

UCH-FC
MA5-BMCN
A189
C.1



**UNIVERSIDAD DE
CHILE**

**EFFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE RCAN1 EN LA REGULACIÓN DE
LAS CORRIENTES DE CALCIO ACTIVADAS POR VOLTAJE EN UNA LÍNEA
CELULAR DE CORTEZA CEREBRAL DERIVADA DE Ts16 (CTb), UN
MODELO MURINO DEL SÍNDROME DE DOWN.**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado de**

**Magíster en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y
Neurociencias**

Facultad de Ciencias

Por

Mario Andrés Acuña Miranda

Enero, 2012.

**Director de Tesis, Dr. Pablo Caviedes.
Codirector: Prof. Christian Arriagada A.**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER**

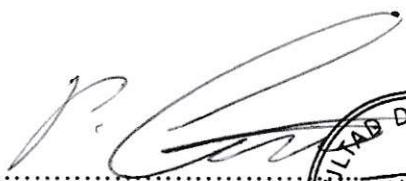
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magíster presentada por el candidato

MARIO ANDRÉS ACUÑA MIRANDA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 26 de Diciembre de 2011.

Director de Tesis:

Dr. Pablo Caviedes


.....


Co-Director de Tesis:

Dr. Christian Arriagada

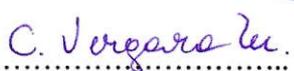
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Marco T. Nuñez


.....

Dra. Cecilia Vergara


.....



A mi familia...



Agradecimientos.

Al profesor Pablo Caviedes, por su incansable e incondicional ayuda brindada cuando siempre la necesité. A su padre, Dr. Raúl Caviedes, por compartir conmigo su experiencia en cultivo celular y anécdotas de vida.

A Lucía, por su apoyo durante el recorrido de este camino académico.

A Ramón Pérez, Jorge Noriega, Esteban González, Fernando "tuta" Guzmán, Nany Armijo, Christian Arriagada y Guillermo Elorza, con quienes he compartido grandes momentos en el Laboratorio y con sus conocimientos y buena voluntad contribuyeron a sacar adelante esta Tesis.

A mis tíos Keka y Cano, por su ayuda incondicional durante mi tiempo en Santiago.

Esta Tesis fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1090160 y por Fondos de Contingencia de la Universidad de Chile.



INDICE DE MATERIAS

RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
I.- Síndrome de Down.....	1
II.- Modelos del Síndrome de Down	5
III.- Neuronas en cultivo provenientes de ratones Ts16	8
IV. Líneas Celulares	10
V. Revirtiendo la sobre-expresión.	11
VI. El gen RCAN1.....	13
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	18
Objetivos generales.....	18
Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Modelos experimentales.....	20
Cultivo celular	20
Expresión génica.....	21
Lisis celular, extracción de proteínas	21
Cuantificación de proteínas.....	22
Western blot.....	22
Tinción intracelular para Citometría de Flujo:	23
Interferencia de la expresión génica.	24
Registros de Corrientes de Ca ²⁺	25
Control de Voltaje.....	27
Control de Corriente	29
Movimiento total de cargas.....	29
Adición de drogas:	29
Estadística.....	30
RESULTADOS	31
1. Características de las células.....	31
2. Corrientes de calcio dependientes de voltaje en CNh y CTb.	31

2.1 Propiedades pasivas de membrana.....	32
2.2. Corrientes de Calcio activadas por Voltaje.....	32
3. Expresión de RCAN1 en CNh, CTb, Y CTb transfectadas.....	44
4. Corrientes de calcio dependiente de voltaje en CNh, CTb Y CTb transfectadas.....	45
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	74
ADENDUM	84





Lista de Tablas

Tabla 1. Soluciones utilizadas para registros de Corrientes de Calcio	26
Tabla 2. Propiedades pasivas de membrana de células CNh y CTb	31
Tabla 3. Valores de constante de tiempo para corrientes de Ca^{2+} en CNh y CTb	40
Tabla 4. Valores de constante de tiempo para corrientes de Ca^{+2} en células CTb transfectadas y CNh	49

Lista de Figuras.

Figura 1. Cariotipo de un paciente SD.....	2
Figura 2. Curva de incidencia de SD relativo a la edad de la madre.....	3
Figura 3. Sintenia entre el Cromosoma 21 humano y el 16 murino.....	6
Figura 4. Modelo explicativo del rol de CaN sobre los canales de calcio y la participación de RCAN1.....	15
Figura 5. Diagrama de flujo de la realización de la presente tesis.....	16
Figura 6. Imágenes representativas de respuestas de Corrientes de Calcio en células CNh y CTb	33
Figura 7. Curva I-V de células CNh y CTb.	34
Figura 8. Efecto de la adición de Nifedipina en las corrientes de calcio.....	35
Figura 9. Rol del anión Cl^- en las corrientes de cola.....	36
Figura 10. Inactivación dependiente de voltaje en células CNh y CTb.....	38
Figura 11. Movimiento total de cargas en las células CNh y CTb	39
Figura 12. Expresión de la proteína RCAN1.	43
Figura 13. Eficiencia de transfección.....	44
Figura 14. Registros representativos para CTb transfectadas con siRNA para RCAN1 y CNh	46
Figura 15. Registros representativos para CTb transfectadas con secuencia <i>scrambled</i> y CTb control	47

Figura 16. Curva I-V registros de corrientes en células CTb transfectadas y controles.....	48
Figura 17. Curva inactivación dependiente de voltaje en células CTb transfectadas y controles	50
Figura 18. Movimiento total de carga en células CTb transfectadas y controles.	52
Figura 19. Imagen representativa de corrientes de calcio en célula CNh incubada con FK-506 y control.....	52
Figura 20. Curva I-V de registros de corrientes de calcio en células CNh incubadas con FK-506 y controles	54
Figura 21. Inactivación dependiente de voltaje en células CNh incubadas con FK-506 y controles	55
Figura 22. Movimiento total de carga en células CNh incubadas con FK-506 y controles.....	56
Figura 23. Modelo esquemático del posible rol de RCAN1 en la regulación de los canales de calcio.....	70

Lista de Símbolos y Abreviaturas.

Acetil Colintransferasa (ChAT),
Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-
etanosulfónico (HEPES),
Ácido etilen glicol-bis(2-aminoetil)-
N,N,N',N'-tetracético (EGTA),
Ácido ribonucleico (RNA),
Ácido ribonucleico mensajero
(mRNA),
Amperios (A),
Análisis de Varianza (ANOVA),
Calcineurina (CaN),
Calcio (Ca^{2+}),
Canal de potasio rectificador de
entrada acoplado a proteína G
(GIRK2),
Capacitancia (C),
Cloruro (Cl^-),
Cloruro de Calcio (CaCl_2),
Cloruro de Cesio (CsCl),
Cloruro de Magnesio (MgCl_2),
Constante de tiempo (τ),
Corrientes de calcio activadas por
voltaje (I_{Ca}),
Dalton (Da),
Desviación estándar(D.S.),
Dodecil sulfato de sodio (SDS),
Error estándar (E.E.)
Factor nuclear del linfocito T
activado, componente
citoplasmático (NFATc),
Faradio (F),
Gánglio de la Raóz dorsal (GRD),
Gen que codifica para el
Transportador sodio/Myo-Inositol
(Slc5a3/SMIT 1),
Grados Celcius ($^{\circ}\text{C}$),
Gramo (gr),
Hercios (Hz),
Horas (hrs),
Línea celular derivada de corteza
cerebral de ratones Ts16 (CTb),
Línea celular derivada de corteza
cerebral de ratón euploide (CNh),
Litro (l),
Milivoltios (mV),
Minutos (min),
Molar (M),
Nanómetros (nm),
N-metil D-aspartato (NMDA),
Número de muestras (n),
Ohm (Ω),
Potasio (K^+),
Proteína precursora amiloide (APP),
Proteína quinasa A (PKA),
Proteína serina-treonina quinasa de
accion dual 1A (Dyrk1A),
Regulador de Calcineurina 1
(RCAN1),
Relación volumen/volumen (v/v),
Resistencia (R),
Revoluciones por minuto (rpm),
RNA-induced silencing complex
(RISC),
Secuencias interferentes (siRNA)
Secuencia control - Scrambled (Scr),
Secuencias cortas de RNA (siRNA),
Segundos (s)
Síndrome de Down (SD),
Sistema Nervioso Central (SNC),
Sodio (Na^+),
Superóxido dismutasa 1(SOD1),
Tetraetilamonio (TEA),
Tetrodotoxina (TTX),
Trisomía 16 murina (Ts16),
Western blot (WB).

RESUMEN

El síndrome de Down (SD) es determinado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21. Se manifiesta a través de múltiples anomalías, siendo el retardo mental la característica más sobresaliente. La condición resulta en alteraciones en las propiedades eléctricas de membrana en neuronas fetales, idénticas a las encontradas en la trisomía 16 murina (Ts16), un modelo animal del SD. En efecto, neuronas derivadas de ganglio de la raíz dorsal (GRD) exhiben una reducción en la amplitud máxima de corrientes de calcio activadas por voltaje (I_{Ca}). Inversamente, neuronas en cultivo de hipocampo de Ts16 muestran un aumento en su amplitud. El regulador de Calcineurina 1 (RCAN1) se encuentra presente en el cromosoma 21 humano y 16 murino. Esta proteína inhibe a calcineurina (CaN), la cual posee varios sustratos conocidos, entre otros, los canales de calcio tipo L. Debido a que los animales Ts16 son inviables, nuestro grupo ha establecido líneas celulares inmortalizadas de corteza cerebral provenientes de estos ratones (llamadas CTb) también como de ratones diploides (llamadas CNh). Tal como en SD, RCAN1 está sobre-expresado en las células CTb. Considerando lo anterior, decidimos explorar las I_{Ca} en las células CTb y CNh, mediante la técnica de patch clamp en célula entera. Encontramos una corriente de calcio inmadura sensible a nifedipina. La

activación de estas corrientes ocurre a -40 mV en ambos tipos celulares. Las células trisómicas exhibieron un aumento de 2,4 veces en la densidad máxima de I_{Ca} , un cambio de 15 mV hacia potenciales más despolarizados en la curva de inactivación dependiente de voltaje, y un aumento en el movimiento total de carga de aproximadamente 2,5 veces. Para elucidar el rol de RCAN1 sobreexpresado en la condición trisómica, se transfectó con secuencias interferentes específicas para RCAN1 (*knockdown*). Este procedimiento llevó la densidad de las I_{Ca} a niveles similares a los encontrados en CNh. El cambio en la curva de inactivación dependiente de voltaje en CTb fue revertida a niveles comparables con CNh. También el knockdown de RCAN1 logró bajar el movimiento total de carga en CTb, sugiriendo una correlación entre el nivel de inactivación y el movimiento de carga. Más aun, la inhibición farmacológica de CaN por Fk-506 en células CNh, produce un aumento en la densidad de I_{Ca} incluso por sobre los valores de CTb. Sin embargo, la curva de inactivación dependiente de voltaje en CNh, cambió solo parcialmente hacia potenciales más despolarizados luego de la inhibición de CaN, no alcanzando los valores de las células CTb. Estos resultados muestran un rol de RCAN1 en la regulación de los canales de calcio activados por voltaje vía regulación de la compuerta de inactivación. Este mecanismo no es totalmente dependiente de CaN. No obstante, esta fosfatasa juega un importante rol en la regulación de estas corrientes regulando a los canales mediante otro mecanismo. Por lo tanto, el knockdown de RCAN1 revirtió las alteraciones en I_{Ca} descritas en CTb,

sugiriendo que la sobre-expresión de esta proteína altera la conductancia de calcio a través de los canales activados por voltaje, así comprometiendo funciones neuronales críticas. Los mecanismos regulados por RCAN1 podrían constituir posibles blancos terapéuticos en el SD.

ABSTRACT

Human Down Syndrome (DS) is determined by the presence of an extra copy of autosome 21. It is manifested by multiple abnormalities, being mental retardation the most striking feature. The condition results in altered electrical membrane properties of fetal neurons identical to those of trisomy 16 fetal mice (Ts16), an animal model of DS condition. Indeed, Ts16 cultured dorsal root ganglia (DRG) neurons exhibit voltage-gated Ca^{2+} current (I_{Ca}) with reduced amplitude. Conversely, Ts16 hippocampal cultured neurons showed increased I_{Ca} amplitude. The Regulator of calcineurin-1 (Rcan1) is present in human chromosome 21 and murine autosome 16. This protein inhibits calcineurin (CaN), which has several known targets, as among them the regulation of L-type voltage-gated calcium channels. Since Ts16 animals are unviable, we have established immortalized cell lines from the cerebral cortex of Ts16 (named CTb) and euploid littermates (named CNh). As in DS, Rcan1 is overexpressed in CTb cells. Considering the above, we decided to explore I_{Ca} in CTb and CNh cultured cells, using the whole-cell patch-clamp technique. We encountered an immature, nifedipine-sensitive calcium current. Current activation occurs at -40mV in both cell lines ($V_{\text{holding}} = -80$ mV). Trisomic cells exhibited a 2.4-fold increase in the maximal I_{Ca} density, a 15 mV shift toward more depolarized

potential in steady-state voltage-dependent inactivation curve and an increase in the total charge movement at the inactivation test pulse level by approximately 2.5-fold. To elucidate the role of overexpressed Rcan1 in the trisomic condition, we transfected CTb cells with specific siRNA to reduce the expression of this gene to levels comparable to those of CNh (*“knockdown”*). This procedure brought the maximal I_{Ca} density in CTb cells to levels similar to those of CNh. The shift in steady-state voltage-dependent inactivation in CTb was reversed to levels comparable to those of CNh cells. Also, Rcan1 knockdown reduced the charge movement to levels comparable to those CNh cells, suggesting a correlation between the inactivation level and charge movement. Further, pharmacological inhibition of CaN increases I_{Ca} in CNh cells. Nevertheless, the voltage dependence of inactivation in these cells shifted only partially towards more depolarized potentials upon CaN inhibition, and did not reach the values of CTb cells. These results show a role of Rcan1 in the regulation of voltage-gated calcium channels via regulation of the inactivation gate. Further, the results suggest that this regulation is not totally CaN-dependent. Nevertheless, this phosphatase plays an important role in the regulation of the current, possibly via activation gate or voltage sensor. Further, Rcan1 knockdown reverted most of the alterations noted for I_{Ca} in CTb cells, suggesting that Rcan1 overexpression altered calcium channel conductance, hence compromising critical neuronal functions. Rcan1-regulated mechanisms may constitute possible therapeutic targets in DS.

INTRODUCCIÓN

I. Síndrome de Down.

El Síndrome de Down (SD) fue descrito por el médico inglés John Langdon Down en 1866 y en 1959 se demostró que resultaba de la presencia de una copia extra del cromosoma 21 (Ts21; Jacobs y col. 1959, Lejeune y col. 1959). Los pacientes SD exhiben un característico retardo mental, que puede estar acompañado de múltiples anomalías, tales como, malformaciones cardíacas congénitas, hipotonía muscular, mayor incidencia de leucemia a edades tempranas, alteraciones visuales e inmunológicas. El SD se relaciona de manera muy interesante con el desarrollo temprano de neuropatología típica de la enfermedad de Alzheimer: presencia de placas seniles, depósitos de amiloide y gliosis (Epstein, 1986 a y b, Reeves, 1986; Ault y col. 1989a; Cárdenas y col. 1999; Saud y col. 2006).

Como ya se mencionó, el síndrome resulta de la presencia de una copia extra del cromosoma 21, que corresponde a un cromosoma acrocéntrico y que es el más pequeño en el ser humano (figura. 1). A su vez, fue el primer cromosoma humano en ser completamente secuenciado, estudio realizado por Hattori y col. (2000), y que permitió identificar en este autosoma 127 genes, 98 posibles

nuevos genes y 59 pseudo-genes, todos los cuales pueden estar sobre-expresados en SD (Epstein, 1986a; Hattori y col. 2000; Saud y col. 2006)

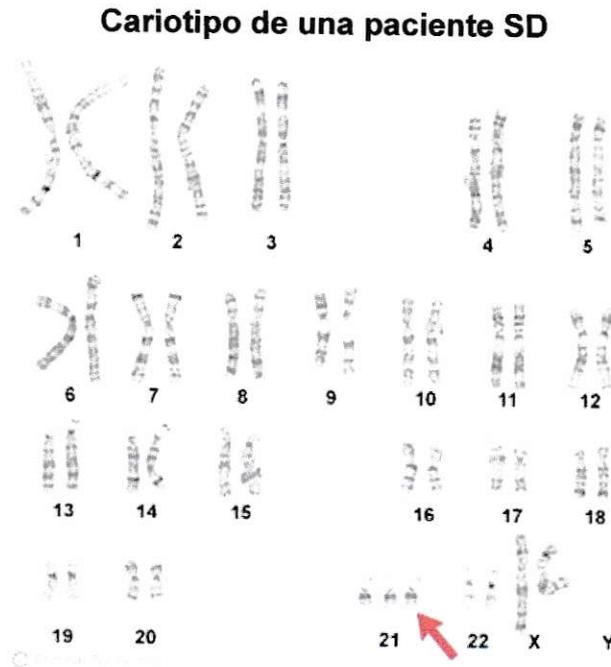


Figura 1. Cariotipo de una mujer con SD, la flecha roja señala la trisomía del Cromosoma 21. Clinical tools, Inc.

