos celulares.

Con el fin de observar si se produce algún cambio en el fenotipo entre las células que se incuban en presencia del complejo BSA-ácido oleico o en presencia de los complejos BSA-ácido palmítico y BSA-ácido esteárico, se tomaron fotomicrografías con el microscopio invertido en contraste de fases. Como se puede observar en la figura 24, a las 48 horas de incubación existe una agrupación celular mayor en las células CNh que en CTb en presencia del complejo BSA-ácido oleico, tal y como se había mencionado previamente (figura 2). Sin embargo, en presencia de los complejos BSA-ácido palmítico o BSA-ácido esteárico no se observa tal agrupación celular.

Figura 23: Determinación de fosfatidilcolina en células euploides (CNh) y trisómicas (CTb). Las células se incubaron en medio definido en presencia de distintos ácidos grasos a una concentración 33 μ M. Los ácidos grasos se incubaron formando complejos con BSA. Las células se recogieron a diferentes tiempos, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como nanomoles de PC por miligramo de proteína y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las células CNh respecto a las células CTb en presencia de ácido oleico se expresa como **p<0,01 (Test t de Student).

Figura 24: Fotomicrografías de las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb) en presencia de distintos ácidos grasos. Las células se incubaron en medio definido en presencia de distintos ácidos grasos a una concentración 33 μ M. Los ácidos grasos se incubaron formando complejos con BSA. A los tiempos indicados se tomaron imágenes utilizando un microscopio invertido. Barra de calibrado: 100 μ m. BSA + AP: complejo BSA-ácido palmítico, BSA + AE: complejo BSA-ácido esteárico.

Dado que la sobreexpresión de DYRK1A actúa limitando el efecto neurotrófico del complejo BSA-ácido oleico sobre la expresión de ChAT en las células trisómicas, nos propusimos determinar si la sobreexpresión de *Dyrk1A* pudiera estar afectando a la cantidad de PC de las células trisómicas tras 24 horas de incubación con el complejo BSA-ácido oleico. Para ello, las células CTb se silenciaron con un siRNA específico de *Dyrk1A* (Dyrk1A-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) como control, y se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico durante 24 horas. En la figura 25, se muestran los valores obtenidos tras el análisis de las muestras. En ellos se observa que tras silenciar la expresión de *Dyrk1A* (Dyrk1A-siRNA), aumenta significativamente la cantidad de PC en el extracto total de la célula, respecto al NT-siRNA.

Figura 25: Determinación de fosfatidilcolina en células trisómicas (CTb) tras silenciar la expresión de *Dyrk1A*. Las células se transfectaron con siRNA específico y se silenció la expresión de *Dyrk1A* (Dyrk1A-siRNA) en la línea celular trisómica, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). Posteriormente, las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 24 horas. Finalmente, las células se recogieron tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como nanomoles de PC por miligramo de proteína y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en presencia del complejo BSA-ácido oleico en las células CTb se expresa como **p<0,01 (Test *t* de Student).

Teniendo en cuenta que los fosfolípidos se encuentran formando parte de las membranas celulares, nos propusimos cuantificar los niveles de fosfadilcolina presentes en las membranas de ambas líneas celulares. Para ello, se realizó un proceso de fraccionamiento celular, tal y como se detalla en el apartado 3.2.13. de Material y Métodos. Para obtener las membranas

pertenecientes al retículo endoplasmático y mitocondria (denominado HDM o membranas de alta densidad), se realizó una centrifugación a $24000 \times g$. A partir del sobrenadante obtenido, las membranas de las vesículas endosomales y la membrana plasmática (denominado LDM o membranas de baja densidad) se centrifugaron a $190000 \times g$. Ambas fracciones se resuspendieron en el tampón comercial con detergentes, para la determinación de PC mediante ensayo colorimétrico.

En la figura 26 se representan la cantidad de PC presente en las membranas HDM y LDM de las dos líneas celulares. Se observa que existe mayor cantidad de PC en la fracción de las membranas HDM que en la fracción LDM. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la cantidad de PC tanto en ausencia como en presencia del complejo BSA-ácido oleico en los dos tipos celulares. Por otro lado, cuando analizamos los niveles de PC en la fracción LDM observamos que son similares en ambas líneas celulares en presencia de BSA. Sin embargo, se observa una mayor concentración de PC en las células euploides en presencia del complejo BSA-ácido oleico, en comparación con las mismas células en presencia de BSA. Asimismo, el complejo BSA-ácido oleico incrementa significativamente la cantidad de PC en las células trisómicas. Sin embargo, este incremento es significativamente menor en las células CTb en relación a las CNh. Estos resultados tomados en su conjunto sugieren que el ácido oleico induce una mayor incorporación de PC en las membranas plasmáticas de las células euploides comparado con las trisómicas, lo que puede conllevar a cambios en la fluidez de las membranas de estas células.

Con el fin de conocer si la sobreexpresión de *Dyrk1A* pudiera estar interfiriendo en la incorporación de PC a la membrana plasmática, decidimos cuantificar los niveles de PC en las membranas celulares de las células trisómicas tras el silenciamiento de *Dyrk1A*. Para ello, las células CTb se transfectaron con un siRNA específico de *Dyrk1A* (*Dyrk1A*-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) como control y se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico durante 24 horas. Las células se recogieron y se sometieron a dos ultracentrifugaciones para obtener las fracciones HDM y LDM, tal y como se describe en el apartado 3.2.13. de Material y Métodos. En la figura 27 se observa que en la fracción HDM no existen diferencias significativas entre las cantidades de PC de las células silenciadas (*Dyrk1A*-siRNA) respecto al control (NT-siRNA). Sin embargo, en la fracción LDM, la cantidad de PC en las células CTb silenciadas con *Dyrk1A*-siRNA fue significativamente mayor con respecto al control (NT-siRNA).

Figura 26: Determinación de fosfatidilcolina en las membranas celulares de las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 24 horas. Posteriormente, se purificaron las membranas de alto (HDM) y bajo peso molecular (LDM), tal y como se describe en Material y Métodos. Finalmente, se realizó la determinación de fosfatidilcolina (PC) mediante ensayo colorimétrico, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como nanomoles de PC por picogramo de proteína presente en la muestra y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en presencia del complejo BSA-ácido oleico en las LDM de CTb respecto a la misma condición en CNh se expresa como #p<0,05. La significatividad de las LDM de una línea celular en presencia de BSA respecto al complejo BSA-oleico se expresa como **p<0,01(Test *t* de Student).

Figura 27: Determinación de fosfatidilcolina en las membranas celulares de la línea celular trisómica (CTb), tras silenciar la expresión de *Dyrk1A*. Las células trisómicas se transfectaron con un siRNA específico (*Dyrk1A*-siRNA), tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). Posteriormente, las células se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 24 horas. Por último, se purificaron las membranas de alto (HDM) y bajo peso molecular (LDM), tal y como se describe en Material y Métodos. Finalmente, se determinó la fosfatidilcolina (PC) mediante ensayo colorimétrico. Los resultados se expresan como nanomoles de PC por picogramos de proteína presente en la muestra y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en presencia del complejo BSA-ácido oleico en las LDM de CTb tras silenciar la expresión de *Dyrk1A* respecto a NT-siRNA se expresa como *p<0,05 (Test *t* de Student).

4.3.3.3. Efecto de la adición exógena de fosfolípidos sobre la expresión de ChAT.

La colina acetiltransferasa (ChAT) puede estar presente en la célula de forma soluble en el citosol o unida a la membrana con un enlace no iónico (Oda, 1999). Considerando que las células trisómicas en presencia del complejo BSA-ácido oleico presentan una menor expresión de ChAT, y además, una menor cantidad de PC en la membrana plasmática, nos planteamos si el incremento de la expresión de ChAT estuviera promovido por su unión a los fosfolípidos de la membrana plasmática.

Por ese motivo, decidimos incubar las células en medio definido en presencia de diferentes fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol o fosfatidilserina, durante 24 horas. Posteriormente, se recogieron en un tampón de homogeneización para separar la membrana plasmática (fracción LDM) del resto de componentes citoplasmáticos (principalmente del retículo endoplasmático, que acumula grandes cantidades de fosfolípidos). El método de purificación se detalla en el apartado 3.2.13. de Material y Métodos. La fracción LDM se resuspendió esta vez en un tampón de extracción de proteínas para realizar ensayos de *Western blot*.

En la figura 28, se observa que la adición de PC en el medio incrementa en torno a un 30 % la expresión de ChAT en las células CTb respecto a las células CNh. Sin embargo, la adición de fosfatidiletanolamina (PE), así como la de fosfatidilserina (PS), no altera la expresión de ChAT en los dos tipos celulares. Por otro lado, cuando incubamos las células trisómicas con fosfatidilinositol (PI) la expresión de ChAT es significativamente menor con respecto a las células CNh. Estos resultados sugieren que la expresión de ChAT depende de la cantidad de PC en la membrana plasmática. Por este motivo, nos preguntamos si la sobreexpresión existente en este modelo celular de SD pudiera estar impidiendo que se lleve a cabo una correcta síntesis de fosfatidilcolina o una correcta incorporación de dicho fosfolípido a la membrana plasmática.

Figura 28: Expresión de la colina acetiltransferasa en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb) en presencia de distintos fosfolípidos. Las células se incubaron en medio definido con diferentes fosfolípidos a una concentración de 10 mg/mL durante 24 horas. Posteriormente, se purificaron las membranas de alto (HDM) y bajo peso molecular (LDM), tal y como se describe en Material y Métodos. Por último, la fracción LDM se resuspendió en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados son expresados como porcentajes y son medias $\pm$ SEM ($n=3$). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las células CTb con respecto a CNh en su misma condición se expresan como * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ (Test *t* de Student). PC: fosfatidilcolina, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol, PS: fosfatidilserina.

4.3.4. Síntesis de fosfatidilcolina en células trisómicas.

4.3.4.1. Expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de fosfatidilcolina.

Con los resultados obtenidos previamente, nos planteamos conocer si existían diferencias en la síntesis de PC entre los dos tipos celulares.

La ruta de síntesis *de novo* de fosfatidilcolina, también llamada vía de Kennedy o ruta CDP-colina, es la principal ruta de síntesis de PC, siendo la colina quinasa alfa (CK α) y la CTP-colina citidililtransferasa alfa (CCT α) las principales enzimas reguladoras (Marcucci et al., 2010). La última enzima que participa, es decir, la CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfocolinatransferasa (CPT) no es limitante. En el esquema 22 se representa la ruta de la síntesis *de novo* de PC.

Esquema 22: Ruta de síntesis *de novo* de fosfatidilcolina.

La expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de PC se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o PCR cuantitativa. Las células se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico durante 24 horas. El RNA total de las células se extrajo utilizando el reactivo *Trizol*. Posteriormente, se obtuvo cDNA, mediante la actividad de la transcriptasa inversa, a partir del RNA. La cuantificación de los transcritos se realizó en un termociclador *Maxercycler ep realplex*, utilizando los oligonucleótidos específicos de cada transcrito y una mezcla *SYBR® Green PCR Master Mix*, que contiene la polimerasa. El procedimiento completo se detalla en el apartado 3.2.15. de Material y Métodos. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a un gen de referencia o *housekeeping*.

Figura 29: Expresión génica de distintas enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). **A)** Las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 24 horas. Posteriormente, se extrajo el RNA en *Trizol* para analizar la expresión génica de las enzimas mediante PCR cuantitativa, tal y como se describe en Material y Métodos. Los datos se normalizaron respecto a un gen de referencia o *housekeeping*. Los resultados son expresados como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las células CTb con respecto a CNh para cada enzima que corresponda se expresa como *:p<0,05 ; **:p<0,01; ***:p<0,001. Se realizó ANOVA de una sola vía y posterior test de Bonferroni. **B)** Las células trisómicas se transfectaron con un siRNA específico y se silenció la expresión de *Dyrk1A* (Dyrk1A-siRNA) durante 24 horas, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). Posteriormente, las células se incubaron en presencia del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 24 horas. Los datos obtenidos son expresados como porcentaje y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en las células CTb en presencia del complejo BSA-ácido oleico tras silenciar la expresión de *Dyrk1A* con respecto a NT-siRNA se expresa como *p<0,05.

Tal y como se observa en la figura 29A, los porcentajes de expresión de CK α y CCT α , enzimas limitantes en la regulación de la síntesis de PC, son significativamente superiores (en torno a un 30 %) en las células euploides respecto a las trisómicas en presencia del complejo BSA-ácido oleico. Sin embargo, el porcentaje de expresión de la enzima CPT es significativamente superior (más de un 60 %) en la línea celular trisómica respecto a la línea celular euploide en presencia de ácido oleico. Estos datos sugieren que existe una desregulación o desequilibrio de la ruta principal de síntesis de PC, lo cual podría conducir a una menor formación e incorporación de PC en la membrana plasmática de las células trisómicas.

Posteriormente, nos preguntamos si la sobreexpresión de *Dyrk1A* existente en CTb pudiera ser la responsable de la desregulación de la ruta de síntesis *de novo* de PC. Para ello, las células trisómicas se transfectaron con un siRNA específico de *Dyrk1A* (Dyrk1A-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) como control. Las células se incubaron en medio definido en presencia del complejo BSA-ácido oleico durante 24 horas. En la figura 29B, se observa que no existen diferencias significativas en la expresión de CK α y CCT α en las células transfectadas con Dyrk1A-siRNA, respecto al control NT-siRNA. Sin embargo, se aprecia un ligero incremento significativo en la última enzima de la ruta, la CDP-colina: 1,2-diacilglicerol fosfocolintransferasa, cuando silenciamos *Dyrk1A*.

4.3.4.2. Papel de SREBP-1 en la síntesis de fosfatidilcolina.

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la síntesis de ácido oleico tiene lugar en los astrocitos inducida por la albúmina. El proceso comienza con la internalización de la albúmina en los astrocitos, a través de un sistema dependiente de megalina y caveolina (Bento-Abreu et al., 2009). Posteriormente, sufre un proceso de transcitosis, que incluye el paso de la albúmina por el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático donde capta el ácido oleico, el cual es exocitado al medio extracelular (Tabernero et al., 2002b). Durante este proceso, la albúmina promueve la activación del factor de transcripción SREBP-1 (*sterol regulatory element-binding protein-1*) en el retículo endoplasmático (Brown and Goldstein, 1997; Tabernero et al., 2002b).

El factor de transcripción SREBP-1 regula la homeostasis de ácidos grasos y la síntesis de fosfolípidos (Brown and Goldstein, 1997). Así, induce la estearil-CoA desaturasa (SCD-1), enzima limitante en la síntesis de ácido oleico (Velasco et al., 2003) y modula la expresión de

genes que participan en la síntesis de fosfatidilcolina. Por otro lado, algunos autores señalan que una limitación en la síntesis de fosfatidilcolina provoca una mayor actividad de SREBP-1 (Walker et al., 2011).

Teniendo en cuenta estos precedentes, decidimos analizar los niveles de expresión de SREBP-1 en las líneas celulares CNh y CTb. Para ello, incubamos las células en medio definido en presencia de BSA o del complejo BSA-ácido oleico durante 4 y 24 horas. A los tiempos indicados se recogieron las células en un tampón de extracción de proteínas, para realizar ensayos de *Western blot*.

En la figura 30 se representan los porcentajes de la expresión de SREBP-1 en los dos tipos celulares a los tiempos indicados. Se observa que en presencia de BSA, la expresión de SREBP-1 incrementa significativamente transcurridas 24 horas en cultivo, tanto en las células euploides como en las células trisómicas. Sin embargo, el incremento en la expresión del SREBP-1 no tiene lugar si las células están incubadas en presencia del complejo BSA-ácido oleico. En todos los casos en los que está presente el ácido graso, la expresión de SREBP-1 siempre es significativamente menor. Por último, la expresión de SREBP-1 en CTb es siempre superior, y este incremento es significativo al comparar ambos tipos celulares en presencia de BSA a las 4 y 24 horas.

Para comprobar si la disminución de la expresión de SREBP-1 era específica del ácido oleico, incubamos ambas líneas celulares en presencia de BSA, del complejo BSA-ácido oleico o del complejo BSA-ácido palmítico, durante 4 horas. Posteriormente, se recogieron las muestras en un tampón de extracción de proteínas. La figura 31 muestra los resultados obtenidos tras realizar ensayos de *Western blot*. Tras 4 horas de incubación, los niveles de expresión de SREBP-1 en la línea celular trisómica son significativamente superiores respecto a CNh, independientemente del tratamiento. Además, se observa que, tanto en la línea celular euploide como en la trisómica, hay una disminución estadísticamente significativa de la expresión de SREBP-1 al incubar las células en presencia del complejo BSA-ácido oleico respecto al mismo tipo celular en presencia BSA. Por otra parte, el complejo BSA-ácido palmítico no modifica la expresión de SREBP-1 en CNh. Sin embargo, en CTb la presencia del complejo BSA-ácido palmítico aumenta significativamente la expresión de SREBP-1 respecto a la presencia de BSA.

Figura 30: Expresión de SREBP-1 activo en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb) a diferentes tiempos. Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v) o del complejo BSA-ácido oleico 33 μ M durante 4 o 24 horas. A estos tiempos, las células se recogieron en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados son expresados como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en una línea celular en presencia del complejo BSA-ácido oleico con respecto a las mismas células en presencia de BSA a los tiempos indicados se expresa como * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$. Se realizó ANOVA de una sola vía y posterior test de Bonferroni.

Figura 31: Comparación del efecto del ácido oleico respecto al ácido palmítico en la expresión de SREBP-1 activo en las líneas celulares euploide (CNh) y trisómica (CTb). Las células se incubaron en medio definido, en presencia de BSA 2% (p/v), BSA-ácido oleico o BSA-ácido palmítico 33 μ M durante 4 horas. Tras ese tiempo, las células se recogieron en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados son expresados como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en una línea celular con respecto a las mismas células en presencia de BSA se expresa como *p<0,05 y **p<0,01; ###p<0,001. Se realizó ANOVA de una sola vía y posterior test de Bonferroni.

Figura 32: Expresión de SREBP-1 activo en la línea celular trisómica (CTb) tras silenciar la expresión de *Dyrk1A*. Las células trisómicas se transfectaron con un siRNA específico y se silenció la expresión de *Dyrk1A* (Dyrk1A-siRNA) durante 72 horas, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de la transfección se utilizó un RNA de interferencia sin diana (NT-siRNA). Posteriormente, las células se incubaron en presencia de BSA 2% (p/v), BSA-ácido palmítico o BSA-ácido oleico 33 μ M durante 4 horas. Tras ese tiempo, las células se recogieron en un tampón de extracción para realizar ensayos de *Western blot*, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados son expresados como porcentajes y son medias $\pm$ SEM (n=3). La significatividad de las diferencias entre los valores obtenidos en CTb NT-siRNA en presencia de BSA con respecto al mismo grupo en presencia del complejo BSA-ácido oleico se expresa como * $p < 0,05$ (Test *t* de Student). n.s: no significatividad.