El SD es frecuentemente letal en el desarrollo temprano, y se ha estimado que el 75%-90% de fetos con SD mueren espontáneamente *in utero*. Su incidencia es de aproximadamente 1:700 nacidos vivos (Reeves y col. 1986; Morris y col. 2002), existiendo un riesgo creciente directamente asociado con la edad de la madre. En efecto, para mujeres gestantes menores de 30 años, la probabilidad es menor a 1:1000; sin embargo, ésta aumenta a 1:350 a la edad de 35, y dramáticamente a 1:100 a partir de los 40 (Morris y col. 2002) (figura 2)

Curva de incidencia de SD relativo a la edad de la madre

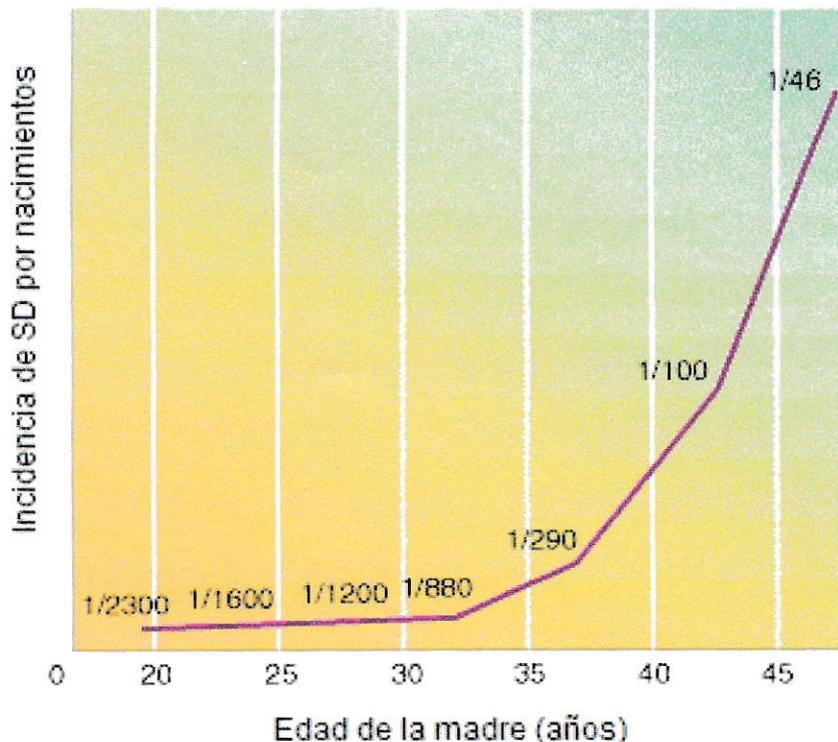


Figura 2. Curva de la incidencia de nacimientos SD por número de hijos, versus la edad materna. Se nota claramente la rectificación alrededor de los 35 años.

La trisomía del cromosoma 21 es generalmente causada por una no-disyunción en la primera fase de la meiosis del oocito, la cual está presente en más del 90% de los casos. También, raramente, puede ser generado mediante translocaciones en cual el brazo largo del cromosoma se une a otro, usualmente el 14, 21 o 22. Una tercera causa es la trisomía mosaica, la cual representa el 2-6% del total de casos, dónde la trisomía se genera tempranamente en la embriogénesis, resultando individuos con algunas células

con 46 cromosomas y en otras con 47, implicando distintos grados de manifestaciones fenotípicas, dependiendo del porcentaje de células trisómicas.

Actualmente se sabe que para desarrollar SD, se requiere de al menos la presencia de una porción definida del cromosoma 21 (bandas 21q22.1 a cuarta), denominada región crítica del SD. Claramente, el síndrome no está determinado por mutaciones, inserciones o deleciones, sino que se produce en el contexto de un exceso de dosis génica. Sin embargo, las implicancias específicas en la función celular derivadas de esta sobre-expresión generalizada aún no están esclarecidas (Saud y col. 2006). Teóricamente, los genes están presentes en 3 copias, lo que significaría un aumento en su expresión de 1,5 veces en relación a la condición diploide.

El SD representa cerca del 30% de los casos de retardo mental leve o severo (Pulsifer, 1996). Además del característico deterioro mental, el síndrome es acompañado por un aumento en la frecuencia de malformaciones cardíacas congénitas, hipotonía muscular, una gran incidencia de leucemia, y una aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer antes de la cuarta década de vida (manifestada por presencia de placas seniles, depósitos de amiloide, ovillos neurofibrilares y gliosis) (Epstein, 1986 a,b; Reeves y col. 1986, Ault y col. 1989a, Saud y col. 2006).

Las bases del retardo mental en el SD aún son desconocidas (Epstein, 1986 a,b; Schapiro y col. 1989; Pulsifer, 1996). Todas las evidencias morfológicas contradictorias reportadas para cerebros de fetos, pacientes jóvenes y adultos con SD (Marín-Padilla, 1972 y 1976; Schapiro y col. 1987; Dekaban, 1978; Horwitz y col. 1990) sugieren la existencia de una alteración funcional preponderante en la génesis del retardo mental, por sobre las alteraciones estructurales (Gibbs y Gibbs, 1964; Boullin y O'Brien, 1971 ; Yates y col. 1980; Yates y col. 1983; Fiedler y col. 1994; revisado por Galdzicki y col. 2001), particularmente en una fase temprana del desarrollo.

II.- Modelos de Síndrome de Down

Si bien, se han realizado estudios en cultivos primarios provenientes de pacientes SD, los problemas éticos y prácticos asociados en la obtención y mantención de tejidos humanos han limitado su uso. Ello llevó a la búsqueda de modelos animales para entender la fisiopatología del síndrome. A este respecto, el primer modelo animal desarrollado para el estudio del SD fue la trisomía 16 murina (Ts16), donde se encuentra por triplicado el cromosoma 16 completo, autosoma que guarda la mayor homología con el cromosoma 21 humano (Epstein y col. 1985) (figura. 3).

Sintenia entre el Cromosoma 21 humano y el 16 murino

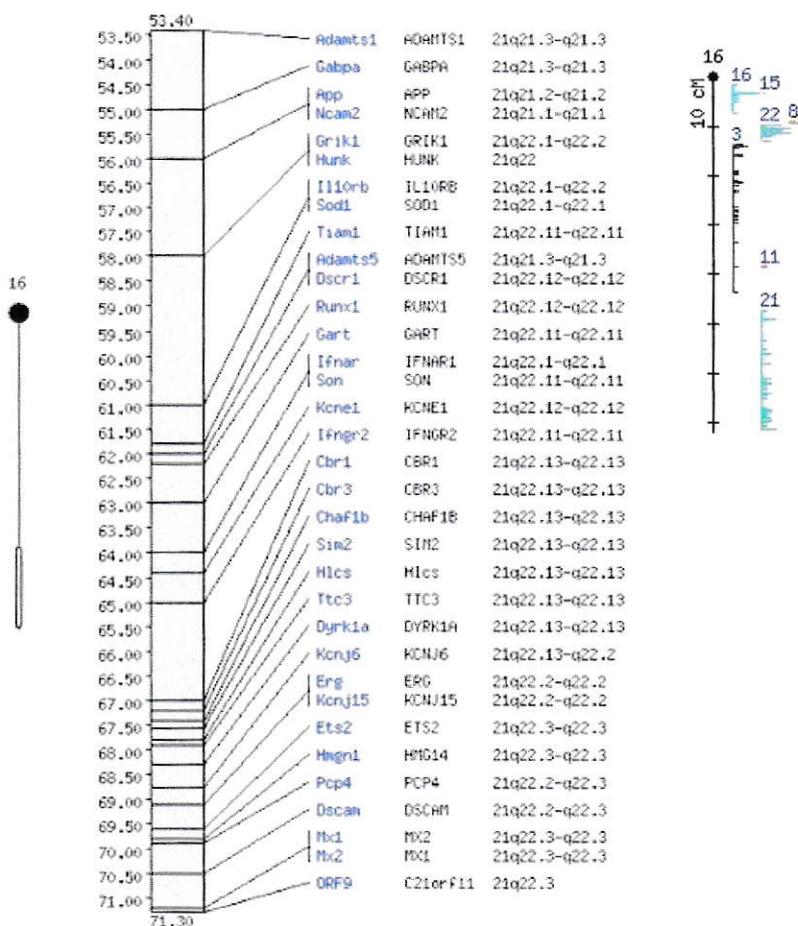


Figura 3. Izquierda: Homología del Cromosoma 21 humano y el cromosoma 16 murino. Derecha: Se indica la ubicación de los genes presentes en el cromosoma 16 en distintos cromosomas humanos. (Jackson Lab.)

Desgraciadamente, los ratones Ts16 no son viables y mueren *in utero* entre los

14 y 16 días de gestación. Para superar este obstáculo, se han creado modelos de trisomía parciales en donde sólo porciones de la región distal del cromosoma 16 han sido triplicadas. Entre ellos destaca, el modelo Ts65Dn (Davisson y col. 1990), cuya región del Ts16 triplicada corresponde más cercanamente a la 21q21-22.3 del cromosoma 21 humano. Otro modelo de trisomía parcial es el Ts1Cje, el cual posee una porción triplicada más pequeña (Sago y col. 1998). Estos ratones con trisomías parciales son viables y han sido muy útiles para realizar estudios de comportamiento. El modelo más usado es el Ts65Dn, en el cual están presentes muchos de los cambios fenotípicos vistos en SD (Dierssen y col. 1996; Dierssen y col. 1997; Ruiz de Azua y col. 2001). Sin embargo, aunque estos animales sobreviven hasta la adultez, éstos carecen de algunos genes de la porción definida del cromosoma 16, lo cual compromete las interacciones de todos los productos génicos involucrados en la trisomía completa, y así complican las conclusiones relacionadas con la patología. Por ejemplo, Ts1Cje exhibe niveles normales de Superóxido dismutasa (SOD1) y existe una pérdida de la degeneración característica de neuronas colinérgicas (Sago y col. 1998)

Por otra parte, se han desarrollado animales transgénicos que poseen tres copias para un gen en particular asociado al SD. Pero, estos modelos no reproducen los posibles efectos cooperativos de los genes que corresponden al autosoma triplicado. Un caso que ilustra esta situación es el modelo transgénico para SOD1, donde las neuronas ganglionares en cultivo no presentan los

potenciales de acción alterados observados en la trisomía completa (Ault y col. 1989b).

III. Neuronas en cultivo provenientes de ratones Ts16.

Usando cultivos de neuronas de Ts16, varios grupos de investigadores han descrito esencialmente las mismas alteraciones electrofisiológicas en la condición humana: incrementos en la de velocidad de despolarización y repolarización del potencial de acción, y reducción de la duración de la espiga; ello estaría determinado por alteraciones en densidad y cinéticas de las corrientes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Nieminen y col. 1988; Caviedes y col. 1990). Aquellos resultados han validado el modelo animal para la fisiopatología del SD. En efecto, la condición trisómica, tanto en el hombre como en el ratón, determina alteraciones comparables en mecanismos íntimamente relacionados a la membrana celular. Sin embargo, estas alteraciones difieren cuantitativa y cualitativamente en diferentes regiones del sistema nervioso. (Ault y col. 1989a; Acevedo y col 1995; Fiedler y col. 1994). En el septum, médula espinal y neuronas ganglionares, hay un incremento en la velocidad de despolarización y repolarización con un acortamiento en la duración de la espiga (Ault y col. 1989a; Acevedo y col. 1995). Por el contrario, en cultivos de neuronas del hipocampo, se observa una situación inversa, donde las neuronas trisómicas exhiben una despolarización más lenta y con un potencial de acción de mayor

duración, posiblemente debido a una disminución en la densidad de la corriente de Na^+ (Galdzicki y col. 1993). Por el contrario, las neuronas ganglionares muestran un incremento en la densidad de la corriente de Na^+ , lo cual concuerda con el incremento en la fase de despolarización (Orozco y col. 1988).

Corrientes de Ca^{2+} .

Caviedes y col. (2006), usando células ganglio de la raíz dorsal (GRD) en cultivo primario provenientes de ratón Ts16, encontraron que las neuronas trisómicas exhiben una reducción en la amplitud de corriente de calcio. A su vez, estos autores describieron una reducción en la dependencia de voltaje de activación a -30 y -20mV. También, las neuronas trisómicas mostraron una disminución en la cinética de activación para las corrientes de Ca^{2+} , con un aumento del 80% en los valores de constantes de tiempo, pero no manifestaron diferencias significativas en la cinética de inactivación.

Por otra parte, Galdzicki y col. (1998), usando células hipocámpales de ratón Ts16 en cultivo, curiosamente encontraron un gran aumento de la amplitud en corriente de entrada de Ca^{2+} activada por voltaje. La densidad de la corriente fue 80% mayor en Ts16 que en las células diploides, pero las propiedades de cinética y dependencia de voltaje no difirieron entre los dos grupos de neuronas. El aumento en la densidad de la corriente se debería posiblemente a una mayor expresión de canales de Ca^{2+} tipo L sensibles a dihidropiridina, dado

por una mayor unión a [3H]PN200-110. Sin embargo, no se hallaron diferencias en la expresión a nivel del mensajero de los canales de calcio tipo L.

Estos hallazgos refuerzan la idea que la trisomía tanto humana como murina determina efectos diversos, incluso opuestos, en las propiedades eléctricas de la membrana celular en distintas áreas del sistema nervioso. Es por lo tanto necesario llevar a cabo estudios funcionales en células nerviosas de distintos territorios en relación a la expresión génica en el SD, con el objeto de encontrar el nexo entre la sobre-expresión de ciertos genes y las disfunciones específicas a las que se hizo referencia anteriormente.

IV. Líneas Celulares

Debido a la importancia que reviste el evaluar la contribución individual de los genes sobre-expresados en la trisomía 16 murina como modelo de SD, y para superar la limitante de la inviabilidad del modelo murino y la poca cantidad de tejido procurable para realizar muchos estudios, es que el grupo del Dr. Pablo Caviedes ha establecido líneas celulares neuronales derivadas de corteza cerebral de ratones normales (CNh) y trisómicos 16 (CTb) mediante un protocolo de transformación mediado por factores solubles presentes en el medio condicionado de la línea celular UCHT1 (Caviedes y Stanbury, 1976), lo cual induce inmortalización celular estable en distintos periodos de tiempo (Caviedes y col. 1993; Liberona y col. 1997; Cárdenas y col. 2002a,b; Allen y

col. 2002) . En particular, la línea celular derivada de corteza cerebral de ratón trisómico 16 (CTb), presenta un aumento del Ca^{2+} intracelular basal y respuestas alteradas a estimulación de receptores de glutamato, posiblemente debido a la alteración de los mecanismos reguladores del Ca^{2+} citosólico (Cárdenas y col. 1999).

V. Revirtiendo la sobre-expresión.

El problema en la utilización de modelos de trisomía parcial (Ts65Dn, Ts1Cje) radica en que para determinar el daño génico en el síndrome de Down se debe **evaluar la contribución de cada gen triplicado en el contexto de la trisomía completa**, en la cual esta sobre-expresión generalizada determina una nueva “homeostasis” (o “*dis-homeostasis*”), siendo determinante la región crítica de SD del cromosoma 21 humano o alternativamente el cromosoma 16 murino (Saud y col. 2006)

Mediante la disminución de la expresión génica, técnica llamada *knockdown*, se ha determinado la contribución de varios genes en el contexto de esta sobre-expresión generalizada en células CTb. Entre ellos destacan el gen *APP* (Opazo y col. 2006; Rojas y col. 2008), que codifica a la Proteína Precursora de Amiloide; el gen *Slc5a3*, el cual codifica para el transportador Na^+ /myo-inositol

(SMIT 1) (Díaz-Franulic y col. 2007) y el gen *Sod1* (Mikkola y col. 2008), que codifica a la enzima Superóxido dismutasa 1.

Recientemente, el uso de RNA interferente (iRNA) ha adquirido gran relevancia. Este utiliza un mecanismo de defensa ancestral contra RNA de doble cadena (dsRNA) foráneo. Secuencias cortas de RNA de solo 22 nucleótidos llamados iRNA pequeños (siRNA) son recortados de un dsRNA más largo por una enzima llamada Dicer. La cadena de siRNA es usada por un complejo silenciador inducido por RNA (RNA-induced silencing complex, RISC) para llevar un mRNA específico a vías de clivaje y degradación (Wasi, 2003). Así, los siRNA diseñados para un mRNA específico puede silenciar eficientemente la expresión de un gen blanco, tras lo cual el pool de proteína se depleta progresivamente en función de su catabolismo, definiendo así el concepto de *knockdown* (Estibeiro y Godfray, 2001). Esta técnica es ideal para estudiar la función de un gen específico, es más rápida y con mejor costo-beneficio que la generación de *knockouts*. Afortunadamente, se han diseñado siRNA probadamente eficientes para diversos genes murinos, que consiguen realizar esta tarea.

VI. El gen RCAN1

Estudios previos indican que muchos genes relacionados al SD afectan funciones neuronales en células trisómicas, dentro de los cuales se encuentran los ya mencionados genes *App* (Opazo y col., 2006), *SMIT-1* (Huang y col. 2000), *GIRk2* (Lyle y col. 2004), *SOD1* (Epstein y col. 1987; Lyle y col. 2004). Por otra parte, dos genes: *RCAN1*(ó *DSCR1*) y *Dyrk1A*, ambos asociados a neuropatologías y alteraciones del desarrollo, han sido mapeados en la región crítica del autosoma 21 humano, asociados al SD (Arron y col. 2006) (figura 3.), y por ello han sido objeto de gran atención en los últimos años.

El gen *RCAN1* humano ha sido mapeado específicamente en la región 21q22.12 (Hattori y col. 2000). Este gen se encuentra altamente expresado en el cerebro, corazón y músculo esquelético (Fuentes y col. 1995). Se ha descrito la sobre-expresión de *RCAN1* en la línea CTb (Arriagada y col. 2009). La proteína *RCAN1* contiene dos dominios de unión a SH3 ricos en prolina (Fuentes y col. 1995), normalmente conocido como PRD, por su sigla en inglés *proline-rich domains*, uno de los cuales define a la familia de la proteína, la caja ISPPXSPP. La porción carboxilo terminal (aminoácidos 115-197) es responsable de la unión a Calcineurina (CaN) (Fuentes y col. 1995). CaN es una fosfatasa serina-treonina regulada por Ca^{2+} /calmodulina formada por una subunidad catalítica, Calcineurina A, y la subunidad reguladora, Calcineurina B , (Rusnak y Mertz, 2000).

La unión de RCAN1 a CaN resulta en la inhibición de esta última (Gorlach y col., 2000). Es por esto que RCAN1 se conoce también como Calcipresina 1 (Fuentes y col., 2000, Gorlach y col., 2000, Rothermel y col., 2000).

Se ha descrito que CaN tiene roles importantes en aprendizaje y memoria (Winder y col. 1998; Mansuy y col. 1998; Crabtree, 2001). En efecto, CaN posee varios sustratos conocidos (Harris y col., 2005), tales como el factor de transcripción NFATc (Harris y col., 2005, Gallo y col., 2006), canales de calcio tipo L (Armstrong, 1989, Oliveria y col. 2007), el canal de potasio Kv2.1 activado por voltaje (Mohapatra y col. 2007), y receptor de NMDA (Lieberman y col. 1994).

Las corrientes de calcio a través de los canales selectivos dependientes de voltaje (I_{Ca}) juegan un rol esencial en muchos procesos celulares en células excitables, principalmente en excitabilidad celular, plasticidad sináptica y expresión génica (Ghosh y Greenberg, 1995, revisado por Berridge y col., 2003).

Los canales iónicos están regulados dinámicamente por vías de transducción de señales, siendo la fosforilación uno de ellos (Levitan, 1994). Específicamente en los canales de calcio activados por voltaje, la desfosforilación está regulada por CaN, la cual provoca una disminución en las corrientes de calcio (Armstrong, 1989; Lukyanetz y col. 1998; Burley y Sihra 2000). Por lo tanto, en la regulación dinámica de estos canales, estaría involucrado RCAN1 mediante

la inhibición de CaN (Genescà y col. 2003). Ello lleva a pensar que en una condición que sobre-expresa *RCAN1* (Ts16-SD), la actividad de estos canales podría verse afectada, específicamente, aumentando las corrientes de Ca^{2+} (figura 4).