Por último, quisimos averiguar si existía relación entre los niveles de expresión de SREBP-1 y la sobreexpresión de *Dyrk1A* en CTb. Las células trisómicas se transfectaron con un siRNA específico de *Dyrk1A* (*Dyrk1A*-siRNA) o con un siRNA sin diana (NT-siRNA) como control. Posteriormente, incubamos las células en medio definido en presencia de BSA, BSA-ácido palmítico o BSA-ácido oleico durante 4 horas. Por último, se recogieron las muestras en un tampón de extracción de proteínas. La figura 32 muestra los resultados obtenidos tras la realización de ensayos de *Western blot*. Tal y como esperábamos en vista de los resultados anteriores, los niveles de expresión de SREBP-1 solamente disminuyen significativamente en los controles (NT-siRNA) cuando está presente el complejo BSA-ácido oleico, pero no existen diferencias significativas cuando silenciamos la expresión de *Dyrk1A* respecto al control (NT-siRNA).

La característica principal en el síndrome de Down (SD) es el retraso mental. En este sentido, los individuos con SD presentan un volumen cerebral reducido, un menor número de neuronas y alteraciones en el árbol dendrítico, todo lo cual podría explicar en parte la discapacidad intelectual (ver revisión (Dierssen, 2012)). Así, estudios histológicos de cerebros de personas con SD han mostrado una formación anormal de la corteza cerebral, producida, en parte, por una alteración celular en las capas II y III del córtex (Golden and Hyman, 1994). El desarrollo cortical en humanos parece ser normal hasta la semana 22 de gestación. Sin embargo, en la semana 40 aparece una menor laminación y el patrón de maduración cortical refleja una arborización dendrítica anormal durante el primer año de vida (Becker et al., 1991; Golden and Hyman, 1994). Algunos autores han sugerido que las anomalías que se observan en el SD se deben a la carencia de ciertos factores neurotróficos que dirigen la migración neuronal, tales como BDNF (Dorsey et al., 2002). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito que el ácido oleico actúa como un factor neurotrófico durante el desarrollo postnatal del cerebro. Así los astrocitos sintetizan y liberan ácido oleico, el cual una vez en las neuronas promueve el crecimiento de axones y dendritas, la migración de las neuronas y la formación de sinapsis (Polo-Hernandez et al., 2010; Tabernero et al., 2002a; Tabernero et al., 2001). Asimismo, el ácido oleico aumenta en el cerebro de fetos de rata entre los días 15 y 17 de gestación (García-García, 2012), coincidiendo con la máxima expansión del desarrollo cerebral de rata (ver esquema X). De hecho, es precisamente durante este periodo cuando se produce un retraso en la formación del córtex en los ratones trisómicos Ts16 (Haydar et al., 1996) (ver esquema X de Introducción), posiblemente, debido a una alteración en la neurogénesis, migración y diferenciación celular (Laffaire et al., 2009; Roper et al., 2006).

Con estos antecedentes, decidimos investigar el posible efecto del ácido oleico en un modelo de SD, consistente en líneas celulares procedentes de la corteza cerebral de fetos silvestres (CNh) y trisómicos Ts16 (CTb). Las líneas celulares se caracterizaron mediante ensayos de metabolismo, supervivencia y muerte celular (figuras 1-9).

Nuestros resultados indican que las células trisómicas no responden a la presencia del ácido oleico como lo hacen las células euploides. De hecho, las células euploides, a diferencia de las trisómicas, se agrupan como respuesta al ácido oleico de una forma similar a como lo hacen las neuronas en cultivo primario (Figura 2). Estos resultados sugieren que las células trisómicas poseen una alteración en la cadena de señalización del efecto neurotrófico del ácido oleico (Bento-Abreu et al., 2007; Rodriguez-Rodriguez et al., 2004).

Esquema X: Relación entre el contenido de α -fetoproteína y ácido oleico durante el desarrollo cerebral de rata. Extraído de (García-García, 2012).

En la caracterización de la línea celular trisómica (CTb), Allen y col. (Allen et al., 2000) mostraron que estas células presentan déficits colinérgicos similares al modelo animal Ts16, con una menor actividad de las enzimas colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE) (Ozand et al., 1984; Sweeney et al., 1989), lo que se acompaña de una reducida síntesis del neurotransmisor acetilcolina y una menor captación de colina por parte del cerebro (Fiedler et al., 1994). Con estos antecedentes nos propusimos investigar el efecto del ácido oleico sobre las expresión de la colina acetiltransferasa en las células trisómicas. Nuestros resultados indican que el ácido oleico induce la expresión de la colina acetiltransferasa en la línea celular euploide (CNh), pero no en las células trisómicas (CTb) (figuras 11 y 13). En este sentido, estudios neuroquímicos sobre la sinapsis en corteza cerebral de pacientes con SD muestran una reducción significativa de la actividad de la colina acetiltransferasa (Yates et al., 1983), lo que

sugiere la existencia de una anomalía en el sistema colinérgico de los pacientes con SD, así como alteraciones en las propiedades eléctricas que presentan las membranas celulares (Caviedes et al., 1991). Sin embargo, hay autores que indican que el sistema colinérgico del telencéfalo basal es aparentemente normal en los fetos y recién nacidos con SD, tanto en lo que se refiere al número de neuronas como de actividad de la ChAT (Kish et al., 1989; Lubec et al., 2001). No hemos detectado diferencias significativas en el número de neuronas que expresan la colina acetiltransferasa, entre las células euploides y trisómicas, aunque se observa una disminución en la intensidad de la expresión de la ChAT en las células trisómicas respecto a las células euploides (figura 12). Estos resultados sugieren que la presencia del ácido oleico aumenta la expresión de la colina acetiltransferasa, confirmando resultados previos que destacan el papel del ácido oleico en el sistema colinérgico (Massarelli et al., 1988).

El gen *Dyrk1A* codifica una quinasa de actividad dual, que se autofosforila en residuos Tyr321, serina y treonina, y fosforila además sustratos en residuos serina y treonina (ver revisión (Tejedor and Hammerle, 2011)). La desregulación de su expresión produce una amplia variedad de alteraciones fenotípicas durante el desarrollo e incluso en etapas adultas (Altafaj et al., 2001; Altafaj et al., 2008; Arque et al., 2008; Cheon et al., 2001; Fotaki et al., 2002). Esto es debido a su participación en múltiples vías de señalización, que hacen que DYRK1A juegue un papel clave como regulador de distintos procesos biológicos (ver revisión (Tejedor and Hammerle, 2011)).

Dado que el gen *Dyrk1A* está sobreexpresado en el SD, en el presente trabajo nos propusimos estudiar la posible conexión existente entre la sobreexpresión de *Dyrk1A* y la actividad de la colina acetiltransferasa. Para ello, se silenció la expresión de *Dyrk1A* en las células trisómicas mediante RNA de interferencia. Nuestros resultados muestran que al inhibir la sobreexpresión de *Dyrk1A* en las células trisómicas, además de recuperar el fenotipo de las células euploides (figura 14), aumentan los niveles de expresión de la ChAT alcanzando valores similares a los que presentan las células euploides (figura 15). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de DYRK1A podría estar inhibiendo el efecto del ácido oleico sobre la expresión de la colina acetiltransferasa en células trisómicas.

Para confirmar estos resultados, nos propusimos estudiar el efecto del ácido oleico en cultivos primarios de neuronas procedentes de ratones transgénicos que sobreexpresan *Dyrk1A* (TgDyrk1A). Así, el ácido oleico incrementa la expresión de la ChAT en neuronas procedentes de ratones de tipo silvestre (figura 18). Sin embargo, este efecto no se observa en las neuronas

procedentes de los ratones TgDyrk1A, lo que sugiere que la sobreexpresión de *Dyrk1A* impide el efecto del ácido oleico (figura 16). Además, la presencia de ácido oleico no promueve la agrupación de las neuronas en cultivos primarios de TgDyrk1A. Por el contrario, la presencia del ácido oleico en las neuronas de tipo silvestre induce la agregación de sus cuerpos neuronales e incrementa la longitud de los axones y dendritas (figura 16). Para confirmar a nivel molecular esta observación, se determinó la expresión de GAP-43, marcador de crecimiento axonal, en estas circunstancias. Los resultados obtenidos indican que el ácido oleico incrementa la expresión de GAP-43 en los cultivos primarios de neuronas procedentes de ratones de tipo silvestre, de forma similar a lo descrito por Tabernero y col. (Tabernero et al., 2001). Sin embargo, en los cultivos primarios de neuronas procedentes de TgDyrk1A, el nivel de expresión de GAP-43 es menor que en las neuronas de tipo silvestre (figura 17). Por tanto, estos resultados indican que la sobreexpresión de *Dyrk1A* impide los efectos neurotróficos del ácido oleico.

Nuestros resultados indican que el ácido oleico es captado por las células trisómicas en mayor grado que en las células euploides. Este hecho sugiere que la falta de efecto del ácido oleico en las células trisómicas no se debe, por tanto, a una posible anomalía en la endocitosis del ácido graso. Sin embargo, al inhibir la sobreexpresión de *Dyrk1A* en las células trisómicas, los niveles de captación de ácido oleico se restablecen a los niveles observados en las células normales (figura 19). Estos resultados sugieren que el exceso de dosis génica promueve que las células trisómicas capten más cantidad de ácido oleico, aunque éste no induce el agrupamiento celular observado en las células euploides.