Modelo explicativo del rol de CaN sobre los canales de calcio y la participación de RCAN1

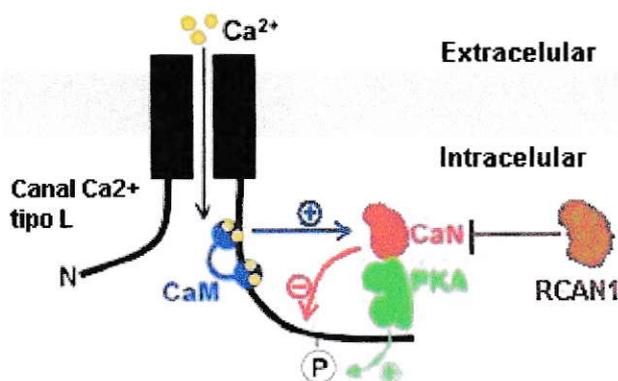


Figura 4. Esquema representativo del efecto de la inhibición de Calcineurina (CaN) por RCAN1 sobre la actividad de los canales de calcio tipo L. Si bien la entrada de calcio activa a Calmodulina (CaM) y esta a su vez a CaN, la inhibición de esta última produciría un aumento en los estados fosforilados de los canales, mediante PKA, lo que resultaría en un incremento en la conductancia de los canales. Más detalles en el texto. (Modificado de Oliveria y col. 2007)

Mediante la técnica del *knockdown* aplicada a la línea CTb, en este trabajo se buscó elucidar el rol que juega específicamente RCAN1 en la regulación de las corrientes de calcio a través de los canales activados por voltaje. Todo esto, en el contexto de la sobre-expresión generalizada, manteniendo el efecto cooperativo de los genes presentes en el cromosoma 16 (figura 5).

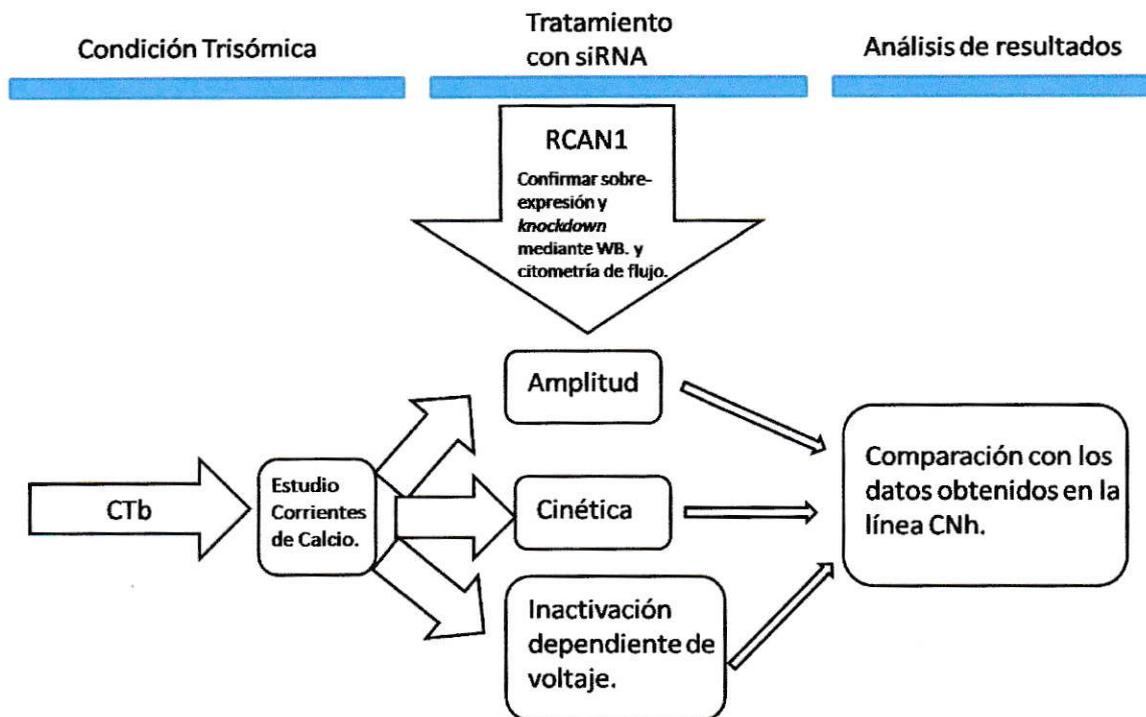


Figura 5. Diagrama de flujo de la realización de la presente tesis. Primero se determinó, mediante la técnica de Patch Clamp, las alteraciones en las corrientes de calcio activadas por voltaje (I_{Ca}) en células CTb. Posteriormente se realizó el *knockdown* de RCAN1 (siRNA) para normalizar su expresión, corroborándose mediante western blot (WB) y citometría de flujo. Consecutivamente, se realizaron los estudios de las I_{Ca} en las células CTb transfectadas. Todos estos resultados fueron comparados con aquellos obtenidos en las células CNh.

HIPÓTESIS

Las células CTb presentan un aumento en la densidad de las corrientes de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje, comparadas con la línea celular diploide CNh. Éstas serán revertidas total o parcialmente mediante el *knockdown* de *RCAN1*, logrado mediante la incorporación de secuencias específicas de RNA interferente (siRNA) para este gen.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES.

- 1.- Evaluar las características de las corrientes de calcio en las líneas celulares diploides (CNh) y trisómicas (CTb)
- 2.- Normalizar la expresión de *RCAN1* en las células CTb.
- 3.- Estudiar el efecto de la normalización de *RCAN1* en las células de corteza derivadas de fetos de ratón trisómico Ts16 (CTb) en las Corrientes de Ca^{2+} .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. - Evaluar la cinética, amplitud y la inactivación dependiente de potencial de las corrientes de Ca^{2+} mediadas por canales dependientes de voltaje, usando la técnica del Patch clamp, en las líneas CTb y CNh.
- 2.- Realizar el *knockdown* de *RCAN1* en células CTb por transfección con secuencias específicas de siRNA.

- Evaluar los niveles de proteína *RCAN1* mediante técnicas de inmunoblot, específicamente Western blot.

- Ejecutar ensayos de tiempo necesarios de transfección para lograr resultados comparables entre las líneas trisómicas y normales.

3.- Comparar cinética, amplitud e inactivación dependiente de voltaje de las corrientes de Ca^{2+} mediadas por canales dependientes de voltaje, en las líneas CTb transfectadas y CNh.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos experimentales.

Se emplearon líneas celulares neuronales derivadas de ratones normales y Ts16, las cuales fueron establecidas a partir de la corteza cerebral (Normal: CNh, Trisómico : CTb). Estos modelos celulares retienen marcadores neuronales, expresan aumentos de Ca^{2+} intracelular en respuesta a estimulación con neurotransmisores, y poseen función colinérgica (Cárdenas y col. 1999, Opazo y col. 2006, Rojas y col. 2008).

2. Cultivo celular.

Las células fueron cultivadas en placas de Petri, usando un medio de cultivo compuesto de: DMEM/HAMF12 (Invitrogen, Grand Island, NY) el cual se suplementa con 6gr/l de Glucosa, 1gr/l de Bicarbonato, 10%v/v de Suero Bovino Adulto y 2,5% de Suero Bovino Fetal. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora, a una temperatura de 37°C, 100% de humedad y en una atmósfera de 5% de CO_2 . La renovación de los medios de cultivo se realizó dos veces por semana.

3. Expresión génica.

a) *Lisis celular, extracción de proteínas*

Se lavaron las placas 2 veces con 0.5 ml solución D tampón fosfato salino pH 7.4 (8gr. NaCl, 0.4gr. KCl, 0.02gr. Na₂HPO₄, 0.03gr. KH₂PO₄ para 1000ml).

Se agregaron 400-500µl de Tripsina 0.2% e incubaron entre 3-5 minutos a 37°C. Luego se neutralizaron con 500µl medio DMEM/F12 (1:1), finalmente las células se traspasaron a un microtubo eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, las células se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante.

Se lavaron las células con 500 µl de solución D re-suspendiendo el precipitado, luego se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C, eliminando el sobrenadante.

Paralelamente, se preparó buffer de lisis LDB (Low Detergent Buffer) 1X (20 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 0,5% de Triton X-100).

Se agregó al pellet 200 µl de buffer LDB 1X con inhibidores de proteasas (FENIL METIL SULFONIL FLUORURO-PMSF-, leupeptina). Se incubaron en hielo por 5 minutos, luego se sonicaron las muestras por 30 segundos, finalmente se centrifugaron a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. Del sobrenadante se extrajeron alícuotas de 10 µl para la medición de la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford a 595 nm. Al resto del sobrenadante, se le agregó tampón de carga (Glicerol 20%, beta-Mercaptoetanol 10%, SDS 6%, Tris-HCl 250 mM y 1,5 mgr/ml de azul de

bromofenol) y para denaturar las proteínas se hirvió la muestra por 5 minutos a 100°C. Finalmente el sobrenadante con el tampón de carga se almacenaron a -20°C.

b) Cuantificación de proteína

Los niveles de proteína se cuantificaron mediante inmunodetección, utilizándose dos técnicas: Western blot, y citometría de flujo

-Western blot:

20 µgr de proteína fueron sometidos a electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 10% (Gel separador: 1,7 ml de poliacrilamida 30%, 2 ml de agua destilada, 1,3 ml de Tris-HCl 1,5 M, 0,05 ml de SDS 10%, 0,002 ml de Temed y 0,05 ml de PSA 10%. Gel concentrador: 0,33 ml de poliacrilamida 30%, 1,4 ml de agua destilada, 0,25 ml de Tris-base 1,5M, 0,01 ml de SDS 10%, 0,001 ml de Temed, 0,01 m de PSA10%) a 350mA 80mV por 2 hrs, para ser transferidas a membranas de nitrocelulosa, en una cámara de transferencia a 60mV y 400mA por 1,5 hrs. Para evitar la unión no específica la membrana, se llevó a cabo bloqueo con albúmina de suero bovino al 5% en PBS-Tween 20 al 1% por 2 horas a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para RCAN1 (dilución 1:2000) (ABCAM, Cambridge, MA). Luego de la incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 1% y luego se incubó la membrana con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (dilución 1:5000) (ABCAM, Cambridge, MA). La detección se realizó mediante un kit de

quimioluminiscencia (Pierce, Rockford, IL EEUU). Las membranas se fotografiaron y la densidad de las bandas se midió con el programa ImageJ (software de uso libre desarrollado por Wayne Rasband [wayne@codon.nih.gov], Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA.) La intensidad de la escala de grises obtenida por medio de este Software se normaliza con la intensidad obtenida de las bandas correspondientes a la proteína β -Tubulina (control de carga), la cual es también detectada por la técnica de Western Blot (Anti-Mouse β -Tubulina (1:2000; ABCAM, Cambridge, MA). Esto permite normalizar la cantidad de proteína RCAN1 presente en las líneas celulares CTb (trisómicas), CNh y CTb transfectadas con el siRNA específico para RCAN1 a las 24 y 48 horas post transfección.

-Tinción intracelular para Citometría de Flujo:

Las células sembradas en placas se tripsinizaron y se resuspendieron en tubos eppendorf. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min para eliminar la tripsina. Una vez obtenido el pellet de células, éstas se resuspendieron en formaldehído al 1% durante 30 min a 4°C para fijarlas. Se lavó el exceso de formaldehído, para luego permeabilizar las células con metanol absoluto, previamente enfriado a -20°C, y se incubaron durante 10 min a -20°C. Se removió el exceso de metanol lavando las células, para luego bloquear con albúmina de suero bovino al 1% durante 30 min a temperatura ambiente. Se incubaron las células con el anticuerpo primario específico para

RCAN1 (1:2000; ABCAM, Cambridge, MA) por 30 min a 37°C. Luego de lavar las células para eliminar el exceso de anticuerpo, se incubaron con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:5000 (ABCAAM, Cambridge, MA) por 30 min a temperatura ambiente. Una vez más se lavaron las células para eliminar el exceso de anticuerpo. Finalmente, se resuspendieron las células en 1% de formaldehído para su posterior lectura en el Citómetro de Flujo, teniendo como mínimo una lectura de 5000 eventos.

4. Interferencia de la expresión génica.

Se sembraron las células CTb en placas de 6 o 12 pocillos. Se utilizaron secuencias certificadas de siRNA (Santa Cruz Biotech., Inc, Santa Cruz, CA. EEUU), específicamente diseñadas contra RCAN1 (sc-45481) y secuencias controles "*scrambled*" (Scr- sc-37007) las cuales no producen ningún efecto en la expresión de dicho gen, al no activar RISC. 2,5 µgr se pre-incubaron con liposomas catiónicos (LipofectAmine, Life Sciences Technologies, Inc. CA. EEUU) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, para la incorporación a las células, se incubaron los cultivos con esta mezcla en medio sin suero y sin antibióticos durante 5 horas a 37°C y 5%CO₂. Posteriormente, se agregó el medio completo y se cultivó por 24 y 48 horas a 37°C y 5%CO₂. Las transfecciones con la secuencia control (Scr) sólo se realizaron durante 24 horas. Para el control de especificidad, se incubaron las células CTb sólo con Lipofectamina, como vehículo vacío, por 5 horas para el siguiente día registrar.

Para determinar la eficiencia de transfección, se sembraron las células en las mismas condiciones que para los registros electrofisiológicos, y se realizó el mismo protocolo de transfección, sólo que esta vez se incubaron con una secuencia control “scrambled” conjugada con FITC (Santa cruz Biotech., Inc). El conteo se realizó por triplicado tomando en cuenta 10 campos al azar por cada ensayo.

5. Registros de Corrientes de Ca²⁺

Para registro de corrientes, se utilizó la técnica de Patch Clamp en la configuración célula entera (Hamill y col. 1981). Las células fueron visualizadas en un microscopio invertido equipado con óptica de contraste de fase Nikon (Nikon Diaphot, Nikon Corp., Japón) Se utilizaron capilares de vidrio Bluetip (Monoject Sci., St Louis, MO, EE.UU.), los cuales fueron estirados utilizando un puller Sachs-Sutter (Sutter Instruments, modelo PC-81, San Rafael, CA, EE.UU) hasta alcanzar una resistencia entre 2 – 4 MΩ. Las pipetas se llenaron con una solución (tabla 1), dejando solo calcio como el ion permeante. Previo a registrar, el medio de cultivo fue cambiado por una solución de baño (Tabla 1; Caviedes y col. 2006).

Soluciones utilizadas para registros de Corrientes de Calcio.

Reactivos	Sln. Baño	Sln. Pipeta
TEA-Cl	150mM	-----
CaCl₂	2,5mM	0,45mM
MgCl₂	1mM	-----
HEPES	10mM	10mM
Glucosa	10mM	10mM
CsCl	-----	140mM
EGTA-KOH	-----	5mM

Tabla 1. Los valores representan concentración. TEA= tetraetilamonio; HEPES= ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico EGTA= ácido etilen glicol-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetracético.

De la población de células visualizadas al microscopio, se seleccionaron células aisladas para evitar acoplamiento eléctrico. El electrodo se aproximó a la célula utilizando un micromanipulador motorizado Sutter (Sutter Instruments, modelo MP-285, Novato, CA, EE.UU.), estableciéndose contacto entre la pipeta y la membrana celular de alta resistencia (2 - 10 GΩ) aplicando un leve pulso de presión negativa en la pipeta. Tras cancelar las transientes capacitivas rápidas mediante los circuitos del amplificador EPC-7 (HEKA Elektronik, Alemania), se estableció la configuración en célula entera mediante un pulso de succión en la pipeta, con el fin de romper la membrana celular bajo la punta del electrodo. Una vez establecida esta configuración, se permitió el intercambio iónico entre la pipeta y el interior de la célula por períodos de 5 a 10 minutos. Todos los registros fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (20-25°C).

Control de Voltaje: Los pulsos de voltaje fueron generados por una tarjeta convertidora análogo-digital (Digidata 1200, Molecular Devices Inc., EE.UU.), instalada en un PC compatible, controlados mediante el programa PClamp8 (Molecular Devices Inc., EE.UU.). Las células fueron mantenidas a -80mV y se presentaron pulsos de despolarización de 70 ms. de duración en incrementos de 10 mV, a una frecuencia de 0.1Hz. Se fijó una línea base a partir de un período de 5 ms antes de la aplicación del pulso de prueba. Debido a que no se usó el circuito de compensación para corregir el error debido a la resistencia en serie, se tomó ésta arbitrariamente como dos veces el valor de resistencia del electrodo. El error de voltaje se calculó multiplicando este valor por la amplitud de corriente, y se descartó todo registro con error superior a 3 mV (Sakmann y Neher, 1983). Las corrientes de fuga y capacitivas fueron compensadas usando la substracción on-line con el protocolo convencional P/4, el cual consiste en una serie de 4 pulsos escalados del pulso de activación. No se realizó compensación de las resistencias en serie para evitar oscilaciones que pudieran dañar la membrana.

La dependencia de voltaje de la inactivación se examinó usando protocolos de pre-pulsos convencionales. Un pre-pulso condicionante de 1 s de duración que llevó la membrana a potenciales entre -140 y 0 mV en pasos de 10 mV. El pulso de prueba llevó el potencial de pre-pulso a +20 mV por 100 ms, luego de 2 ms a -80mV. Los registros se ajustaron a la función Boltzmann a 200 iteraciones:

$$y = 1/(1 + \exp((V_m - V_{0.5})/k)),$$

dónde V_m es el potencial pre-pulso, $V_{0.5}$ es el potencial medio entre el máximo y el mínimo de corriente, y k es la pendiente de la curva. Los niveles de correlación fueron considerados aceptables para valores iguales o mayores a 0,95.

La cinética temporal de la activación e inactivación de las corrientes se estudió mediante ajuste de las respuestas de corriente al modelo clásico " m^3h " de Hodgkin y Huxley (Hodgkin y Huxley, 1952),

$$I = [m^3h]I_{max}$$

donde,

$$m = 1 - \exp(-t/\tau_a), \text{ y}$$

$$h = \exp(-t/\tau_b)$$

La función " m " representa la cinética de activación de las corrientes (con una constante de tiempo τ_a), mientras que la inactivación está representada por la función " h " (con una constante de tiempo τ_b). El ajuste se realizó utilizando el método de la suma de cuadrados mínimos, provisto por el programa comercial Pclamp 8.2 (Molecular Devices Inc., EE.UU.) Los valores con un coeficiente de correlación superior a 0.95 fueron utilizados, y los datos bajo éste fueron descartados y nombrados como no convergentes (n.c.)