Los estudios de localización del ácido oleico evidencian que los dos tipos celulares muestran la presencia de ácido oleico en el citoplasma. En las células euploides, además, se aprecia la localización del ácido graso en el contorno celular, fenómeno que no tiene lugar en las células trisómicas (figura 20). Nuestros resultados indican que el ácido oleico se localiza en el retículo endoplasmático en los dos tipos celulares (figura 22). Dado que la síntesis de lípidos complejos tiene lugar en el retículo endoplasmático liso, puede sugerirse que la presencia del ácido oleico en esta localización celular se debe a su incorporación en la estructura de los fosfolípidos. En este contexto, el ácido oleico se incorpora en los fosfolípidos de las membranas de las neuronas, de forma preferencial como fosfatidilcolina (PC) (Tabernero et al., 2001).

Trabajos previos indican que pacientes con SD tienen bajos niveles de ácidos grasos monoinsaturados en los fosfolípidos del cerebro (Murphy et al., 2000; Shah, 1979). Estas alteraciones bioquímicas podrían ser responsables de una menor conexión neuronal, fenómeno presente en estos pacientes (Elul et al., 1975). En el presente trabajo, se han determinado los niveles de fosfatidilcolina en células euploides y trisómicas en presencia o no de ácido oleico. Los resultados obtenidos muestran que en presencia de ácido oleico, se produce un incremento significativo en la cantidad de fosfatidilcolina en las células euploides, pero no en las células trisómicas. Sin embargo, este efecto no tiene lugar cuando se incuban las células con otros ácidos grasos, tales como el ácido palmítico o el ácido esteárico (figura 23). Además, tanto el ácido palmítico como el ácido esteárico no son capaces de mimetizar la agrupación celular observada en la línea celular euploide en presencia de ácido oleico (figura 24). Estos resultados confirman la especificidad del ácido oleico como factor neurotrófico (Medina and Tabernero, 2002; Tabernero et al., 2001).

Nuestros resultados indican que el ácido oleico se incorpora a la membrana celular de las células euploides, fenómeno que no se observa en las células trisómicas (figura 20). Considerando que el ácido oleico aumenta los niveles de fosfatidilcolina (figura 23), estos resultados sugieren que el ácido oleico se incorpora en la membrana plasmática en forma de fosfolípidos. Con el fin de averiguar los niveles de fosfatidilcolina en la membrana plasmática, se realizaron fraccionamientos subcelulares para purificar la membrana plasmática y la de las vesículas endosomales (LDM o membranas de baja densidad) y separarlas de las membranas pertenecientes al retículo endoplasmático y de la mitocondria (HDM o membranas de alta densidad). Nuestros resultados muestran que en presencia de ácido oleico los niveles de fosfatidilcolina en las HDM son similares en los dos tipos celulares. Sin embargo, en la fracción LDM los niveles de fosfatidilcolina están aumentados significativamente en las células euploides. Estos resultados sugieren que existe un incremento de los niveles de fosfatidilcolina en la membrana plasmática y en la de las vesículas endosomales de las células euploides, fenómeno que no tiene lugar en las células trisómicas (figura 26).

Caviedes y col. (Caviedes et al., 1990b) establecieron que la sobreexpresión de los genes en trisomía podría modular la composición de la membrana, lo que podría afectar a la función de algunos receptores de las células trisómicas. Por ello, nos preguntamos si la sobreexpresión de *Dyrk1A* pudiera estar modulando los niveles de fosfatidilcolina en nuestras condiciones experimentales. En efecto, tras silenciar la sobreexpresión de *Dyrk1A* en las células trisómicas,

se observó que, tanto en el extracto total (figura 25) como en las membranas LDM (figura 27), los niveles de fosfatidilcolina aumentaban significativamente, lo que sugiere que la sobreexpresión de *Dyrk1A* disminuye la concentración de fosfatidilcolina en la membrana plasmática.

En 1987, Hattori y col. (Hattori et al., 1987) mostraron que la colina acetiltransferasa está localizada en la membrana plasmática de las neuronas, pero la acetilcolina se sintetizaba solamente cuando la liberación de colina se estimulaba en presencia de ácido oleico, a través de la activación de fosfolipasa D. Por consiguiente, nos preguntamos si se podría modificar la expresión de la colina acetiltransferasa en las células trisómicas al exponer a estas células a diferentes fosfolípidos de membrana. Así, los dos tipos celulares se incubaron en presencia de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol o fosfatidilserina. Los resultados obtenidos indican que únicamente en presencia de fosfatidilcolina se produce un incremento de la expresión de la colina acetiltransferasa en células trisómicas (figura 28). Por tanto, nuestros datos avalan los resultados obtenidos previamente, que indican que la composición de la membrana plasmática es fundamental para el correcto funcionamiento de las enzimas insertadas en ella. En este sentido, la incorporación del ácido oleico a los fosfolípidos de la membrana puede alterar las propiedades biofísicas de ésta, y con ello regular la actividad de proteínas periféricas o integrales de la membrana (ver revisión (Lopez et al., 2014)).

Dado que la adición de fosfatidilcolina promueve el aumento de la expresión de la colina acetiltransferasa en las células trisómicas, nos planteamos si un déficit en la síntesis de dicho fosfolípido en estas células impedía la correcta actividad de la colina acetiltransferasa. Nuestros resultados muestran que la expresión de las enzimas reguladoras de la síntesis de fosfatidilcolina, la CK y la CCT, está disminuida en las células trisómicas en relación a las células euploides (figura 29), lo que podría explicar el déficit en la síntesis de fosfatidilcolina observado en las células trisómicas. En apoyo a esta hipótesis, Walker y col. han indicado que la disminución de la síntesis de fosfatidilcolina está relacionada con un aumento de la actividad de SREBP-1 (Walker et al., 2011), un factor de transcripción que participa en la síntesis de determinados ácidos grasos y fosfolípidos (Vance and Vance, 2004). En este sentido, nuestros resultados indican que los niveles de SREBP-1 están significativamente más altos en células trisómicas (figuras 30 y 31), lo que está a favor de la disminución de la síntesis de fosfatidilcolina en las células trisómicas.

Sin embargo, los niveles de expresión de las enzimas de la síntesis de fosfatidilcolina no están alterados por la sobreexpresión de *Dyrk1A*, ya que el silenciamiento de esta quinasa no produce ningún cambio en la expresión de dichas enzimas. Estos resultados sugieren que *Dyrk1A* no participa en la síntesis de fosfatidilcolina a través de esta ruta (ruta de Kennedy). Por otro lado, existe una vía alternativa de síntesis de fosfatidilcolina, a través de la metilación de la fosfatidiletanolamina (PE) mediante la donación de tres grupos metilo, catalizada por la fosfatidiletanolamina N-metil transferasa (PEMT) y cuya actividad es crítica para la síntesis de fosfatidilcolina en ciertas circunstancias (Vance, 2013) (ver esquema X).

Esquema X: Ruta principal y alternativa de síntesis de PC. Implicación de *Dyrk1A*. Abreviaturas: E (etanolamina); SAmE (S-adenosil metionina), SAH (S-adenosil homocisteína), SAHH (S-adenosil homocisteína hidrolasa), PEMT (fosfatidiletanolamina N-metil transferasa).

En este sentido, es posible que *Dyrk1A* pudiera estar implicado en la regulación de esta última vía, ya que se ha descrito que la sobreexpresión de *Dyrk1A* afecta a la actividad de SAHH (Planque et al., 2013), lo que impediría el reciclaje de SAH a SAmE. Este hecho finalmente resultaría en la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina. Un estudio detallado de la vía de conversión de PE en PC podría dar luz a la intervención de *Dyrk1A* en la síntesis de fosfatidilcolina en las células trisómicas. Sea como fuere, las células trisómicas muestran un déficit en fosfatidilcolina, lo que disminuiría la actividad de la colina acetiltransferasa. Todo ello explicaría el déficit colinérgico observado en el síndrome de Down.

- 1.- El ácido oleico promueve la proliferación y agrupamiento de las células euploides. Sin embargo, este efecto está significativamente ralentizado en una línea celular procedente de la corteza cerebral del ratón trisómico Ts16.
- 2.- El ácido oleico induce la expresión de la colina acetiltransferasa en las células normales, pero no en las células trisómicas. Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de DYRK1A en las células trisómicas restaura los efectos del ácido oleico. Asimismo, la sobreexpresión de *Dyrk1A* en ratones transgénicos impide el efecto del ácido oleico sobre la expresión de la colina acetiltransferasa.
- 3.- La captación de ácido oleico difiere entre ambas líneas celulares, siendo significativamente superior en las células trisómicas. Su localización subcelular difiere, asimismo, en los dos tipos celulares, observándose una mayor incorporación en las membranas plasmáticas de las células euploides, mientras que en las células trisómicas su localización es casi exclusivamente citoplasmática. Estas diferencias prácticamente desaparecen tras el silenciamiento de DYRK1A.
- 4.- La presencia de ácido oleico, pero no la de otros ácidos grasos, tales como ácido palmítico o esteárico, aumenta las concentraciones de fosfatidilcolina en las células euploides en comparación con las trisómicas. Las diferencias más significativas se observaron en la membrana plasmática. El silenciamiento de DYRK1A reduce significativamente estas diferencias.
- 5.- La adición exógena de fosfatidilcolina, pero no de otras especies fosfolipídicas, tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina, aumenta la expresión de la colina acetiltransferasa en la línea celular trisómica.
- 6.- La expresión de las enzimas limitantes de la síntesis *de novo* de fosfatidilcolina, CK α y CCT α , está disminuida en las células trisómicas y el silenciamiento de DYRK1A es incapaz de revertir estos efectos.
- 7.- Los niveles de expresión de SREBP-1 son superiores en las células trisómicas, lo cual parece confirmar la existencia de una disminución de la síntesis de fosfatidilcolina en este tipo de células. El silenciamiento de *Dyrk1A* no influye de forma significativa sobre los niveles de SREBP-1.