Control de Corriente: Las propiedades pasivas se evaluaron en la configuración de clamp de corriente, en respuesta a pulsos hiperpolarizantes de 0,1 y 0,05 nA de amplitud, y de 200 ms de duración. La resistencia de la membrana se calculó dividiendo la amplitud del potencial generado por la amplitud del pulso de corriente aplicado; Se obtuvo la constante de tiempo (τ), la cual corresponde a 0.632 de la amplitud máxima de voltaje. La capacitancia se calculó como $C = \tau/R$, para la estimación de la densidad de corriente iónica.

Movimiento total de cargas: De los registros de corrientes de calcio, se tomaron los trazados de las condiciones pertinentes al potencial +20mV, se integró el área bajo la curva y ese resultado se dividió por el valor de capacitancia de la célula.

6. Adición de drogas:

Tratamiento con FK-506.

Para determinar si la regulación de las corrientes de calcio es dependiente de CaN, se utilizó FK-506 (Tacrolimus, Astellas Ireland Co., Irlanda, generosamente donado por Investpharma), el cual es un inhibidor farmacológico específico de la CaN (Lukyanetz y col. 1998; Norris y col. 2002; revisado por Lukyanet E.A. 1997; Burley y Sihra, 2000)

Las células CNh se sembraron en cubre objetos y se colocaron en placas de 12 pocillos; se incubaron con 50 μ M de FK-506 en 1 ml de medio DMEM/F12 sin

suero y sin antibióticos, durante 3-4 horas, para posteriormente cambiar el medio por solución de Baño y proceder a registrar (Norris y col. 2002).

Nifedipina (SIGMA, San Luis, CA, EE.UU.), un conocido bloqueador de canales de calcio tipo L, se agregó a la solución Baño a una concentración de 10 μ M.

7. Estadística.

Para análisis estadístico, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Seguido por la prueba de *t* de Student, considerándose significativo para valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. Características de las células.

Durante el desarrollo de esta tesis, no se apreciaron cambios aparentes en la morfología de las células. En las condiciones de registro electrofisiológico, las células presentaban un núcleo definido, presencia de pequeñas inclusiones que al parecer en la condición trisómica eran de mayor número. Ambos tipos celulares presentaban proyecciones, aunque muchas veces eran de corta longitud. Sólo cuando existía un contacto con otras células, estas proyecciones se apreciaban de mayor longitud.

2- Corrientes de calcio dependientes de voltaje en CNh y CTb.

El primer objetivo de esta tesis fue evaluar las corrientes de calcio a través de los canales de calcio dependiente de voltaje (I_{Ca}) de toda la membrana en células individuales (*whole-cell voltage-dependent calcium currents*), en ambas líneas celulares derivadas de corteza: CNh y CTb. Para esto, se estudiaron las I_{Ca} mediante la técnica del Patch-clamp en la configuración de célula entera.

2.1 Propiedades pasivas de membrana.

Al estudiar en configuración de clamp de corriente, no se detectó diferencia en ninguna de las propiedades eléctricas pasivas de las células. La tabla 2 presenta los valores obtenidos de capacitancia y resistencia para ambos tipos celulares .

PROPIEDADES PASIVAS DE MEMBRANA EN CNh Y CTb

Parámetro	CNh	n	CTb	n
Capacitancia (pF)	33.9 ± 9.2	9	30.6 ± 10.3	14
Resistencia (MΩ)	56.2 ± 34.04	11	47.9 ± 37.3	9

Tabla 2. Propiedades pasivas de membrana de neuronas CNh y CTb en modo Current Clamp, en respuesta a pulsos hiperpolarizantes de 0.1 y 0.05 nA, 200 ms de duración. La resistencia de membrana fue estimada como la amplitud máxima de voltaje dividida por la amplitud de corriente aplicada. La constante de tiempo (τ) se estimó como el punto correspondiente a 0,632 de la amplitud máxima de voltaje. La capacitancia celular se calculó como $C = \tau / R$. Los valores son Promedio \pm D.E.

2.2. Corrientes de Calcio activadas por Voltaje.

Al ser estimuladas a partir de un $V_{\text{mantención}}$ de -80mV, las células trisómicas exhibieron un marcado aumento en el pico de la densidad de I_{Ca} comparadas con la línea euploide, como se aprecia en la figura 6, dónde se presentan registros típicos de cada línea neuronal, de valores de capacitancia comparables.

Imágenes representativas de los registros de I_{Ca} en CNh y CTb

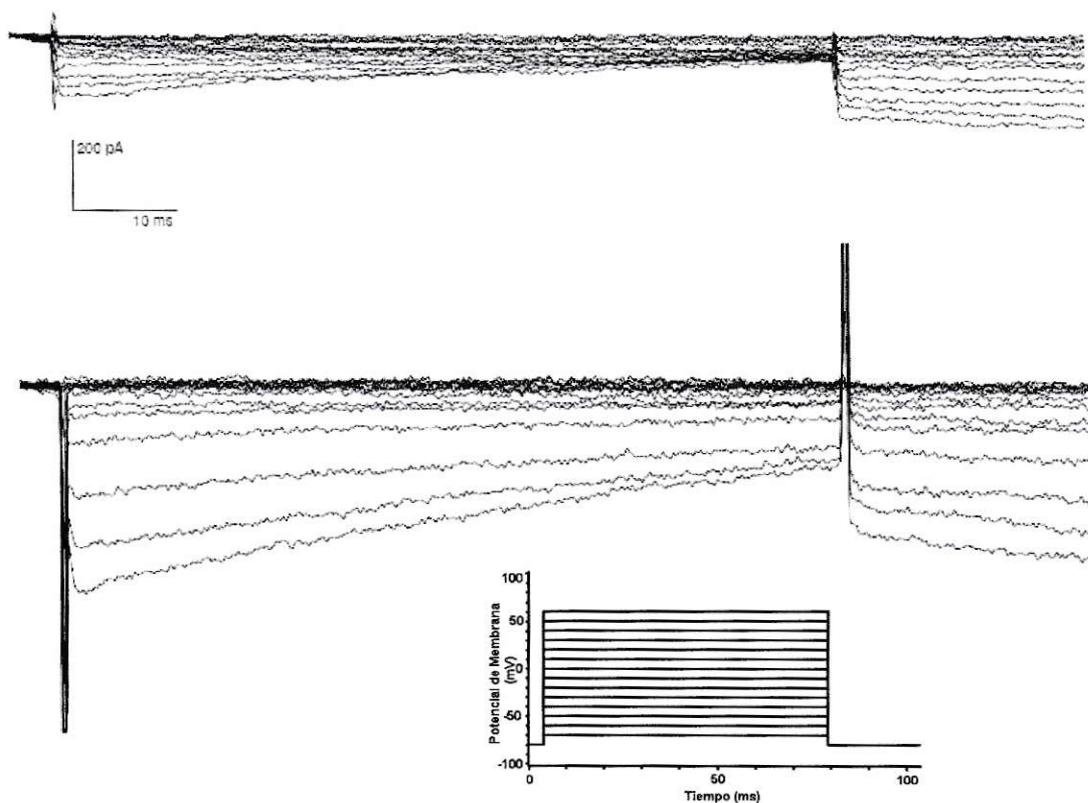


Figura 6. Imágenes representativas de respuestas de Corrientes de Calcio en células CNh (53pF) y CTb (45pF) registradas en modo control de voltaje (Voltage-clamp) ($V_{\text{mantención}} = -80\text{mV}$) en pulsos despolarizantes de 10 mV y 70 ms. de duración, presentados a 0,1 Hz. Recuadro, protocolo de pulsos despolarizantes (ver materiales y métodos para mayor detalle)

En las condiciones de obtención de cada registro, no se apreciaron problemas de *clamp* espacial ni errores de voltaje superiores a 3 mV. La activación de las corrientes ocurre en ambas líneas a aproximadamente -40mV ($V_{\text{mantención}} = -80\text{ mV}$), pero, como indica la figura 7, no se notó una inversión de la corriente pero

sí un aumento de 2.4 veces (CNh= -6.3 ± 0.7 pA/pF, n= 18; CTb= -16.4 ± 2.4 pA/pF; $p < 0.01$, n=13) en el pico máximo de corriente a potencial de +60 mV.

Curva I-V de células CNh y CTb.

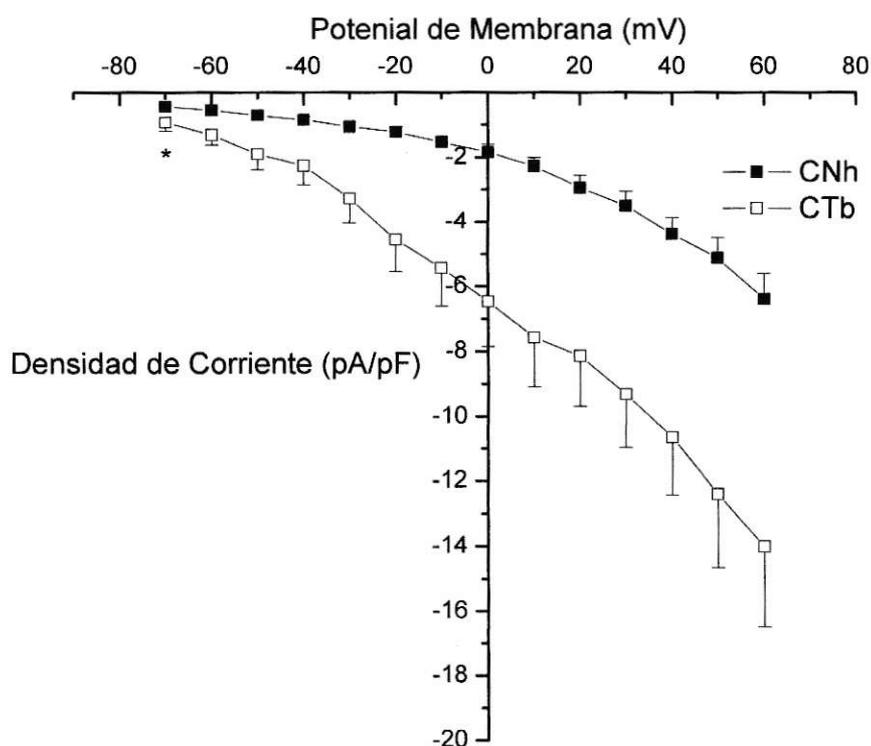


Figura 7. Los valores (Promedio \pm EE) son significativamente diferentes entre ambas condiciones para $p < 0.05$, excepto * (no significativo) (CNh, n= 18; CTb, n= 13). Notar el incremento substancial de la densidad de corriente en la condición trisómica.

Esta corriente fue mayormente conducida por canales de calcio tipo L, debido a que la adición de Nifedipina resultó en una reducción de la corriente total de $98 \pm 1,3\%$ (n=3) (figura 8).

Efecto de la adición de Nifedipina (10 μ M) en las corrientes de calcio

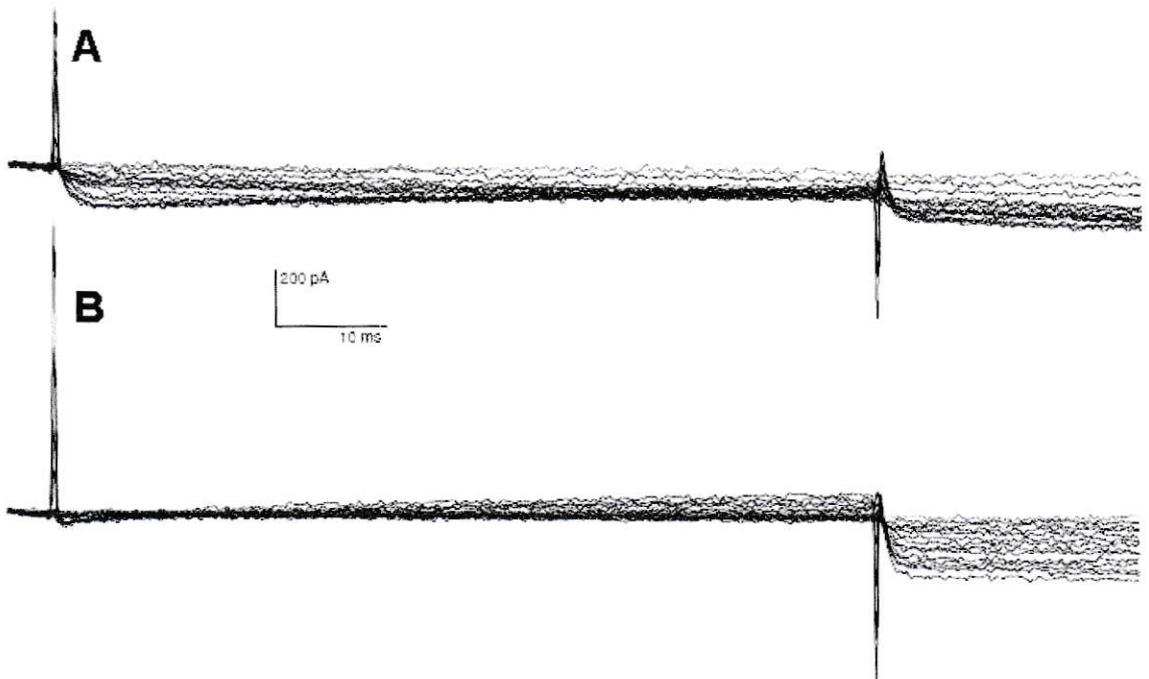


Figura 8. A, registro de célula entera de una célula CNh ($V_{\text{mantención}} = -80\text{mV}$). B, respuesta de corrientes luego de la aplicación de Nifedipina. Notar la marcada reducción en la corriente de calcio.

La presencia de corrientes de cola de inactivación lenta fue evidente en los registros en ambos tipos celulares. Para determinar la contribución del ión Cl^- en estas corrientes, se decidió realizar experimentos donde el TEA-Cl externo fue reemplazado por TEA-Acetato (a la misma concentración, 150 mM), así introduciendo un anión no permeante en el compartimiento extracelular. La figura 9A muestra registros en células CTb. Las células que fueron mantenidas con TEA-Acetato muestran una marcada reducción en el movimiento total de carga asociado a la corriente de cola (~60%) y con una aparente disminución

en la cinética temporal de inactivación en el pulso activo (figura 9B). Estos datos sugieren que las corrientes de cola de las células registradas son mayormente transportada por Cl^- . Sin embargo, el pico inicial en la corriente de entrada durante los pulsos despolarizantes no se ve afectado, sugiriendo que la posible contaminación por Cl^- es improbable.

Rol del anión Cl^- en las corrientes de cola

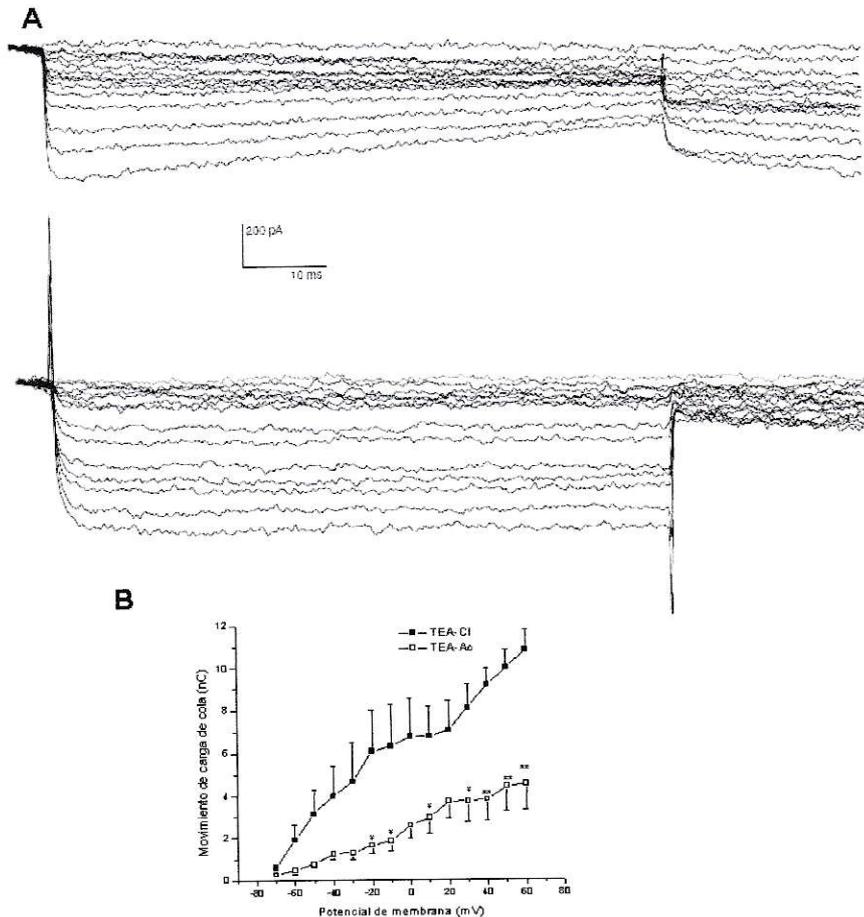


Figura 9. A, registros representativos de células CTb. La figura superior muestra las corrientes obtenidas en presencia de TEA-Cl. Notar la disminución

de las corrientes de cola cuando se reemplaza por TEA-Acetato (figura inferior). B, relación carga/voltaje de las corrientes de cola registrada en células CTb. Los valores son Promedio \pm EE. * $p < 0,05$; ** $p > 0,01$. $n=6$ para ambas condiciones.

Debido a que no se alcanzó una inversión de la corriente en nuestros registros, no fue posible evaluar la activación dependiente de voltaje en CNh y CTb.

Sin embargo, la curva de inactivación dependiente de voltaje exhibe un desplazamiento hacia potenciales más despolarizados en CTb, comparados con CNh. En la figura 10 se muestra claramente un cambio de 15 mV hacia potenciales más despolarizados en la curva correspondiente a línea CTb, comparada ésta con aquella de CNh. Esto sugiere que un mayor número de canales de Ca^{2+} están disponibles para activarse a potenciales negativos (a -130, -110, -90 y -80mV), comparados con la línea control. Esto último es especialmente relevante a nivel del pre-pulso -80mV, donde se evidencia un aumento de 3,2 veces en la corriente en CTb.

Inactivación dependiente de voltaje en células CNh y CTb.