Conclusión final: La sobreexpresión de *Dyrk1A* en las células trisómicas impide el efecto neurotrófico del ácido oleico, lo que se traduce en una disminución de la expresión de la colina acetiltransferasa, posiblemente, a través de una menor incorporación de fosfatidilcolina en la membrana plasmática.

Ahn, K.J., Jeong, H.K., Choi, H.S., Ryoo, S.R., Kim, Y.J., Goo, J.S., Choi, S.Y., Han, J.S., Ha, I., and Song, W.J. (2006). DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis* 22, 463-472.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition (Garland Science).

Aldridge, K., Reeves, R.H., Olson, L.E., and Richtsmeier, J.T. (2007). Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models. *Am J Med Genet A* 143A, 1060-1070.

Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J.R., Florez, J., Fillat, C., *et al.* (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* 10, 1915-1923.

Altafaj, X., Ortiz-Abalia, J., Fernandez, M., Potier, M.C., Laffaire, J., Andreu, N., Dierssen, M., Gonzalez-Garcia, C., Cena, V., Marti, E., *et al.* (2008). Increased NR2A expression and prolonged decay of NMDA-induced calcium transient in cerebellum of TgDyrk1A mice, a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis* 32, 377-384.

Alvarez, M., Estivill, X., and de la Luna, S. (2003). DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J Cell Sci* 116, 3099-3107.

Allen, D.D., Martin, J., Arriagada, C., Cardenas, A.M., Rapoport, S.I., Caviedes, R., and Caviedes, P. (2000). Impaired cholinergic function in cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice. *Eur J Neurosci* 12, 3259-3264.

Antonarakis, S.E., Lyle, R., Dermitzakis, E.T., Raymond, A., and Deutsch, S. (2004). Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5, 725-738.

Aranda, S., Alvarez, M., Turro, S., Laguna, A., and de la Luna, S. (2008). Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol Cell Biol* 28, 5899-5911.

Aranda, S., Laguna, A., and de la Luna, S. (2011). DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J* 25, 449-462.

Arque, G., Fotaki, V., Fernandez, D., Martinez de Lagran, M., Arbones, M.L., and Dierssen, M. (2008). Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A). *PLoS One* 3, e2575.

Avila-Martin, G., Galan-Arriero, I., Gomez-Soriano, J., and Taylor, J. (2011). Treatment of rat spinal cord injury with the neurotrophic factor albumin-oleic acid: translational application for paralysis, spasticity and pain. *PLoS One* 6, e26107.

Aylward, E.H., Habbak, R., Warren, A.C., Pulsifer, M.B., Barta, P.E., Jerram, M., and Pearlson, G.D. (1997). Cerebellar volume in adults with Down syndrome. *Arch Neurol* 54, 209-212.

- Bahler, J., and Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* 12, 1356-1370.
- Bambrick, L.L., and Fiskum, G. (2008). Mitochondrial dysfunction in mouse trisomy 16 brain. *Brain Res* 1188, 9-16.
- Barlow, G.M., Chen, X.N., Shi, Z.Y., Lyons, G.E., Kurnit, D.M., Celle, L., Spinner, N.B., Zackai, E., Pettenati, M.J., Van Riper, A.J., *et al.* (2001). Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* 3, 91-101.
- Battaini, F. (2001). Protein kinase C isoforms as therapeutic targets in nervous system disease states. *Pharmacol Res* 44, 353-361.
- Becker, L., Mito, T., Takashima, S., and Onodera, K. (1991). Growth and development of the brain in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 373, 133-152.
- Becker, L.E. (1991). Synaptic dysgenesis. *Can J Neurol Sci* 18, 170-180.
- Becker, W., and Joost, H.G. (1999). Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 1-17.
- Begenisic, T., Baroncelli, L., Sansevero, G., Milanese, M., Bonifacino, T., Bonanno, G., Cioni, G., Maffei, L., and Sale, A. (2014). Fluoxetine in adulthood normalizes GABA release and rescues hippocampal synaptic plasticity and spatial memory in a mouse model of Down Syndrome. *Neurobiol Dis* 63, 12-19.
- Behar, T.N., and Colton, C.A. (2003). Redox regulation of neuronal migration in a Down Syndrome model. *Free Radic Biol Med* 35, 566-575.
- Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yanez, I., Martinez de Lagran, M., Arbones, M.L., Fotaki, V., DeFelipe, J., and Elston, G.N. (2005). Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol Dis* 20, 115-122.
- Bento-Abreu, A., Tabernero, A., and Medina, J.M. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor- α is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. *J Neurochem* 103, 871-881.
- Bento-Abreu, A., Velasco, A., Polo-Hernandez, E., Lillo, C., Kozyraki, R., Tabernero, A., and Medina, J.M. (2009). Albumin endocytosis via megalin in astrocytes is caveola- and Dab-1 dependent and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem* 111, 49-60.
- Bento-Abreu, A., Velasco, A., Polo-Hernandez, E., Perez-Reyes, P.L., Tabernero, A., and Medina, J.M. (2008). Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem* 106, 1149-1159.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2012). *Biochemistry*, 7th edition.
- Bhattacharya, A.A., Grune, T., and Curry, S. (2000). Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 303, 721-732.

Bohdanowicz, M., and Grinstein, S. (2013). Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev* 93, 69-106.

Branchi, I., Bichler, Z., Minghetti, L., Delabar, J.M., Malchiodi-Albedi, F., Gonzalez, M.C., Chettouh, Z., Nicolini, A., Chabert, C., Smith, D.J., *et al.* (2004). Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 429-440.

Bravo, D.T., Kolmakova, N.G., and Parsons, S.M. (2004). Choline is transported by vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem* 91, 766-768.

Brown, J.H., Johnson, M.H., Paterson, S.J., Gilmore, R., Longhi, E., and Karmiloff-Smith, A. (2003). Spatial representation and attention in toddlers with Williams syndrome and Down syndrome. *Neuropsychologia* 41, 1037-1046.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.

Bruce, G., and Hersh, L.B. (1989). The phosphorylation of choline acetyltransferase. *Neurochem Res* 14, 613-620.

Canzonetta, C., Mulligan, C., Deutsch, S., Ruf, S., O'Doherty, A., Lyle, R., Borel, C., Lin-Marq, N., Delom, F., Groet, J., *et al.* (2008). DYRK1A-dosage imbalance perturbs NRSF/REST levels, deregulating pluripotency and embryonic stem cell fate in Down syndrome. *Am J Hum Genet* 83, 388-400.

Cardenas, A.M., Rodriguez, M.P., Cortes, M.P., Alvarez, R.M., Wei, W., Rapoport, S.I., Shimahara, T., Caviedes, R., and Caviedes, P. (1999). Calcium signals in cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice. *Neuroreport* 10, 363-369.

Caviedes, P., Ault, B., and Rapoport, S.I. (1990a). Electrical membrane properties of cultured dorsal root ganglion neurons from trisomy 19 mouse fetuses: a comparison with the trisomy 16 mouse fetus, a model for Down syndrome. *Brain Res* 511, 169-172.

Caviedes, P., Ault, B., and Rapoport, S.I. (1990b). The role of altered sodium currents in action potential abnormalities of cultured dorsal root ganglion neurons from trisomy 21 (Down syndrome) human fetuses. *Brain Res* 510, 229-236.

Caviedes, P., Koistinaho, J., Ault, B., and Rapoport, S.I. (1991). Effects of nerve growth factor on electrical membrane properties of cultured dorsal root ganglia neurons from normal and trisomy 21 human fetuses. *Brain Res* 556, 285-291.

Caviedes, R., and Stanbury, J.B. (1976). Studies on a cell line from a functional rat thyroid tumor in continuous culture. *Endocrinology* 99, 549-554.

Clark, D., and Wilson, G.N. (2003). Behavioral assessment of children with Down syndrome using the Reiss psychopathology scale. *Am J Med Genet A* 118A, 210-216.

Clarke, C.S., and Bannon, F.J. (2005). Serum albumin in Down Syndrome with and without Alzheimer's Disease. *Ir J Med Sci* 174, 4-8.

- Collier, B., Poon, P., and Salehmoghaddam, S. (1972). The formation of choline and of acetylcholine by brain in vitro. *J Neurochem* 19, 51-60.
- Corsi, P., and Coyle, J.T. (1991). Nerve growth factor corrects developmental impairments of basal forebrain cholinergic neurons in the trisomy 16 mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1793-1797.
- Courcet, J.B., Faivre, L., Malzac, P., Masurel-Paulet, A., Lopez, E., Callier, P., Lambert, L., Lemesle, M., Thevenon, J., Gigot, N., *et al.* (2012). The DYRK1A gene is a cause of syndromic intellectual disability with severe microcephaly and epilepsy. *J Med Genet* 49, 731-736.
- Coyle, J.T., Oster-Granite, M.L., and Gearhart, J.D. (1986). The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res Bull* 16, 773-787.
- Cramer, N., and Galdzicki, Z. (2012). From abnormal hippocampal synaptic plasticity in down syndrome mouse models to cognitive disability in down syndrome. *Neural Plast* 2012, 101542.
- Cunnane, S.C., Schneider, J.A., Tangney, C., Tremblay-Mercier, J., Fortier, M., Bennett, D.A., and Morris, M.C. (2012). Plasma and brain fatty acid profiles in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 29, 691-697.
- Curry, S., Brick, P., and Franks, N.P. (1999). Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* 1441, 131-140.
- Chapman, R.S., Seung, H.K., Schwartz, S.E., and Kay-Raining Bird, E. (1998). Language skills of children and adolescents with Down syndrome: II. Production deficits. *J Speech Lang Hear Res* 41, 861-873.
- Cheeseman, A.J., and Clark, J.B. (1988). Influence of the malate-aspartate shuttle on oxidative metabolism in synaptosomes. *J Neurochem* 50, 1559-1565.
- Cheon, M.S., Fountoulakis, M., Cairns, N.J., Dierssen, M., Herkner, K., and Lubec, G. (2001). Decreased protein levels of stathmin in adult brains with Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*, 281-288.
- Dalton, A.J., and Crapper-McLachlan, D.R. (1986). Clinical expression of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Psychiatr Clin North Am* 9, 659-670.
- Davisson, M.T., Schmidt, C., and Akeson, E.C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* 360, 263-280.
- Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 8, 438-450.
- Delabar, J.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1, 114-124.
- Deutsch, J.A. (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 174, 788-794.
- Dierssen, M. (2012). Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat Rev Neurosci* 13, 844-858.

- Dierssen, M., and de Lagran, M.M. (2006). DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis. *ScientificWorldJournal* 6, 1911-1922.
- Dierssen, M., Fillat, C., Crnic, L., Arbones, M., Florez, J., and Estivill, X. (2001). Murine models for Down syndrome. *Physiol Behav* 73, 859-871.
- Dobransky, T., Brewer, D., Lajoie, G., and Rylett, R.J. (2003). Phosphorylation of 69-kDa choline acetyltransferase at threonine 456 in response to amyloid-beta peptide 1-42. *J Biol Chem* 278, 5883-5893.
- Dobransky, T., Davis, W.L., and Rylett, R.J. (2001). Functional characterization of phosphorylation of 69-kDa human choline acetyltransferase at serine 440 by protein kinase C. *J Biol Chem* 276, 22244-22250.
- Dobransky, T., and Rylett, R.J. (2005). A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *J Neurochem* 95, 305-313.
- Dorsey, S.G., Bambrick, L.L., Balice-Gordon, R.J., and Krueger, B.K. (2002). Failure of brain-derived neurotrophic factor-dependent neuron survival in mouse trisomy 16. *J Neurosci* 22, 2571-2578.
- Dowjat, W.K., Adayev, T., Kuchna, I., Nowicki, K., Palminiello, S., Hwang, Y.W., and Wegiel, J. (2007). Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci Lett* 413, 77-81.
- Down, J.L. (1995). Observations on an ethnic classification of idiots. 1866. *Ment Retard* 33, 54-56.
- Elul, R., Hanley, J., and Simmons, J.Q., 3rd (1975). Non-Gaussian behavior of the EEG in Down's syndrome suggests decreased neuronal connections. *Acta Neurol Scand* 51, 21-28.
- Ferron, S.R., Pozo, N., Laguna, A., Aranda, S., Porlan, E., Moreno, M., Fillat, C., de la Luna, S., Sanchez, P., Arbones, M.L., *et al.* (2010). Regulated segregation of kinase Dyrk1A during asymmetric neural stem cell division is critical for EGFR-mediated biased signaling. *Cell Stem Cell* 7, 367-379.
- Fiedler, J.L., Epstein, C.J., Rapoport, S.I., Caviedes, R., and Caviedes, P. (1994). Regional alteration of cholinergic function in central neurons of trisomy 16 mouse fetuses, an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Brain Res* 658, 27-32.
- Fotaki, V., Dierssen, M., Alcantara, S., Martinez, S., Marti, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., and Arbones, M.L. (2002). Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol Cell Biol* 22, 6636-6647.
- Fotaki, V., Martinez De Lagran, M., Estivill, X., Arbones, M., and Dierssen, M. (2004). Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity. *Behav Neurosci* 118, 815-821.
- Fujita, H., Torii, C., Kosaki, R., Yamaguchi, S., Kudoh, J., Hayashi, K., Takahashi, T., and Kosaki, K. (2010). Microdeletion of the Down syndrome critical region at 21q22. *Am J Med Genet A* 152A, 950-953.

García-García, A. (2012). Tesis Doctoral. Papel de la alfa-fetoproteína en el desarrollo embrionario del cerebro. Universidad de Salamanca.

Gekle, M. (2005). Renal tubule albumin transport. *Annu Rev Physiol* 67, 573-594.

Gockler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F.J., and Becker, W. (2009). Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J* 276, 6324-6337.

Golden, J.A., and Hyman, B.T. (1994). Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 513-520.

Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q., and Gustafsson, J.A. (1992). Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4653-4657.

Gropp, A. (1975). Proceedings: Hypoplasia and malformation in trisomy syndromes of the mouse foetus. *Mutat Res* 29, 216.

Guidi, S., Stagni, F., Bianchi, P., Ciani, E., Giacomini, A., De Franceschi, M., Moldrich, R., Kurniawan, N., Mardon, K., Giuliani, A., *et al.* (2014). Prenatal pharmacotherapy rescues brain development in a Down's syndrome mouse model. *Brain* 137, 380-401.

Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., and Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* 57, 407-418.

Hammerle, B., Elizalde, C., Galceran, J., Becker, W., and Tejedor, F.J. (2003). The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications. *J Neural Transm Suppl*, 129-137.

Hammerle, B., Elizalde, C., and Tejedor, F.J. (2008). The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene Mnb/Dyrk1A in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development. *Eur J Neurosci* 27, 1061-1074.

Hammerle, B., Ulin, E., Guimera, J., Becker, W., Guillemot, F., and Tejedor, F.J. (2011). Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development* 138, 2543-2554.

Hammerle, B., Vera-Samper, E., Speicher, S., Arencibia, R., Martinez, S., and Tejedor, F.J. (2002). Mnb/Dyrk1A is transiently expressed and asymmetrically segregated in neural progenitor cells at the transition to neurogenic divisions. *Dev Biol* 246, 259-273.

Hannich, J.T., Umebayashi, K., and Riezman, H. (2011). Distribution and functions of sterols and sphingolipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

Hattori, H., Kanfer, J.N., and Massarelli, R. (1987). Stimulation of phospholipase D activity and indication of acetylcholine synthesis by oleate in rat brain synaptosomal preparations. *Neurochem Res* 12, 687-692.

Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., *et al.* (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405, 311-319.

Haydar, T.F., Blue, M.E., Molliver, M.E., Krueger, B.K., and Yarowsky, P.J. (1996). Consequences of trisomy 16 for mouse brain development: corticogenesis in a model of Down syndrome. *J Neurosci* 16, 6175-6182.

He, X.M., and Carter, D.C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358, 209-215.

Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H.G., and Becker, W. (2000). Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J Biol Chem* 275, 2431-2438.

Hook, E.B. (1983). Down syndrome rates and relaxed selection at older maternal ages. *Am J Hum Genet* 35, 1307-1313.

Hostetler, H.A., Petrescu, A.D., Kier, A.B., and Schroeder, F. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J Biol Chem* 280, 18667-18682.

Hothersall, J.S., Baquer, N., Greenbaum, A.L., and McLean, P. (1979). Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain during development and the effect of phenazine methosulfate on the integration of metabolic routes. *Arch Biochem Biophys* 198, 478-492.

Hothersall, J.S., Zubairu, S., McLean, P., and Greenbaum, A.L. (1981). Alternative pathways of glucose utilization in brain; changes in the pattern of glucose utilization in brain resulting from treatment of rats with 6-aminonicotinamide. *J Neurochem* 37, 1484-1496.

Jacobs, P.A., Baikie, A.G., Court Brown, W.M., and Strong, J.A. (1959). The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet* 1, 710.

Jayme, D.W., and Blackman, K.E. (1985). Culture media for propagation of mammalian cells, viruses, and other biologicals. *Adv Biotechnol Processes* 5, 1-30.

Kaczmariski, W., Barua, M., Mazur-Kolecka, B., Frackowiak, J., Dowjat, W., Mehta, P., Bolton, D., Hwang, Y.W., Rabe, A., Albertini, G., *et al.* (2014). Intracellular distribution of differentially phosphorylated dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A). *J Neurosci Res* 92, 162-173.

Kang, J.E., Choi, S.A., Park, J.B., and Chung, K.C. (2005). Regulation of the proapoptotic activity of huntingtin interacting protein 1 by Dyrk1 and caspase-3 in hippocampal neuroprogenitor cells. *J Neurosci Res* 81, 62-72.

Kedziora, J., and Bartosz, G. (1988). Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 4, 317-330.

Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schurmann, A., Huppertz, C., Kainulainen, H., and Joost, H.G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural

features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem* 271, 3488-3495.

Kim, E.J., Sung, J.Y., Lee, H.J., Rhim, H., Hasegawa, M., Iwatsubo, T., Min do, S., Kim, J., Paik, S.R., and Chung, K.C. (2006). Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J Biol Chem* 281, 33250-33257.

Kimura, R., Kamino, K., Yamamoto, M., Nuripa, A., Kida, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Yamagata, H., *et al.* (2007). The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 16, 15-23.