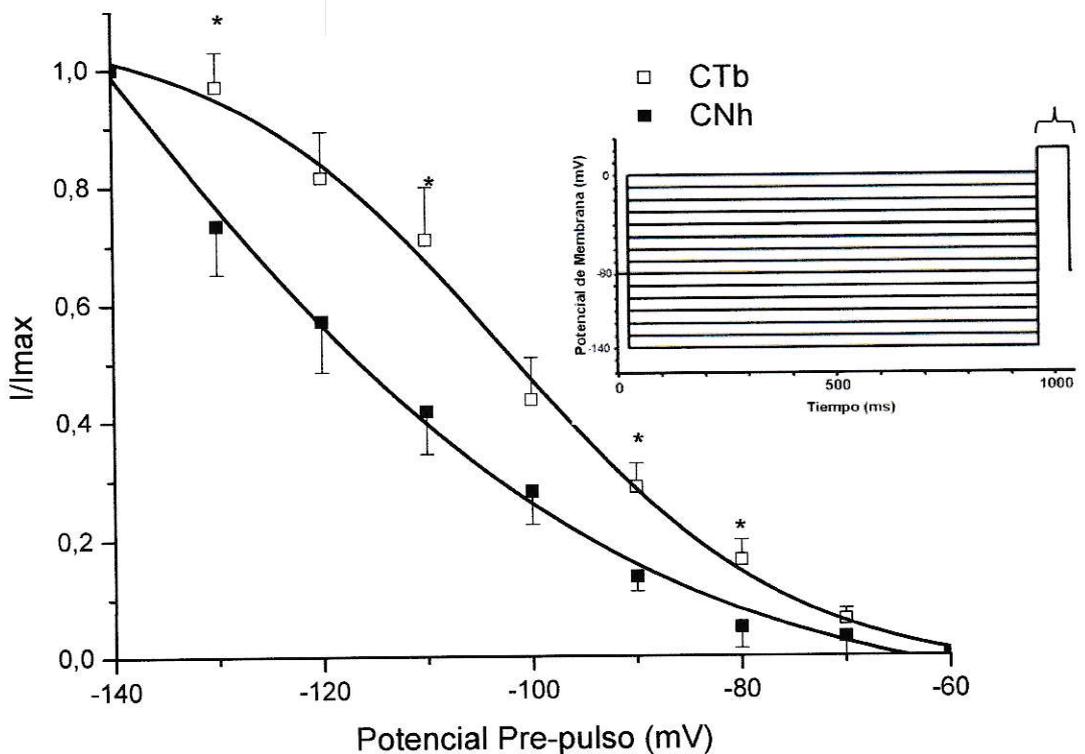


Figura 10. Un pulso condicionante de 1 s mantuvo la membrana a potenciales desde -140 a 0 mV (pulsos de 10 mV), seguido por un potencial de mantención de -80mV y un pulso de prueba que llevó el potencial de membrana a +20mV (ver recuadro. Paréntesis indica pulso de prueba). Los valores son normalizados, en cada línea celular, al máximo de corriente dado el potencial de adquisición de +20mV. * indica $p < 0,05$. Los puntos son Promedio \pm EE. La función Boltzmann ajusta a un valor de $p < 0,01$ en los registros de ambas líneas celulares (CNh, $n = 5$; CTb, $n = 5$).

Para relacionar estos hallazgos con aquellos resultados obtenidos en los protocolos de activación, se integró la superficie bajo la curva de los registros

de corriente tomados de estos protocolos a niveles de +20mV, desde un $V_{\text{mantención}}$ de -80 mV. Este procedimiento reveló el movimiento total de cargas a través de la membrana, el cual, a dicho potencial, resultó en un aumento en 2,6 veces en el movimiento de carga en CTb comparado con CNh (figura 11).

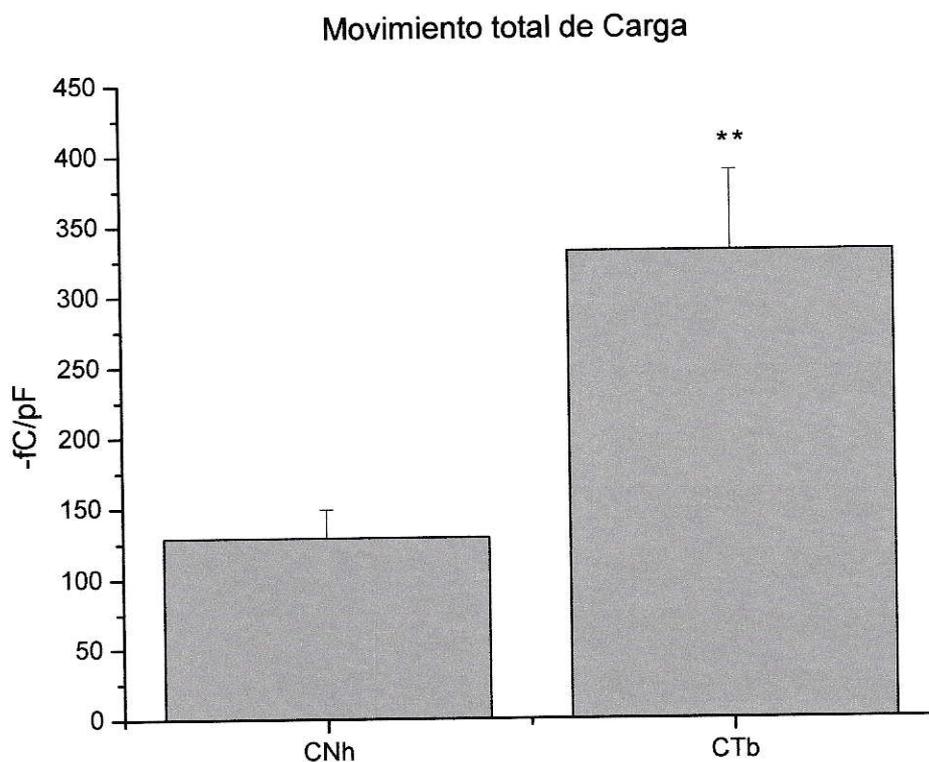


Figura 11. Movimiento total de cargas en las células CNh y CTb, normalizado por capacitancia, desde un potencial de mantención de -80mV hasta +20mV. La carga total fue obtenida integrando el área bajo la curva de las corrientes registradas. CNh n=10; CTb n= 11. ** $p < 0,01$. Los valores en el gráfico son Promedio \pm E.E.

Posteriormente, para evaluar la contribución de las propiedades de “gating” intrínsecas, se estudiaron las cinéticas de activación e inactivación

dependientes del tiempo, ajustando los trazados de corrientes al modelo “m³h” de Hodgkin y Huxley. De acuerdo a esto, no se encontraron diferencias significativas en ambas cinéticas para CNh y CTb, según se desprende del análisis de las constantes de tiempos presentado en la Tabla 3. Estos resultados sugieren que las cinéticas dependientes del tiempo no juegan un rol en la conductancia a Ca²⁺ alterada en las células CTb.

Valores de constante de tiempo para corrientes de Ca²⁺

Vm	τ (ms)							
	Activación				Inactivación			
	CNh	n	CTb	n	CNh	n	CTb	n
-20	0.35 ± 0.16	7	0.46 ± 0.37	8	n/c		n/c	
-10	0.43 ± 0.2	7	0.44 ± 0.37	8	n/c		n/c	
0	0.34 ± 0.22	7	0.42 ± 0.43	8	27.21 ± 21.5	3	55.3 ± 55.5	4
+10	0.35 ± 0.23	7	0.35 ± 0.31	8	37.5 ± 36.5	4	64.1 ± 76.2	7
+20	0.36 ± 0.23	9	0.32 ± 0.21	10	101 ± 58	7	56.6 ± 22.4	7
+30	0.44 ± 0.27	9	0.31 ± 0.2	11	16.3 ± 89.5	7	79.71 ± 83	7
+40	0.46 ± 0.3	9	0.33 ± 0.22	11	62.7 ± 14.3	8	100.5 ± 103.3	8
+50	0.42 ± 0.3	9	0.33 ± 0.31	10	65.09 ± 15.7	8	72.2 ± 22.9	8
+60	0.38 ± 0.3	8	0.33 ± 0.31	10	69.4 ± 22.1	7	69 ± 32.2	8

Tabla 3. Valores derivados de ajustes exponenciales de un modelo de m³h de Hodgkin y Huxley. Para la activación, la región ajustada se tomó inmediatamente después de la transiente capacitiva hasta el peak de la corriente. Para la inactivación, la región ajustada comenzó desde el peak de la corriente terminando al punto correspondiente al 80% del valor de steady-state de la corriente. (n/c no converge; coeficiente de correlación >0.95). Los valores son Promedio ± DS.

Por lo tanto estos resultados sugieren que:

- 1) las I_{Ca} registradas en las neuronas CTb alcanzan niveles de densidad de corriente aproximadamente 2.5 veces mayor que aquellas registradas en las

neuronas CNh, y que estas corrientes son mediadas por canales de calcio tipo L.

2) existe un desplazamiento de la curva de inactivación en la condición trisómica hacia potenciales más despolarizados (aproximadamente 15mV), lo que indicaría un cambio en la sensibilidad de los canales, y que a niveles de potencial comparables, las células CTb presentarían mayor probabilidad de conducir

3) las cinéticas temporales, tanto de activación como inactivación, no tienen un rol preponderante en las diferencias observadas en las corrientes de ambas líneas celulares.

Estos resultados se correlacionan bien con aquellos previamente encontrados en neuronas centrales cultivadas a partir de ratón Ts16 (Galdzicki y col. 1998), sugiriendo que la mayor dosis génica inherente a la condición trisómica, afecta las funciones neuronales normales, tales como los movimientos iónicos, expresamente presentado acá las I_{Ca} . Ello, además, contribuye a validar la línea CTb como un modelo estable y reproducible para el estudio de alteraciones de corrientes iónicas relacionadas con SD.

3. Expresión de RCAN1 en CNh, CTb, Y CTb transfectadas.

Para investigar el rol que juega RCAN1 en la regulación de las I_{Ca} , se evaluó su efecto mediante la interferencia específica del mRNA en el contexto de la sobre-expresión generalizada en CTb, dado el hecho que poseen una copia extra del cromosoma 16. Resultados previos de nuestro laboratorio señalan que existe una sobre-expresión de RCAN1 en las células CTb comparadas con las CNh (Arriagada y col. 2009). Basándose en esto, se realizaron transfecciones con RNA interferente específico para el mensajero de RCAN1 (“*siRNA*”), el cual disminuye la expresión de esta proteína a valores comprables a los encontrados en CNh, pero no ocurre lo mismo cuando se transfectan con una secuencia aleatoria control (“*scrambled*” no interferente; figura 12).

Expresión de la proteína RCAN1

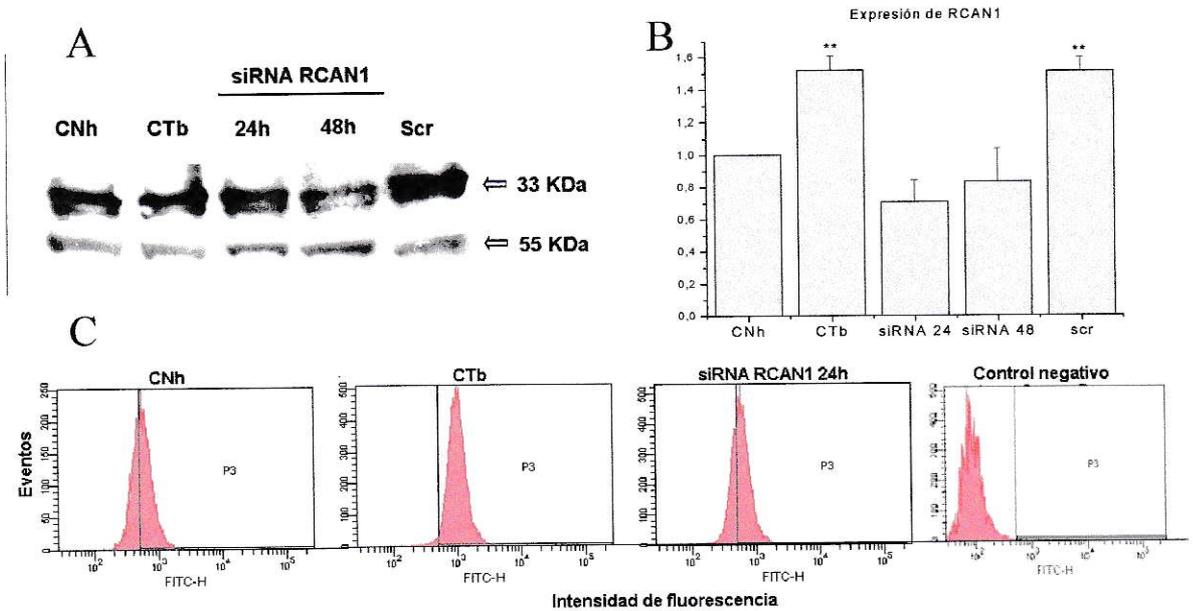


Figura 12. Expresión de la proteína RCAN1. A. Imagen representativa de Western Blot. B. Niveles de expresión de la proteína en CNh, CTb, CTb transfectadas con siRNA específico (siRNA) para RCAN1 a 24 y 48 horas post-transfección; Scr, secuencia no interferente control “scrambled”. La expresión se cuantificó en bandas de 33 KDa para RCAN1 y de 55 KDa para beta-Tubulina. Los valores en el gráfico fueron normalizados a la expresión de RCAN1 en las células CNh y representan Promedio \pm E.E. CNh, n=4; CTb n=4; siRNA24, siRNA48 y Scr n=3; ** p<0,01; * p<0,05) C. Niveles de expresión de RCAN1 mediante Citometría de Flujo. Nótese la disminución de la intensidad de fluorescencia en las células CTb transfectadas con siRNA para RCAN1 a niveles similares a los encontrados en CNh, control negativo: células sin anticuerpo primario. (Lecturas mínimas de 5000 eventos)

Para corroborar la eficiencia de transfección señalada en estudios previos en las células CTb, se transfectaron con una secuencia control (“scrambled”) conjugada con FITC, en las mismas condiciones realizadas para las muestras que se derivan a los estudios electrofisiológicos (figura 13). Estos resultados indican una eficiencia de transfección del $85\pm 3\%$, lo que está muy de acuerdo

con los reportados anteriormente en estas mismas células (Opazo y col. 2006; Rojas y col. 2008)

Eficiencia de transfección.

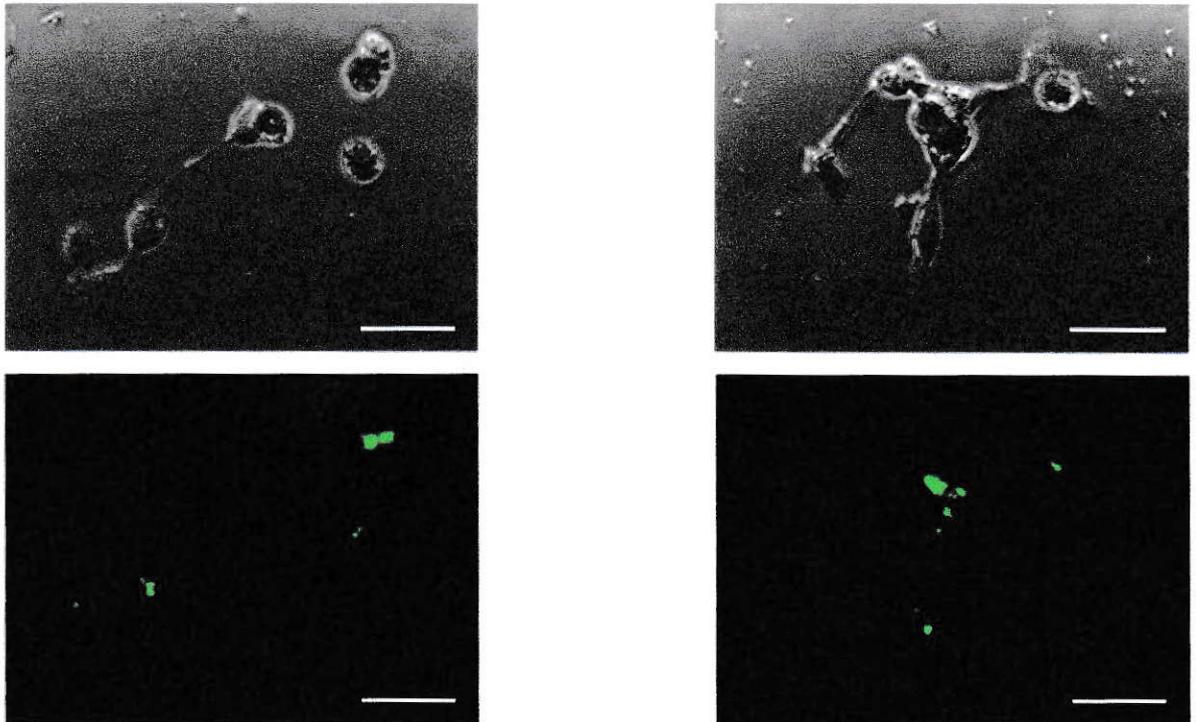


Figura 13. Muestra de dos fotografías de células de corteza trisómica murina (CTb) transfectadas con el control siRNA-FITC por 24 hrs. Izquierda y derecha, arriba: células observadas en microscopio óptico. Izquierda y derecha, abajo: imagen de inmunofluorescencia. El porcentaje de eficiencia fue de un $85 \pm 3\%$ (Promedio \pm E.E.). Barra escala $50 \mu\text{m}$.

Estos resultados indican que:

- 1) las células CTb sobre-expresan RCAN1, en comparación con las células CNh, en una proporción concordante con la esperada por dosis génica;

2) la aplicación de secuencias interferentes específicas para *RCAN1* reduce la expresión de la proteína a niveles similares a CNh. La incubación con secuencias controles "*scrambled*" no provocó una disminución en los valores de expresión de la proteína, corroborando el efecto específico de los siRNA correspondientes,

3) el efecto knockdown permanece estable entre 24 y 48 hrs, sin cambios significativos en la expresión de *RCAN1* en las células CTb transfectadas, periodo en el cual se realizaron los registros electrofisiológicos.

4. Corrientes de calcio dependiente de voltaje en CNh, CTb Y CTb transfectadas con siRNA.

Una vez determinada la ventana de tiempo y corroborada la normalización de la expresión de *RCAN1* mediante la secuencia interferente (siRNA) en CTb, el siguiente paso fue determinar el posible rol de *RCAN1* en la regulación de las I_{Ca} . Para esto se realizaron registros electrofisiológicos en las células CTb transfectadas con la secuencia interferente y la secuencia "*scrambled*".

Los valores de densidad de corriente no fueron diferentes entre los registros a las 24 y 48 horas, por lo tanto todos se graficaron como "siRNA".

Los registros indican que al transfectar con la secuencia interferente la amplitud de las corrientes se reducen alcanzando valores comparables con aquellas registradas en células CNh, como se muestran en los registros típicos

presentados en la figura 14 en células de ambos tipos con valores de capacitancias comparables.

Registros representativos para CTb transfectadas con siRNA para RCAN1 y CNh.

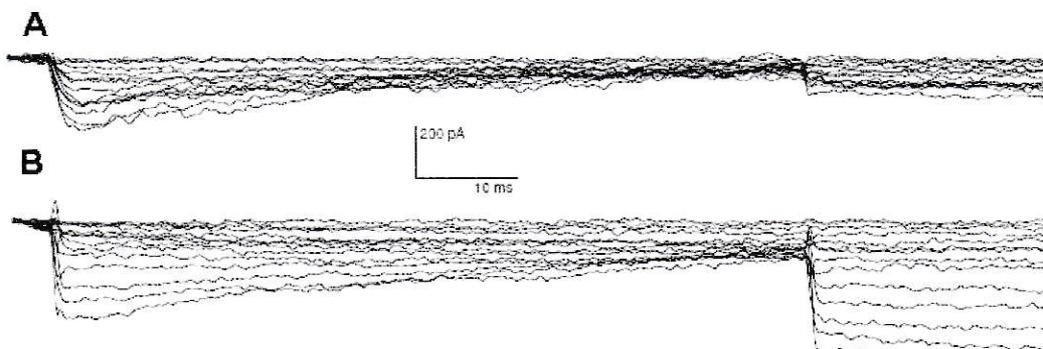


Figura 14. Imágenes representativas de los registros de corrientes de calcio en A, célula transfectada con la secuencia específica para RCAN1 (58pF); B, registro de célula CNh (53pF).

En tanto los registros de las células CTb transfectadas con la secuencia “*scrambled*” mantienen la tendencia de las CTb con vector vacío (como se muestran en la figura 15 los registros de células CTb y CTb-scr con valores de capacitancia comparables).

Registros representativos para CTb transfectadas con secuencia *scrambled* y CTb control.

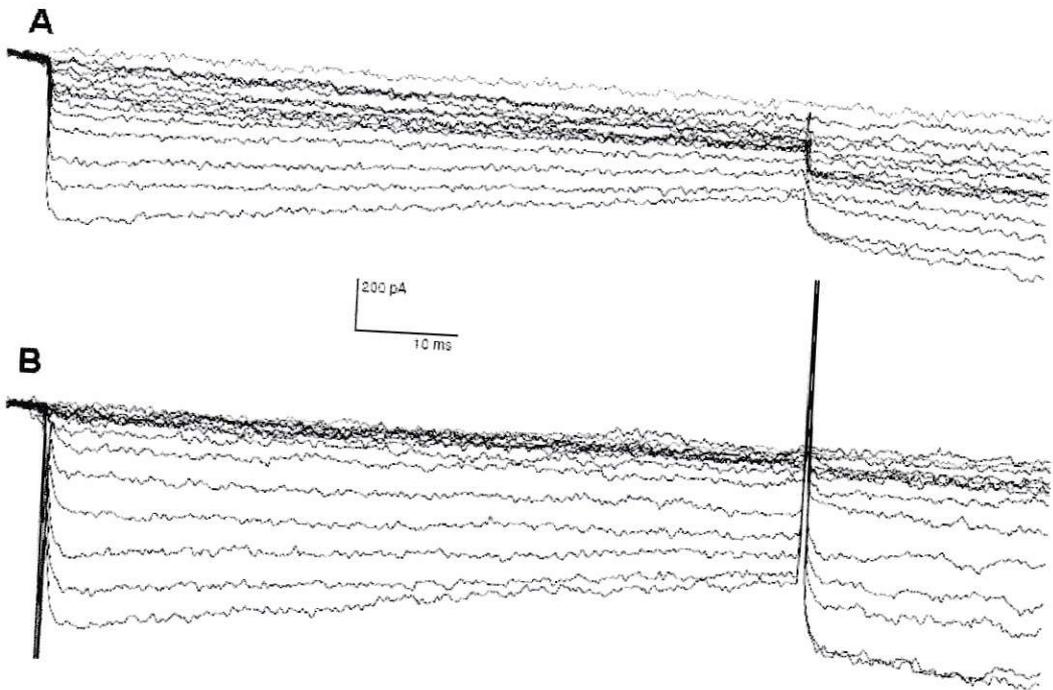


Figura 15. Imágenes representativas de los registros de corrientes de calcio dependientes de Voltaje. A, registro de célula CTb transfectada con el vector vacío (35pF); B, registro célula CTb transfectada con la secuencia "scrambled" (43pF).

Al analizar la curva Corriente-Voltaje (I-V) de los registros obtenidos, se ve claramente el efecto de la interferencia del mensajero de RCAN1 en la amplitud de la densidad de I_{Ca} en las células CTb, destacándose que en ninguna de las condiciones registradas se alcanza el potencial de inversión de la corriente (figura 16).

Curva I-V registros de corrientes en células CTb transfectadas y controles.

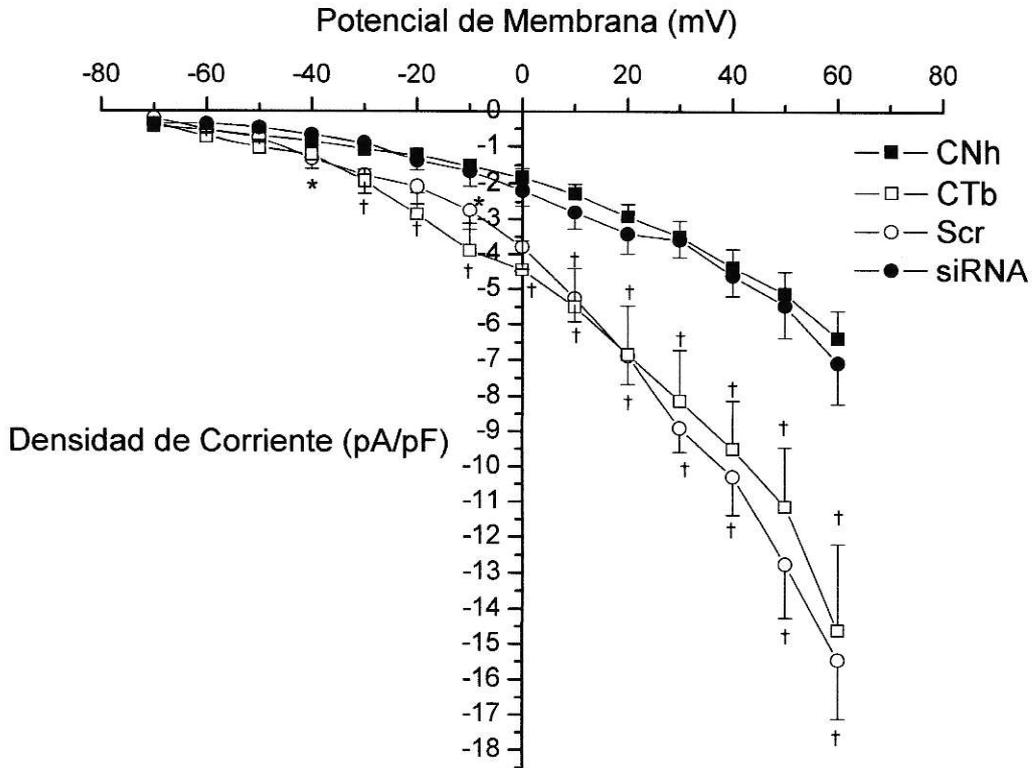


Figura 16. Curva Corriente-Voltaje (I-V) de los registros de corrientes de calcio en modo célula entera en CNh (n=18), CTb vector vacío (n=6), CTb transfectadas con la secuencia interferente específica (siRNA, n=10) y CTb transfectadas con la secuencia control (“scrambled”; Scr, n= 4); los puntos son Promedio \pm E.E. ($\dagger = p < 0,01$; $* = p < 0,05$ para CNh). Notar la no diferencia significativa entre CNh y CTb transfectada con interferente para RCAN (siRNA); y entre CTb sin transfectar y CTb transfectada con la secuencia “scrambled”

Al estudiar las cinéticas de activación e inactivación en las cuatro condiciones (CNh, CTb, CTb-siRNA, y CTb-Scr) no se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones, como se desprende de los valores de constantes de tiempo τ , obtenidos al ajustar los trazados al modelo m^3h de Hodgkin y Huxley (Tabla 4).

Valores de constante de tiempo para corrientes de Ca⁺²

Activación								
Vm	τ (ms)							
	CTb	n	CNh	n	siRNA	N	Scr	n
0	0,76 ± 0,41	5	0,34 ± 0,22	7	0,54 ± 0,33	6	0,74 ± 0,61	4
+10	0,64 ± 0,27	5	0,35 ± 0,23	7	0,61 ± 0,35	6	0,89 ± 0,46	4
+20	0,70 ± 0,31	5	0,36 ± 0,24	9	0,66 ± 0,36	6	0,83 ± 0,44	5
+30	0,57 ± 0,35	5	0,44 ± 0,28	9	0,73 ± 0,42	6	0,74 ± 0,30	5
+40	0,75 ± 0,50	5	0,47 ± 0,31	9	0,72 ± 0,56	6	0,78 ± 0,35	5
+50	0,76 ± 0,37	5	0,42 ± 0,31	9	0,75 ± 0,55	6	0,81 ± 0,42	5
+60	0,81 ± 0,41	5	0,38 ± 0,31	8	0,59 ± 0,26	6	0,92 ± 0,45	5

Inactivación								
mV	τ (ms)							
	CTb	n	CNh	n	siRNA	n	Scr	n
0	17,96 ± 12,56	3	27,21 ± 21,47	3	41,16 ± 54,35	4	46,15 ± 43,82	4
+10	68,70 ± 65,34	4	37,50 ± 36,56	4	47,82 ± 49,29	4	105,04 ± 150,16	4
+20	61,68 ± 43,83	4	39,11 ± 24,09	7	24,04 ± 15,80	3	32,70 ± 24,49	3
+30	137,39 ± 100,46	6	78,97 ± 55,59	7	59,44 ± 53,12	4	43,48 ± 37,84	4
+40	46,87 ± 28,98	5	54,80 ± 32,32	8	87,89 ± 134,98	5	56,81 ± 56,37	5
+50	143,48 ± 140,0	6	59,81 ± 40,43	8	47,70 ± 41,77	5	68,95 ± 78,68	5
+60	118,28 ± 100,48	6	78,45 ± 86,56	7	142,50 ± 126,33	3	63,82 ± 33,80	3

Tabla 4. Valores derivados de ajustes del modelo m^3h de Hodgkin y Huxley. Para la activación los valores fueron tomados inmediatamente después de la transiente capacitiva al peak de la corriente. Para la inactivación la región ajustada comenzó desde el peak de corrientes hasta el 80% del estado estacionario, se aceptaron los valores con un coeficiente de correlación mayor a 0,95. Los valores son Promedio ± D.E. No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones.

Posteriormente, se evaluó la dependencia de potencial de la inactivación de las I_{Ca} en las células transfectadas con el interferente para RCAN1, para así determinar si esta disminución en la amplitud de la corriente podría estar dada por el hecho de tener menos canales disponibles para activarse. Los resultados

se presentan en la figura 17, donde se aprecia claramente que las células CTb transfectadas con siRNA exhiben un comportamiento comparable con aquel de la línea CNh. Vale decir, el desplazamiento de 15 mV hacia potenciales más despolarizados característicos de CTb se revierte en dirección a la condición control ($V_{0,5}$ CNh: 116 mV, CTb: 101 mV, CTb-siRNA: 117 mV.)

Curva inactivación dependiente de voltaje en células CTb transfectadas y controles.

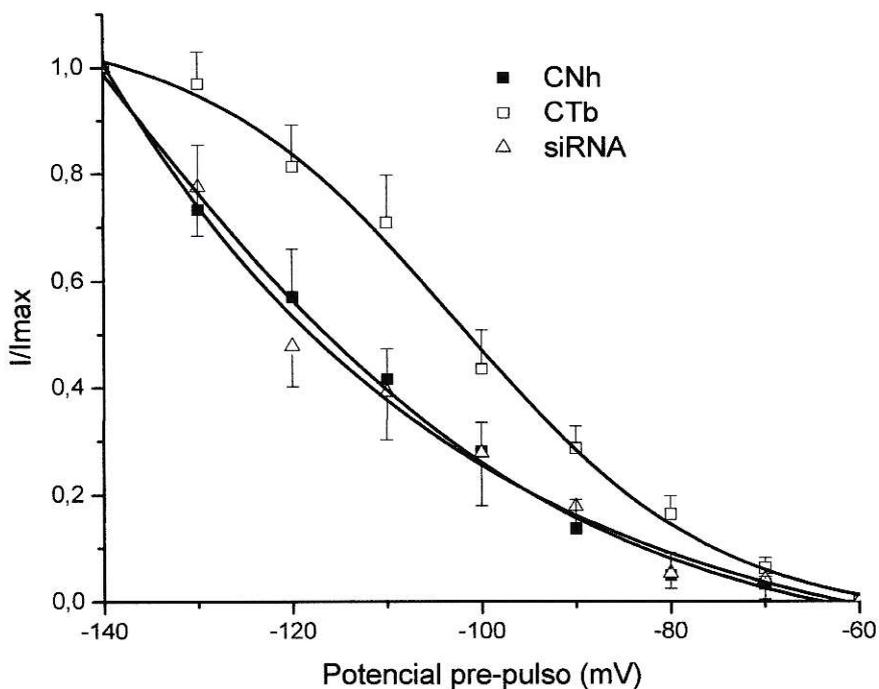


Figura 17. Inactivación dependiente de voltaje de corrientes de Ca^{2+} . Los valores son normalizados, en cada condición, al máximo de corriente dado el potencial de adquisición de +20mV. Nótese la disminución de la corriente por cada pre pulso en las células CTb transfectadas con la secuencia interferente para RCAN1. Los puntos son Promedio \pm EE. CNh, n = 5; CTb sin transfectar n = 5; siRNA n = 6. La función Boltzmann ajusta a un valor $p < 0,01$ en los registros de todas las condiciones.

Esto sugiere que RCAN1 tendría un rol regulador de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje a nivel de la compuerta de inactivación de éstos, dado por el desplazamiento ya descrito de la curva de inactivación hacia la izquierda en las células CTb transfectadas con siRNA, llegando a niveles esencialmente comparables a aquellos de las células euploides CNh.

Posteriormente, para evaluar la posible relación entre el estado de inactivación de los canales versus la cantidad de carga transferida, se integró el área bajo la curva de los registros de corrientes de las células CTb transfectadas (figura 18). Estos valores disminuyen a niveles semejantes de los registrados en CNh, alejándose de los valores obtenidos para las células CTb sin transfectar. Por lo tanto, es altamente sugerente que el rol de RCAN1 en la regulación las I_{Ca} va dada por la posibilidad de controlar la compuerta de inactivación de los canales.

Movimiento total de carga en células CTb transfectadas y controles.

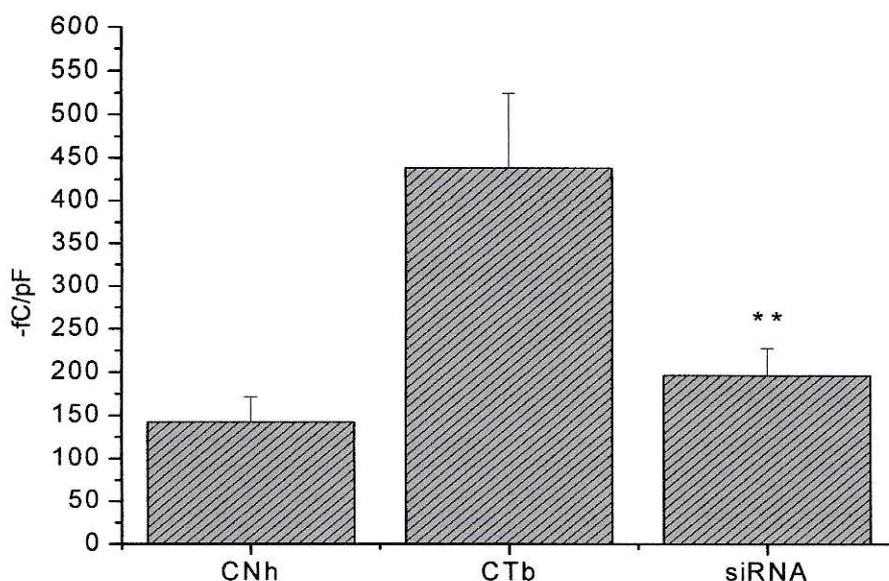


Figura 18. Movimiento total de cargas en las células CNh, CTb y CTb transfectadas con la secuencia específica para RCAN1 (siRNA), normalizado por capacitancia, desde un potencial de mantención de -80mV hasta +20mV. La carga total fue obtenida integrando el área bajo la curva de las corrientes registradas. ** $p < 0,01$ para CTb ctrl. CNh $n=10$; CTb ctrl $n= 6$, siRNA = 12.

Dado que en las células CTb, el regulador de la calcineurina (RCAN1) está sobre-expresado, el mecanismo de las alteraciones descritas en las I_{Ca} podría estar relacionado con una mayor inhibición de calcineurina (CaN). Por ello, decidimos verificar esta hipótesis en las células diploides CNh, incubándolas con FK-506, un potente y conocido inhibidor farmacológico de CaN.

Imagen representativa de corrientes de calcio en célula CNh incubada con FK-506 y control.

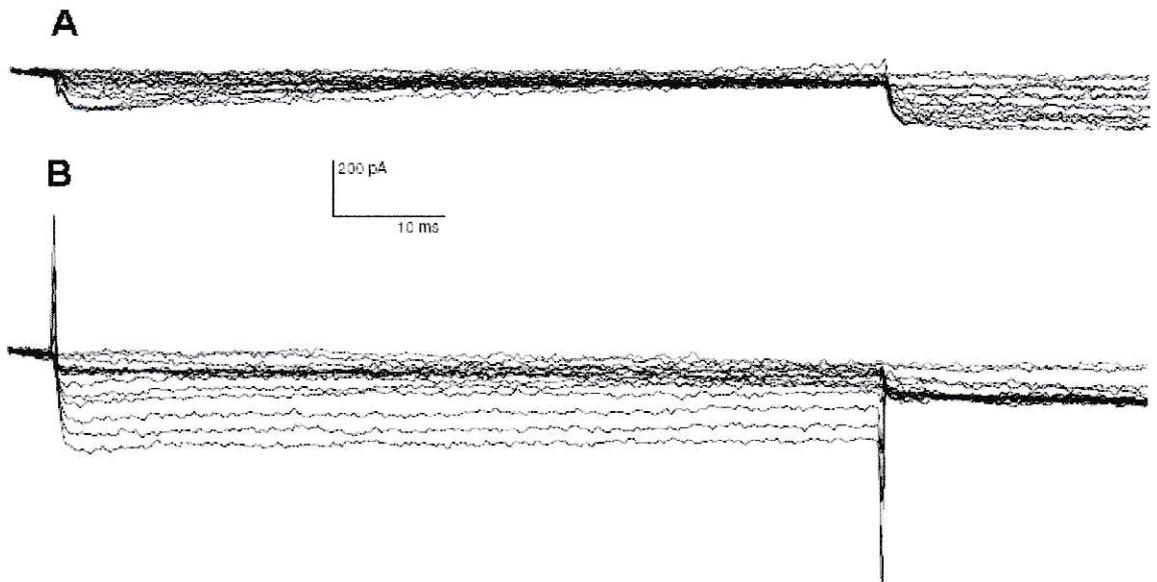


Figura 19. Imágenes representativas de registros de I_{Ca} . A, neurona CNh (capacitancia 15pF), B neurona CNh incubada por 4 horas con 50 μ M de FK-506, un inhibidor farmacológico de CaN, en medio sin suero ni antibióticos (capacitancia 17pF).