Kish, S., Karlinsky, H., Becker, L., Gilbert, J., Rebbetoy, M., Chang, L.J., DiStefano, L., and Hornykiewicz, O. (1989). Down's syndrome individuals begin life with normal levels of brain cholinergic markers. *J Neurochem* 52, 1183-1187.

Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Villar, A.J., Epstein, C.J., Malenka, R.C., and Mobley, W.C. (2004). Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J Neurosci* 24, 8153-8160.

Kliewer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., *et al.* (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4318-4323.

Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.

Kurabayashi, N., and Sanada, K. (2013). Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. *Genes Dev* 27, 2708-2721.

Kurt, M.A., Davies, D.C., Kidd, M., Dierssen, M., and Florez, J. (2000). Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain Res* 858, 191-197.

Laffaire, J., Rivals, I., Dauphinot, L., Pasteau, F., Wehrle, R., Larrat, B., Vitalis, T., Moldrich, R.X., Rossier, J., Sinkus, R., *et al.* (2009). Gene expression signature of cerebellar hypoplasia in a mouse model of Down syndrome during postnatal development. *BMC Genomics* 10, 138.

Lantigua, S. (2013). Trabajo Fin de Máster. Estudio de la diferenciación celular promovida por diferentes factores neurotróficos en un modelo celular de síndrome de Down. Universidad de Salamanca.

Lejeune, J., Gautier, M., and Turpin, R. (1959). [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 248, 1721-1722.

Liu, F., Liang, Z., Wegiel, J., Hwang, Y.W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Ramakrishna, N., and Gong, C.X. (2008). Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J* 22, 3224-3233.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

- Longo, L.D. (1978). Classic pages in obstetrics and gynecology. The chromosome number in man. Joe Hin Tjio and Albert Levan. *Hereditas*, vol. 42, pp. 1-6, 1956. *Am J Obstet Gynecol* 130, 722.
- Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-de la Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L.M., Ortega-Gomez, A., Abia, R., and Muriana, F.J. (2014). Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochim Biophys Acta*.
- Lubec, B., Yoo, B.C., Dierssen, M., Balic, N., and Lubec, G. (2001). Down syndrome patients start early prenatal life with normal cholinergic, monoaminergic and serotonergic innervation. *J Neural Transm Suppl*, 303-310.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marcucci, H., Paoletti, L., Jackowski, S., and Banchio, C. (2010). Phosphatidylcholine biosynthesis during neuronal differentiation and its role in cell fate determination. *J Biol Chem* 285, 25382-25393.
- Marti, E., Altafaj, X., Dierssen, M., de la Luna, S., Fotaki, V., Alvarez, M., Perez-Riba, M., Ferrer, I., and Estivill, X. (2003). Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res* 964, 250-263.
- Martinez de Lagran, M., Altafaj, X., Gallego, X., Marti, E., Estivill, X., Sahun, I., Fillat, C., and Dierssen, M. (2004). Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiol Dis* 15, 132-142.
- Martinez de Lagran, M., Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yanez, I., Calvo, M., Morales, M., Fillat, C., Defelipe, J., Ramakers, G.J., and Dierssen, M. (2012). Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons. *Cereb Cortex* 22, 2867-2877.
- Massarelli, R., Ferret, B., Sorrentino, G., Hattori, H., and Kanfer, J.N. (1988). Choline acetyltransferase-like activity bound to neuronal plasma membranes. *Neurochem Res* 13, 1193-1198.
- Matsumoto, N., Ohashi, H., Tsukahara, M., Kim, K.C., Soeda, E., and Niikawa, N. (1997). Possible narrowed assignment of the loci of monosomy 21-associated microcephaly and intrauterine growth retardation to a 1.2-Mb segment at 21q22.2. *Am J Hum Genet* 60, 997-999.
- Medina, J.M., and Taberner, A. (2002). Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *J Physiol Paris* 96, 265-271.
- Moller, R.S., Kubart, S., Hoeltzenbein, M., Heye, B., Vogel, I., Hansen, C.P., Menzel, C., Ullmann, R., Tommerup, N., Ropers, H.H., *et al.* (2008). Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *Am J Hum Genet* 82, 1165-1170.
- Mollgard, K., Reynolds, M.L., Jacobsen, M., Dziegielewska, K.M., and Saunders, N.R. (1984). Differential immunocytochemical staining for fetuin and transferrin in the developing cortical plate. *J Neurocytol* 13, 497-502.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Muoio, D.M., Way, J.M., Tanner, C.J., Winegar, D.A., Kliewer, S.A., Houmard, J.A., Kraus, W.E., and Dohm, G.L. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor- α regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 51, 901-909.
- Murakami, N., Bolton, D., and Hwang, Y.W. (2009). Dyrk1A binds to multiple endocytic proteins required for formation of clathrin-coated vesicles. *Biochemistry* 48, 9297-9305.
- Murphy, E.J., Schapiro, M.B., Rapoport, S.I., and Shetty, H.U. (2000). Phospholipid composition and levels are altered in Down syndrome brain. *Brain Res* 867, 9-18.
- Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J., and McNaughton, P.A. (1995). Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1426-1430.
- Nadel, L. (2003). Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav* 2, 156-166.
- Ness, S., Rafii, M., Aisen, P., Krams, M., Silverman, W., and Manji, H. (2012). Down's syndrome and Alzheimer's disease: towards secondary prevention. In *Nat Rev Drug Discov* (England), pp. 655-656.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M.L., Cooke, S., Sesay, A., Modino, S., Vanes, L., Hernandez, D., *et al.* (2005). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science* 309, 2033-2037.
- Oda, Y. (1999). Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 49, 921-937.
- Okui, M., Ide, T., Morita, K., Funakoshi, E., Ito, F., Ogita, K., Yoneda, Y., Kudoh, J., and Shimizu, N. (1999). High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* 62, 165-171.
- Olson, L.E., Roper, R.J., Baxter, L.L., Carlson, E.J., Epstein, C.J., and Reeves, R.H. (2004). Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev Dyn* 230, 581-589.
- Olson, L.E., Roper, R.J., Sengstaken, C.L., Peterson, E.A., Aquino, V., Galdzicki, Z., Siarey, R., Pletnikov, M., Moran, T.H., and Reeves, R.H. (2007). Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum Mol Genet* 16, 774-782.
- Ortiz-Abalia, J., Sahun, I., Altafaj, X., Andreu, N., Estivill, X., Dierssen, M., and Fillat, C. (2008). Targeting Dyrk1A with AAVshRNA attenuates motor alterations in TgDyrk1A, a mouse model of Down syndrome. *Am J Hum Genet* 83, 479-488.
- Ozand, P.T., Hawkins, R.L., Collins, R.M., Jr., Reed, W.D., Baab, P.J., and Oster-Granite, M.L. (1984). Neurochemical changes in murine trisomy 16: delay in cholinergic and catecholaminergic systems. *J Neurochem* 43, 401-408.

- Park, J., Oh, Y., Yoo, L., Jung, M.S., Song, W.J., Lee, S.H., Seo, H., and Chung, K.C. (2010). Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J Biol Chem* 285, 31895-31906.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., and Perry, R. (1999). Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22, 273-280.
- Planque, C., Dairou, J., Noll, C., Bui, L.C., Ripoll, C., Guedj, F., Delabar, J.M., and Janel, N. (2013). Mice deficient in cystathionine beta synthase display increased Dyrk1A and SAHH activities in brain. *J Mol Neurosci* 50, 1-6.
- Polo-Hernandez, E., De Castro, F., Garcia-Garcia, A.G., Tabernero, A., and Medina, J.M. (2010). Oleic acid synthesized in the periventricular zone promotes axonogenesis in the striatum during brain development. *J Neurochem* 114, 1756-1766.
- Pongrac, J.L., and Rylett, R.J. (1996). Differential effects of nerve growth factor on expression of choline acetyltransferase and sodium-coupled choline transport in basal forebrain cholinergic neurons in culture. *J Neurochem* 66, 804-810.
- Pozo, N., Zahonero, C., Fernandez, P., Linares, J.M., Ayuso, A., Hagiwara, M., Perez, A., Ricoy, J.R., Hernandez-Lain, A., Sepulveda, J.M., *et al.* (2013). Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J Clin Invest* 123, 2475-2487.
- Prado, M.A., Reis, R.A., Prado, V.F., de Mello, M.C., Gomez, M.V., and de Mello, F.G. (2002). Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int* 41, 291-299.
- Rachidi, M., and Lopes, C. (2007). Mental retardation in Down syndrome: from gene dosage imbalance to molecular and cellular mechanisms. *Neurosci Res* 59, 349-369.
- Rachidi, M., and Lopes, C. (2008). Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: a consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Eur J Paediatr Neurol* 12, 168-182.
- Raich, W.B., Moorman, C., Lacefield, C.O., Lehrer, J., Bartsch, D., Plasterk, R.H., Kandel, E.R., and Hobert, O. (2003). Characterization of *Caenorhabditis elegans* homologs of the Down syndrome candidate gene DYRK1A. *Genetics* 163, 571-580.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-271.
- Richtsmeier, J.T., Baxter, L.L., and Reeves, R.H. (2000). Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Dev Dyn* 217, 137-145.
- Rodriguez-Rodriguez, R.A., Tabernero, A., Velasco, A., Lavado, E.M., and Medina, J.M. (2004). The neurotrophic effect of oleic acid includes dendritic differentiation and the expression of the neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD2. *J Neurochem* 88, 1041-1051.
- Roper, R.J., Baxter, L.L., Saran, N.G., Klinedinst, D.K., Beachy, P.A., and Reeves, R.H. (2006). Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down [corrected] syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1452-1456.