Los resultados (figura 19) dan cuenta de un claro control de parte de CaN sobre los canales de calcio activados por voltaje, ya que luego de la incubación con FK506, se aprecia un aumento en la densidad de la I_{Ca} , en las células CNh, logrando incluso, aumentar por sobre los registros de las neuronas CTb (figura 20).

Curva I-V de registros de corrientes de calcio en células CNh incubadas con FK-506 y controles.

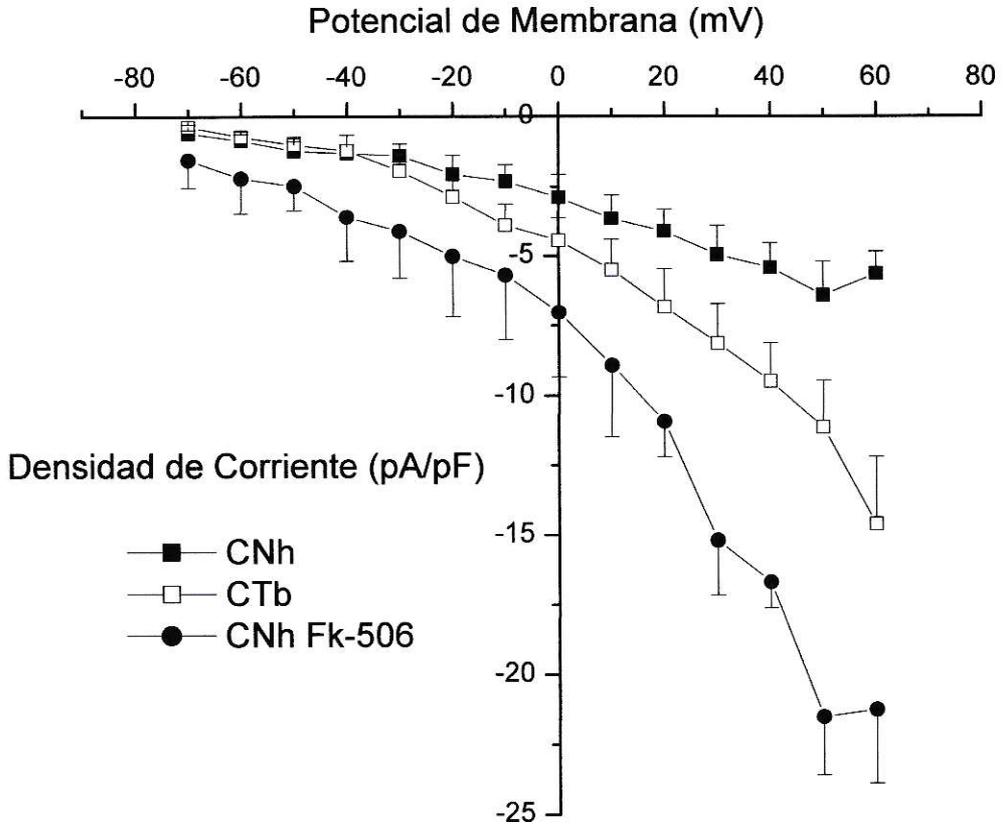


Figura 20. Curva I-V de las corrientes de calcio en modo Whole-cell en CNh control (n=4), CTb (n=6) y CNh tratada por 3-4 horas con FK-506 a 50 μ M (n=3). Nótese el aumento significativo de las corrientes de calcio en CNh tratadas con FK-506 comparada con CNh sin tratamiento para todos los valores de voltaje ($p < 0,01$); y el aumento por sobre los registros de CTb. Los puntos corresponden a Promedios \pm EE.

Posteriormente se evaluó la dependencia de voltaje en la inactivación en las células incubadas con FK-506. Los resultados arrojados (figura 21) muestran que si bien existe un desplazamiento de 7 mV hacia potenciales más despolarizados, este cambio no alcanza los niveles observados en las células CTb ($V_{0,5}$ = CNh ctrl: 115 mV, CTb: 101 mV, CNh-FK-506: 108 mV). Estos datos sugieren a que la regulación de RCAN1 en la compuerta de inactivación de los canales de calcio activados por voltaje, no se debe solamente a su rol claramente definido como un regulador de la actividad de la CaN.

Inactivación dependiente de voltaje en células CNh incubadas con FK-506 y controles.

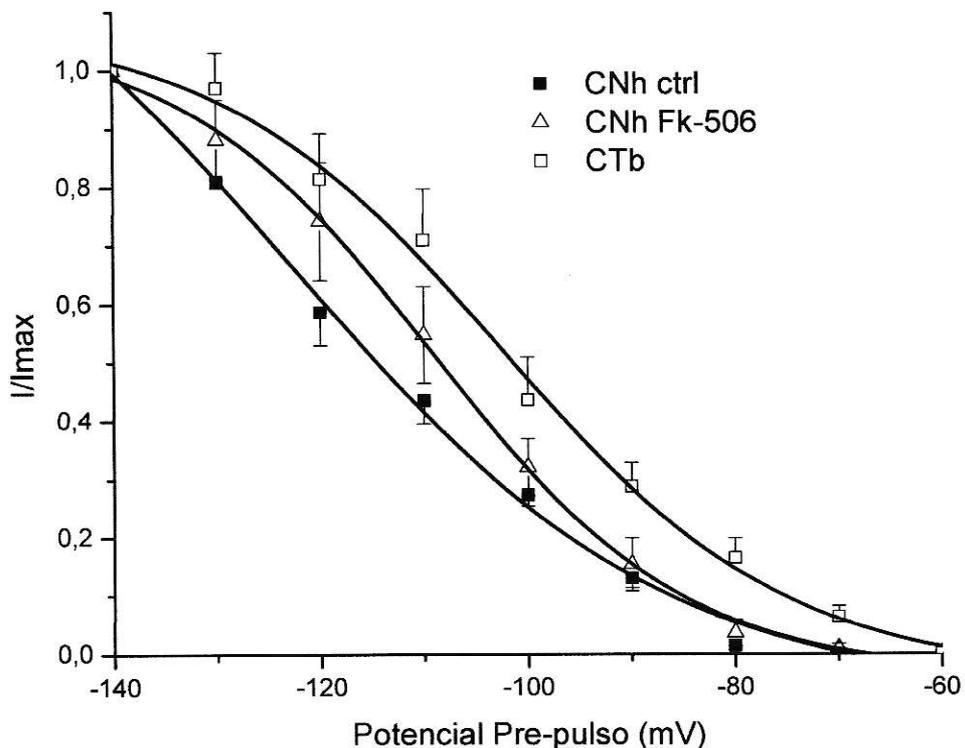


Figura 21. Inactivación dependiente de voltaje de corrientes de Ca^{2+} . Los valores son normalizados, en cada condición, al máximo de corriente dado el potencial de adquisición de +20mV. Note el cambio en la curva hacia

potenciales mas despolarizados en CNh incubada con FK-506, respecto a CNh control. Los puntos representan Promedio \pm E.E. CNh control = 3, CTb = 5, CNH FK-506= 7. Función Boltzmann ajusta a un $p < 0,01$ en todas las condiciones.

Es interesante notar que cuando se realizaron los análisis de movimiento total de carga, éstos fueron considerablemente mayores en las células CNh tratadas con FK-506 que los valores obtenidos de las células CNh sin tratar, e incluso mayores que aquellos de las células trisómicas (figura 22) .

Movimiento total de carga en células CNh incubadas con FK-506 y controles

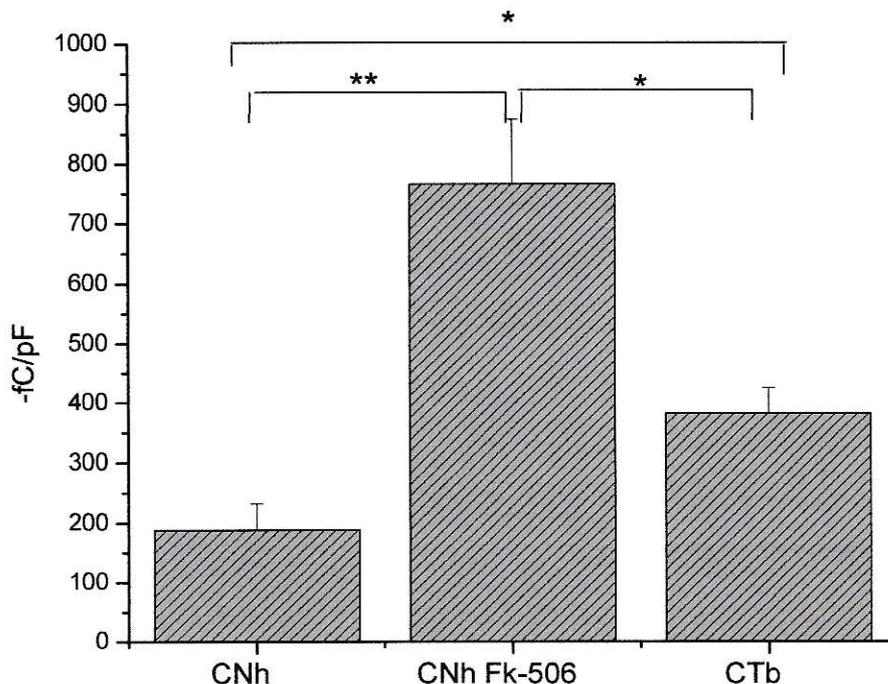


Figura 22. Gráfico de movimiento total de carga obtenidos de los registros de corrientes de calcio a potencial de +20mV. Notar la diferencia significativa

éntrelos valores obtenidos de CNh control frente a las células CNh tratadas con FK-506, como también entre éstas y las células trisómicas. (CNh, n=3; CNh-Fk-506, n= 3; CTb, n=4; * p<0,05; ** p<0,01)

En conclusión, estos resultados sugieren que la sobre-expresión de RCAN1 podría alterar severamente las I_{Ca} , dado el hecho que:

1) La amplitud aumentada de las I_{Ca} en CTb, que alcanza a ser 2,5 veces mayor que los registros de las células CNh, es revertida al disminuir la expresión de RCAN1, mediante la incorporación de secuencias interferentes específicas (siRNA). Aun cuando las cinéticas temporales de activación e inactivación no se vieron afectadas en todas las condiciones.

2) El cambio de 15 mV hacia potenciales más despolarizados en la inactivación dependiente de voltaje en células CTb, es revertido mediante la disminución de la expresión de RCAN1, a valores indistinguibles con aquellos obtenidos en las células CNh.

3) los niveles aumentados de movimiento total de carga observado en las células CTb son restituidos a valores comparables a los de las células CNh, debido a la normalización de la expresión de RCAN1.

4) El uso de FK-506, un inhibidor farmacológico de la CaN, en las células CNh provoca un importante aumento de la densidad de las I_{Ca} , sugiriendo que esta fosfatasa cumple un rol en el control de los canales. Pero, al evaluar la dependencia de voltaje en la inactivación, este control no se ejercería solamente sobre la compuerta de inactivación, y el efecto de Rcan1 sobre la

dependencia de voltaje de la inactivación estaría dado sólo parcialmente por la regulación de CaN.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados indican que la densidad de las I_{Ca} de calcio en las células CTb alcanza valores hasta 2,5 veces mayores que las registradas en las células CNh, medidos en respuestas a pulsos de +60 mV (figura 7). Estos hallazgos en esencia se asemejan a aquellos encontrados por Galdzicki y col. (1998), quienes reportaron un aumento en la densidad de corrientes de calcio en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratones Ts16. Estos autores atribuyen el aumento de las corrientes a una densidad de canales de calcio en la membrana incrementada, reflejado por una mayor unión de [3H]PN200-110. Es interesante hacer notar que los mismos autores refieren que la transcripción de ARN mensajero de las subunidades de los canales tipo-L se mantuvo sin alterar entre los cultivos de Ts16 y euploides. Es necesario plantear que no existe una clara explicación a este fenómeno, debido a que ningún gen que codifica a las subunidades del canal ha sido mapeado en el cromosoma 16 en ratones. Una posible explicación de esta sobre-expresión de canales podría estar asociada a una vida media aumentada de estos en la membrana, lo cual podría contribuir a un aumento en la densidad. Dicha posibilidad emerge de estudios previos que demuestran anomalías en procesos endosomales y de internalización de membrana reportados en otros modelos de SD (Cataldo y col.

2003 y 2004) como también en la línea celular CTb (Arriagada y col. 2007). Por lo tanto, en estudios futuros, es preciso evaluar la expresión de la subunidad α -1c en la línea trisómica y en la euploide, con el objeto de elucidar un posible aumento en la expresión de los canales tipo L en CTb.

En relación a la dependencia de voltaje en la activación para las corrientes de calcio, la falta de inversión en la corriente imposibilita un análisis preciso. Varias explicaciones posibles pueden plantearse ante esta situación. Una de ellas puede yacer en el alto gradiente de Ca^{2+} usado en nuestros experimentos, condición seleccionada para optimizar los registros de amplitud de corriente (Caviedes y col., 2006). En las condiciones usadas, el potencial de inversión calculado para la corriente de Ca^{2+} (E_{Ca}) fue de +205mV, nivel que no fue posible alcanzar en nuestros experimentos, debido a la presencia de anomalías en la membrana en niveles de potencial mayores a +70mV ("breakdown"). A este respecto, Hagiwara y Byerly (1981) señalaron las dificultades de registrar corrientes de calcio de salida de la célula, incluso a potenciales muy positivos. Estos autores concluyen que 'los canales de Ca^{2+} son, inherentemente, canales de una vía'. A su vez, se ha demostrado que las corrientes de salida presentada en cada registro de corrientes de calcio (por ejemplo, Galdzicki y col. 1998, Caviedes y col. 2006) pueden ser llevadas por cationes monovalentes (Cs^+ y/o K^+) que pasan a través de los canales de calcio (Fenwick y col. 1982, Lee y Tsien, 1984), manteniendo así el potencial de inversión consistentemente más bajo que el E_{Ca} termodinámico predicho. De acuerdo a esto, el estudio de las

I_{Ca} disminuyendo el gradiente electroquímico o quizás induciendo una mayor diferenciación celular podría contribuir a dilucidar este punto.

La presencia de corrientes de cola de inactivación lenta fue un hallazgo notable en ambas líneas celulares. Se pensó que tales corrientes podrían ser llevadas por Cl^- o Ca^{2+} . Cuando se reemplazó el Cl^- externo por acetato, las corrientes de cola se redujeron dramáticamente en aproximadamente un 60%, del movimiento total de carga. La presencia de este componente de la corriente de cola podría deberse a que el movimiento de carga es llevado por un flujo de iones Cl^- de salida, el cual sigue al flujo de entrada de iones Cl^- durante los pulsos despolarizantes. Tales resultados apuntan a que las corrientes de cola en nuestras líneas celulares son llevadas principalmente por Cl^- , con una corriente remanente que podría ser, lo más probable, conducida por iones Ca^{2+} . Al mismo tiempo, estos resultados sugieren que la remoción de Cl^- externo enlentecerían la fase de deactivación de las corrientes, sin compromiso en el pico, como se manifiesta en la figura 9A. Estas corrientes de cola han sido descritas en otros tipos neuronales (Barnes y Bui, 1991; Currie y Scott, 1992; Fleig y Panner 1996), como también en otras líneas celulares establecidas con el protocolo UCHT1 (Caviedes y col., 1993). A este respecto, un interesante resultado publicado por Barnes y Bui (1991), muestran que en foto receptores en cultivo existe una regulación dependiente de pH en corrientes de cola de Cl^- vía canales de calcio, y en particular indican que a pH 7,4 hay un notable aumento en aquella corriente. Por lo tanto en nuestras condiciones

experimentales, es posible que las corrientes de cola sean llevadas por iones Cl^- como se discutió anteriormente, considerando que la solución de baño fue ajustada precisamente a ese nivel de pH.

En relación al aumento de la densidad de la corriente de calcio en las células CTb, existen varias explicaciones posibles que podrían dar cuenta de este fenómeno:

1.- La presencia de cinéticas dependiente de tiempo aceleradas en la compuerta de activación, lo que resultaría en una apertura más rápida. Sin embargo, este mecanismo pierde fuerza debido a la ausencia de diferencias significativas en las constantes de activación entre CTb y CNh (tabla 3).

2.- Cinéticas enlentecidas en la fase de desactivación en la condición trisómica, lo que podría resultar en la persistencia de corrientes en periodos de tiempos más prolongados. Una vez más, las constantes de tiempo calculadas y detalladas en la tabla 3, muestran que no existen diferencias significativas entre ambos tipos celulares para este parámetro.

3.- En la ausencia de diferencias en las cinéticas temporales, la dependencia de voltaje de la activación e inactivación podrían jugar un rol preponderante en el aumento de la densidad de corriente en CTb. En nuestras condiciones experimentales, no se observó inflexión ni menos inversión de la corriente, lo cual impide cumplir con nuestro objetivo de determinar la activación dependiente de voltaje, al no poder obtenerse un valor máximo de densidad de corriente. Sin embargo, nuestros estudios usando el protocolo de pre-pulso para

determinar la dependencia de potencial de la inactivación, claramente muestran un cambio de 15mV hacia potenciales más despolarizados en los registros en células CTb, comparado con aquellos valores obtenidos en las células diploides. Esto determina que a los niveles de potencial de pre-pulso de membrana mostrados en la figura 10, existirían más canales disponibles para activación en la condición trisómica. Más aún, si se observan las diferencias en las corrientes normalizadas al nivel de pre-pulso de -80mV, el cual fue el potencial de mantención usado en el protocolo de activación, se evidencia un aumento de 3,2 veces en la corriente de CTb, comparada con CNh. Para relacionar este fenómeno con la corriente real, se calculó el movimiento de carga total obtenido de los registros de activación, en respuestas a pulsos de potencial que llevó el potencial de membrana desde -80mV a +20mV, integrando el área bajo la curva. Ello evidenció un incremento de alrededor de 2,6 veces en los valores de movimiento de carga en CTb, comparado con CNh (figura 11). Por lo tanto, es altamente sugerente que esta alteración de la sensibilidad de voltaje a la inactivación juega un importante rol en la génesis del aumento de densidad de corriente en la línea celular trisómica.