Rumble, B., Retallack, R., Hilbich, C., Simms, G., Multhaup, G., Martins, R., Hockey, A., Montgomery, P., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1989). Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 320, 1446-1452.

Ryoo, S.R., Cho, H.J., Lee, H.W., Jeong, H.K., Radnaabazar, C., Kim, Y.S., Kim, M.J., Son, M.Y., Seo, H., Chung, S.H., *et al.* (2008). Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104, 1333-1344.

Ryoo, S.R., Jeong, H.K., Radnaabazar, C., Yoo, J.J., Cho, H.J., Lee, H.W., Kim, I.S., Cheon, Y.H., Ahn, Y.S., Chung, S.H., *et al.* (2007). DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J Biol Chem* 282, 34850-34857.

Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J., and Huang, T.T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6256-6261.

Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Rubin, E.M., Crnic, L.S., Huang, T.T., and Epstein, C.J. (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res* 48, 606-613.

Salehi, A., Delcroix, J.D., Belichenko, P.V., Zhan, K., Wu, C., Valletta, J.S., Takimoto-Kimura, R., Kleschevnikov, A.M., Sambamurti, K., Chung, P.P., *et al.* (2006). Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* 51, 29-42.

Salvaterra, P.M., and McCaman, R.E. (1985). Choline acetyltransferase and acetylcholine levels in *Drosophila melanogaster*: a study using two temperature-sensitive mutants. *J Neurosci* 5, 903-910.

Sarter, M., and Parikh, V. (2005). Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci* 6, 48-56.

Saud, K., Arriagada, C., Cardenas, A.M., Shimahara, T., Allen, D.D., Caviedes, R., and Caviedes, P. (2006). Neuronal dysfunction in Down syndrome: contribution of neuronal models in cell culture. *J Physiol Paris* 99, 201-210.

Schmidt-Sidor, B., Wisniewski, K.E., Shepard, T.H., and Sersen, E.A. (1990). Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clin Neuropathol* 9, 181-190.

Schmidt, B.M., and Rylett, R.J. (1993). Phosphorylation of rat brain choline acetyltransferase and its relationship to enzyme activity. *J Neurochem* 61, 1774-1781.

Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101-1108.

Schneider, C., Risser, D., Kirchner, L., Kitzmuller, E., Cairns, N., Prast, H., Singewald, N., and Lubec, G. (1997). Similar deficits of central histaminergic system in patients with Down syndrome and Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 222, 183-186.

- Schuchmann, S., and Heinemann, U. (2000). Diminished glutathione levels cause spontaneous and mitochondria-mediated cell death in neurons from trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *J Neurochem* 74, 1205-1214.
- Shah, S.N. (1979). Fatty acid composition of lipids of human brain myelin and synaptosomes: changes in phenylketonuria and Down's syndrome. *Int J Biochem* 10, 477-482.
- Shapiro, B.L. (1999). The Down syndrome critical region. *J Neural Transm Suppl* 57, 41-60.
- Shukkur, E.A., Shimohata, A., Akagi, T., Yu, W., Yamaguchi, M., Murayama, M., Chui, D., Takeuchi, T., Amano, K., Subramhanya, K.H., *et al.* (2006). Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum Mol Genet* 15, 2752-2762.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Skene, J.H., and Virag, I. (1989). Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *J Cell Biol* 108, 613-624.
- Smith, D.J., Stevens, M.E., Sudanagunta, S.P., Bronson, R.T., Makhinson, M., Watabe, A.M., O'Dell, T.J., Fung, J., Weier, H.U., Cheng, J.F., *et al.* (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet* 16, 28-36.
- Suarez, E., Bach, D., Cadefau, J., Palacin, M., Zorzano, A., and Guma, A. (2001). A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake, glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J Biol Chem* 276, 18257-18264.
- Sultan, M., Piccini, I., Balzereit, D., Herwig, R., Saran, N.G., Lehrach, H., Reeves, R.H., and Yaspo, M.L. (2007). Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes. *Genome Biol* 8, R91.
- Sweeney, J.E., Hohmann, C.F., Oster-Granite, M.L., and Coyle, J.T. (1989). Neurogenesis of the basal forebrain in euploid and trisomy 16 mice: an animal model for developmental disorders in Down syndrome. *Neuroscience* 31, 413-425.
- Tabernero, A., Bolanos, J.P., and Medina, J.M. (1993). Lipogenesis from lactate in rat neurons and astrocytes in primary culture. *Biochem J* 294 (Pt 3), 635-638.
- Tabernero, A., Granda, B., Medina, A., Sanchez-Abarca, L.I., Lavado, E., and Medina, J.M. (2002a). Albumin promotes neuronal survival by increasing the synthesis and release of glutamate. *J Neurochem* 81, 881-891.
- Tabernero, A., Lavado, E.M., Granda, B., Velasco, A., and Medina, J.M. (2001). Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J Neurochem* 79, 606-616.
- Tabernero, A., Medina, A., Sanchez-Abarca, L.I., Lavado, E., and Medina, J.M. (1999). The effect of albumin on astrocyte energy metabolism is not brought about through the control of cytosolic Ca²⁺ concentrations but by free-fatty acid sequestration. *Glia* 25, 1-9.

Tabernero, A., Velasco, A., Granda, B., Lavado, E.M., and Medina, J.M. (2002b). Transcytosis of albumin in astrocytes activates the sterol regulatory element-binding protein-1, which promotes the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Biol Chem* 277, 4240-4246.

Takashima, S., Becker, L.E., Armstrong, D.L., and Chan, F. (1981). Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res* 225, 1-21.

Takashima, S., Iida, K., Mito, T., and Arima, M. (1994). Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res* 38 (Pt 3), 265-273.

Tan, N.S., Shaw, N.S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., Wahli, W., and Noy, N. (2002). Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 22, 5114-5127.

Tandon, A., Bachoo, M., Weldon, P., Polosa, C., and Collier, B. (1996). Effects of colchicine application to preganglionic axons on choline acetyltransferase activity and acetylcholine content and release in the superior cervical ganglion. *J Neurochem* 66, 1033-1041.

Teipel, S.J., Schapiro, M.B., Alexander, G.E., Krasuski, J.S., Horwitz, B., Hoehne, C., Moller, H.J., Rapoport, S.I., and Hampel, H. (2003). Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome. *Am J Psychiatry* 160, 1870-1878.

Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., and Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* 14, 287-301.

Tejedor, F.J., and Hammerle, B. (2011). MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *FEBS J* 278, 223-235.

Troca-Marin, J.A., Alves-Sampaio, A., and Montesinos, M.L. (2011). An increase in basal BDNF provokes hyperactivation of the Akt-mammalian target of rapamycin pathway and deregulation of local dendritic translation in a mouse model of Down's syndrome. *J Neurosci* 31, 9445-9455.

Troca-Marin, J.A., Casanas, J.J., Benito, I., and Montesinos, M.L. (2014). The Akt-mTOR Pathway in Down's Syndrome: The Potential Use of Rapamycin/Rapalogs for Treating Cognitive Deficits. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 13, 34-40.

Vacano, G.N., Duval, N., and Patterson, D. (2012). The use of mouse models for understanding the biology of down syndrome and aging. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2012, 717315.

van Bon, B.W., Hoischen, A., Hehir-Kwa, J., de Brouwer, A.P., Ruivenkamp, C., Gijsbers, A.C., Marcelis, C.L., de Leeuw, N., Veltman, J.A., Brunner, H.G., *et al.* (2011). Intragenic deletion in DYRK1A leads to mental retardation and primary microcephaly. *Clin Genet* 79, 296-299.

van Es, S., Weening, K.E., and Devreotes, P.N. (2001). The protein kinase YakA regulates g-protein-linked signaling responses during growth and development of *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 276, 30761-30765.

Vance, D.E. (2013). Phospholipid methylation in mammals: from biochemistry to physiological function. *Biochim Biophys Acta*.

Vance, J.E., and Vance, D.E. (2004). Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 82, 113-128.

Velasco, A., Tabernero, A., and Medina, J.M. (2003). Role of oleic acid as a neurotrophic factor is supported in vivo by the expression of GAP-43 subsequent to the activation of SREBP-1 and the up-regulation of stearyl-CoA desaturase during postnatal development of the brain. *Brain Res* 977, 103-111.

Vuksic, M., Petanjek, Z., Rasin, M.R., and Kostovic, I. (2002). Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatr Neurol* 27, 36-38.

Walker, A.K., Jacobs, R.L., Watts, J.L., Rottiers, V., Jiang, K., Finnegan, D.M., Shioda, T., Hansen, M., Yang, F., Niebergall, L.J., *et al.* (2011). A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans. *Cell* 147, 840-852.

Wegiel, J., Dowjat, K., Kaczmarek, W., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur Krolecka, B., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., *et al.* (2008). The role of overexpressed DYRK1A protein in the early onset of neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *Acta Neuropathol* 116, 391-407.

Wegiel, J., Gong, C.X., and Hwang, Y.W. (2011). The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J* 278, 236-245.

Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Dowjat, K., Silverman, W.P., Reisberg, B., DeLeon, M., Wisniewski, T., Adayev, T., *et al.* (2004). Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res* 1010, 69-80.

Yabut, O., Domogauer, J., and D'Arcangelo, G. (2010). Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Neurosci* 30, 4004-4014.

Yates, C.M., Simpson, J., Gordon, A., Maloney, A.F., Allison, Y., Ritchie, I.M., and Urquhart, A. (1983). Catecholamines and cholinergic enzymes in pre-senile and senile Alzheimer-type dementia and Down's syndrome. *Brain Res* 280, 119-126.