Es destacable que, todos estos resultados (sobre todo la falta de inversión de corriente, las corrientes de cola y la curva de inactivación de voltaje) indican un comportamiento anormal, no canónico, de los canales de calcio, tanto en la línea CNh como en la CTb. Por consiguiente, esto no es atribuible a

propiedades intrínsecas de la condición trisómica, sino posiblemente al proceso de immortalización y de diferenciación de las células. Por lo tanto, todos los resultados presentados en esta tesis deben ser tomados con precaución, ya que podrían representar un estudio de una forma inmadura de canales de calcio tipo L, los cuales han sido descritos en otras líneas celulares establecidas mediante el método UCHT1 (Caviedes y col. 1993; Liberona y col. 1997). Es entonces posible que estudios futuros usando protocolos de diferenciación ya descritos (Caviedes y col. 1993; Liberona y col. 1997, Cárdenas et al, 1999, Rojas et al, 2008) sean necesarios para obtener un espectro más completo de canales activados por voltaje maduros, aspecto que no fue tratado en esta tesis.

Sin embargo, los resultados en relación a la densidad de corrientes de Ca^{2+} guardan estrecha relación con los reportados por Galdzicki y col. (1998), lo que sugiere que al menos esta alteración de la condición Ts16 se reproduce establemente en la línea CTb, y puede ser un parámetro a evaluar, por ejemplo, para ensayos de compuestos que sean candidatos a terapia.

Sorprendentemente, los resultados de la curva de inactivación dependiente de voltaje, son esencialmente similares a aquellos ya descritos para corrientes de sodio en neuronas de ganglio de la raíz dorsal en cultivo proveniente de humanos con SD y normales (Caviedes y col. 1990). En este estudio, los autores reportaron un cambio en la curva de inactivación dependiente de

voltaje, de aproximadamente 10 mV hacia potenciales más despolarizados en corrientes tetrodotoxina (TTX) -resistente y TTX-sensibles en neuronas SD comparados con neuronas controles. Aun cuando esto supone una comparación entre diferentes especies, diferentes tipos celulares y distintos tipos de canales iónicos, es tentador especular que el efecto del exceso de los productos génicos dados por la condición trisómica tendrían blancos comunes, resultando en alteraciones similares, específicamente en la regulación de la compuerta de inactivación de canales iónicos voltaje sensibles.

Situándonos en este contexto, *RCAN1* - el cual ha sido mapeado en el cromosoma 21 en humanos y en el 16 en ratón- aparece como un candidato para explicar algunas de estas alteraciones vistas en CTb. *RCAN1*, como su nombre lo indica - regulador de calcineurina (CaN) -, es una proteína que se une a la calcineurina, inhibiéndola y controlando los procesos río-abajo regulados por esta proteína fosfatasa (Gorlach y col. 2000). Uno de los blancos de CaN son los canales de calcio, en especial los tipo L (Armstrong, 1989). Por lo tanto, para evaluar los posibles efectos sobre las I_{Ca} , se decidió normalizar la expresión de *RCAN1*, llevándola a niveles comparables con aquellos de la líneas control CNh, mediante la técnica del *knockdown* con transfección de secuencias específicas interferentes (siRNA).

Los resultados presentados en esta tesis, demuestran la sobre-expresión de *Rcan1* en la línea CTb en un $52 \pm 8.2\%$, comparado con la línea euploide CNh, lo que aparece muy concordante con la presencia del cromosoma extra

correspondiente (Fuentes y col. 2000). A partir de esto, la transfección a intervalos de 24 y 48 horas con las secuencias interferentes específicas para *RCAN1*, redujeron significativamente los niveles de expresión en CTb, haciéndolos comparables a los encontrados en CNh (figura 12). Estos datos otorgan una ventana de tiempo de 24 a 48 horas post transfección, la cual fue utilizada para realizar los ensayos electrofisiológicos. Las células transfectadas con las secuencias controles (“*scrambled*”) no registraron disminución en la expresión de *Rcan1*, demostrando que la disminución de la expresión de *RCAN1* está dada por la acción de las secuencias interferentes específicas para *RCAN1*.

Para determinar el posible rol que cumple *RCAN1* en la regulación de los canales de calcio en el contexto de la sobre-expresión generalizada, se repitieron los estudios electrofisiológicos basados en el protocolo de pulsos despolarizantes y de pre-pulsos ya descritos. A su vez, se utilizó un abordaje farmacológico, mediante la adición de un inhibidor farmacológico de la CaN en células CNh, para así intentar emular el efecto de *RCAN1* sobre-expresado en CTb.

El primer resultado muestra que el *knockdown* de *RCAN1* provoca una disminución en la densidad de las I_{Ca} (figuras 14, 15, 16), llevándola a niveles comparables con aquellas de la línea CNh. Este efecto es específico para el

dicho *knockdown*, debido a que la transfección con la secuencia control (scrambled) no tuvo efecto en la densidad de corriente en la línea CTb. Dicho efecto no pudo ser explicado por una variación en las cinéticas temporales de activación e inactivación de las corrientes, donde no encontramos diferencias significativas. Nos planteamos también que estos valores, sobre todo los de inactivación, estén contaminados con corrientes de entrada de Cl^- .

Por lo tanto, se decidió evaluar si las diferencias encontradas en la inactivación dependiente de voltaje eran revertidas si la expresión de RCAN1 era llevada a niveles comparables con los obtenidos en CNh. Interesantemente, se encontró que RCAN1 juega un rol fundamental en la regulación de la compuerta de inactivación de los canales, dado que al disminuir su expresión, la curva que exhibe la línea CTb sin transfectar se acerca a aquella de las células CNh cuando se disminuye la expresión de RCAN1 (figura 17). Estos datos se correlacionan bien con aquellos encontrados en el movimiento total de cargas, donde una vez normalizado la expresión de RCAN1, hay una reducción de la cantidad de carga, alcanzando niveles comparables con aquellos de CNh (figura 18).

Para aclarar el posible efecto de RCAN1 sobre el control de las I_{Ca} vía inhibición de CaN, tratamos células CNh con FK-506, droga que ha sido usada ampliamente para inhibir la función de CaN (revisado por Lukyanetz, 1997; Lukyanetz y col. 1998; Burley y Sihra, 2000; Norris y col. 2002).

Es por esto que se decidió aplicar a las células CNh una concentración suficiente de Fk-506 (50 μ M) con el fin de corroborar el rol de esta fosfatasa en el aumento de las I_{Ca} en CTb. Los resultados expuestos en las figuras 19 y 20 apoyan la idea de que CaN participa en la regulación de la actividad de los canales, ya que al inhibir esta fosfatasa, las células euploides aumentan significativamente su densidad de corriente de Ca^{2+} , llegando a niveles incluso mayores que aquellos de las células CTb. Esto también se condice con un aumento del movimiento total de cargas (figura 22). Ello podría estar relacionado con cambios en los estados fosforilados de los canales de calcio dependientes de voltaje, posibilidad que debe ser analizada con posterioridad. A este respecto, existe evidencia considerable que indica que la fosforilación de Ser-1928 en la región C-terminal de la subunidad α -1c produce un aumento en la corriente (revisado por Catterall, 2000), aunque también se han propuesto sitios adicionales de fosforilación en esta subunidad (Ganesan y col. 2006) como en la subunidad β (Bunemann y col. 1999), las que podrían alterar la regulación de estos canales. Por lo tanto, estos antecedentes sugieren un rol importante de la CaN en la regulación de la corriente de mediada principalmente por canales tipo L.

Con esto en mente, se debe notar que la inhibición de la actividad de la CaN mediante la adición de 50 μ M de Fk-506 en CNh, si bien aumenta la densidad de corriente, no desplaza completamente la curva de dependencia de voltaje en la inactivación hacia los niveles de la línea CTb (figura 21). Esto sugiere que la

posible inhibición de CaN no subyacería totalmente la regulación de la compuerta de inactivación mediada por RCAN1 en las células CTb. Es tentador especular que los sitios de regulación por CaN podrían no estar totalmente vinculados con la compuerta de inactivación de los canales (figura 23). A este respecto, existe evidencia que además de CaN, RCAN1 interactúa con Raf-1 (Cho y col. 2005). Raf-1 une Ras (una proteína G pequeña) a la vía de señalización MEK/ERK., La activación de Ras, y uno de sus efectores, ERK inducen un aumento en corrientes de calcio, en una variedad de neuronas (Collin y col. 1990; Fitzgerald y Dolphin, 1997; Lei y col. 1998). Sin embargo, no hay antecedentes concluyentes acerca de cómo esta interacción podría estar ligada directamente con la regulación de la compuerta de inactivación de los canales de calcio. Por lo tanto es imperativo realizar un futuro estudio sobre la posible interacción entre RCAN1 y Raf-1-Mek-Erk, la cual podría ayudar a explicar la alteración en la regulación de la compuerta de inactivación ya demostrada en CTb.

Modelo esquemático del posible rol de RCAN1 en la regulación de los canales de calcio.

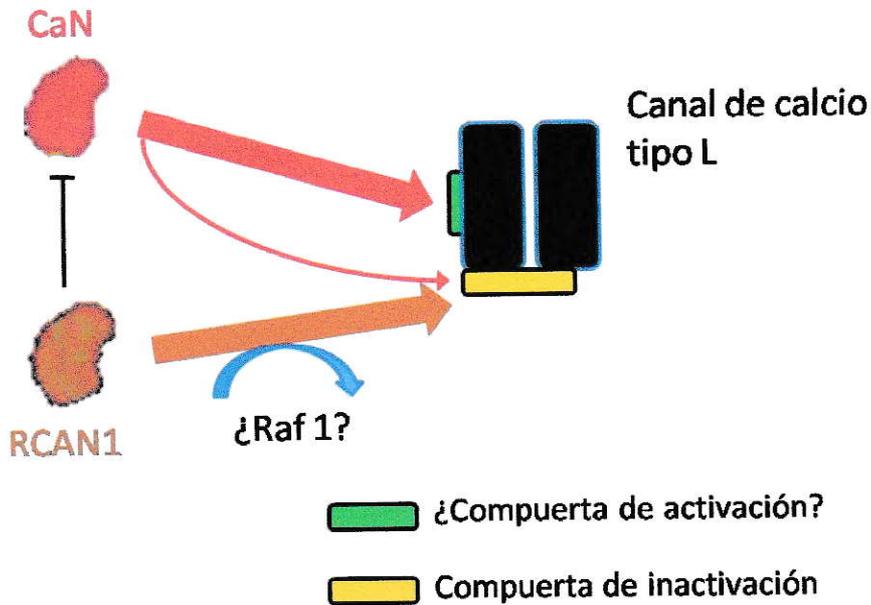


Figura 23. Esquema representativo indicando el posible rol de RCAN1 en la regulación de la corriente de calcio activada por voltaje. RCAN1 cumpliría tal rol, fundamentalmente, interactuando con la compuerta de inactivación a través de otro efector, posiblemente Raf1. En cambio CaN regularía mayormente el canal a través de la compuerta de activación o el sensor de voltaje (notar la diferencia de grosor de las dos flechas rojas, indicando una mayor regulación en sitios distintos a la compuerta de inactivación).

En las células CTb, se ha descrito anteriormente una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} comparada con las células CNh (Cárdenas y col., 1999, Rojas y col., 2008). Ello expresado por niveles elevados de concentración basal de Ca^{2+} y cinéticas enlentecidas en el decaimiento de las respuestas de Ca^{2+} inducida por agonistas. El aumento en la densidad de la corriente activada por voltaje, presentado en este estudio, es un mecanismo que podría contribuir en la alteración de aquella homeostasis. Todo esto podría conducir a anomalías en

excitabilidad celular, plasticidad sináptica y expresión génica. La condición SD es provocada por un exceso en la dosis génica, por lo tanto, entender la contribución de cada gen es importante a la hora de identificar blancos terapéuticos. En este contexto, RCAN1 es un buen candidato para el estudio de alteraciones relacionadas con funciones de la membrana celular, en particular aquellas relacionadas con propiedades excitables.

Finalmente, el presente trabajo postula un novedoso mecanismo por el cual RCAN1 contribuye a la alteración de la corriente de calcio activada por voltaje, situación que estaría mediada, al menos, por la regulación en la sensibilidad a voltaje de la compuerta de inactivación.

CONCLUSIONES

1.- Las propiedades pasivas de membrana no presentan diferencias significativas entre la línea celular proveniente de ratones normales (CNh) y trisómicos (CTb).

2.- Las corrientes registradas en ambas líneas celulares presentan características de corrientes de calcio inmaduras, similares a aquellas descritas en otras líneas celulares. Sin embargo, las corrientes aquí descritas manifiestan alteraciones similares a las encontradas en neuronas centrales Ts16 en cultivo primario:

- En la condición trisómica la anomalía se expresa en un aumento en la densidad de la corriente total, un cambio de 15 mV hacia potenciales más despolarizados en la dependencia de voltaje de la inactivación, y un aumento en el movimiento total de cargas de 2,6 veces, comparado con las células CNh.
- Estas corrientes podrían presentar características de corrientes de calcio tipo L.

3.- Las células CTb presentan un aumento de aproximadamente un 52% en la expresión de la proteína RCAN1, comparado con CNh, lo que coincide con lo esperado por dosis génica.

4.- Esta sobre-expresión de RCAN1 fue revertida utilizando secuencias específicas interferentes (siRNA) para el mensajero de *RCAN1*, llevando la expresión a valores similares a los encontrados en las células CNh.

5.- La disminución de la expresión de RCAN1 provoca:

a) una disminución de la densidad de las I_{Ca} en las células CTb, llevándola a niveles comparables a aquellos de la línea CNh.

b) desplazamiento de la curva de inactivación dependiente de voltaje hacia la izquierda, llegando a niveles similares a los encontrados en CNh.

c) Normalización del movimiento total de carga.

6.- Estos resultados sugieren un rol de RCAN1 sobre la regulación de las I_{Ca} , presumiblemente por un control sobre la compuerta de inactivación de los canales.

7.- Este control no sería mediado en su totalidad por calcineurina. Sin embargo, esta fosfatasa juega un claro rol en la regulación de los canales, dado el aumento en la densidad de corriente cuando las células CNh se incubaron con FK-506.

8.- Finalmente, el knockdown génico en modelos celulares del Síndrome de Down es una herramienta importante que permite identificar posibles blancos terapéuticos.

REFERENCIAS

- Acevedo, L.D., Galdzicki, Z. McIntosh, A.R. Rapoport, S.I. 1995. Increased inward current in septal neurons from the trisomy 16 mouse, a model for Down's syndrome, *Brain Res.*, 701: 89–98
- Allen, D.D., Cárdenas, A.M., Arriagada, C., Bennett, L.B., García, C. J., Rapoport, S.I., Caviedes, R. and Caviedes, P. 2002. A dorsal root ganglia cell line derived from trisomy 16 fetal mice, a model for Down Syndrome. *Neuroreport* 13:491-496.
- Armstrong, D.L. 1989. Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci.* 12:117-122.
- Arriagada, C., Astorga, C., Atwater, I., Rojas, E., Mears, D., Caviedes, R., Caviedes, P. 2007. Endosomal abnormalities related to amyloid precursor protein in cholesterol treated cerebral cortex neuronal cells derived from trisomy 16 mice, an animal model of Down syndrome. *Neurosci Lett.* 423(2):172-177.
- Arriagada, C., Pérez. R.D., Cárdenas, A.M., Segura-Aguilar, J., Caviedes, R., Caviedes, P. 2009. Dyrk1a and DSCR1 are overexpressed in neuronal cell lines derived from the cerebral cortex and hippocampus of a trisomy 16 mouse, an animal model of Down syndrome. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 829.17.
- Arron, J.R., Winslow, M.M., Polleri, A., Chang, C.P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J.R., Chen, L., Heit, J.J., Kim, S.K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Francke, U., Graef, I.A., Crabtree, G.R. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature.* 441: 595-600
- Ault, B., Caviedes, P. and Rapoport, S. I. 1989a. Neurophysiological abnormalities in cultured dorsal root ganglion neurons from the trisomy 16 mouse fetus, a model for Down Syndrome. *Brain Res.*, 485: 165-170.
- Ault, B., Caviedes, P., Hidalgo, J., Epstein, C.J., Rapoport, S. I. 1989b. Electrophysiological analysis of cultured fetal mouse dorsal root ganglion neurons transgenic for human superoxide dismutase-1, a gene in the obligate Down syndrome region of chromosome 21. *Brain Res.* 497: 191-194

- Aylward, E.H. Li, Q. Honeycutt, N.A. Warren, A.C. Pulsifer, M.B. Barta, P.E. Chan, M.D. Smith, P.D. Jerram, M. Pearlson, G.D. 1999. MRI volumes of the hippocampus and amygdala in adults with Down's syndrome with and without dementia. *Am. J. Psychiatry* 156: 564–568.
- Barnes, S. y Bui, Q .1991. Modulation of Calcium-activated Chloride Current via pH induced Changes of Calcium Channel Properties in Cone Photoreceptors. *J. Neurosci.*, 17: 4015-4023
- Berridge M. J., Bootman M.D., Roderick H.L. 2003. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 517-529
- Boullin, D. J. y O'Brien, R.A. 1971. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine uptake and binding by blood platelets from children with Down's syndrome. *J. Physiol.* 146: 287-297.
- Bunemann, M., Gerhardstein, B.L., Gao, T., and Hosey, M.M. 1999. Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the b2 subunit. *J. Biol. Chem.* 274: 33851–33854
- Burley, J.R, Sihra, T.S. 2000. A modulatory role for protein phosphatase 2B (calcineurin) in the regulation of calcium entry. *Eur Jour Neurosci* 12: 2881-2891.
- Cárdenas, A.M., Rodríguez, M.P., Cortés, M.P., Alvarez, R.M., Wei, W., Rapoport, S.I., Shimahara, T, Caviedes, R. and Caviedes, P. 1999. Intracellular calcium signals in immortal cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 fetal mice, an animal model of human trisomy 21 (Down Syndrome). *Neuroreport*, 10: 363-369
- Cárdenas, A.M., Allen, D.D., Arriagada, C., Olivares, A., Bennett, L.B., Caviedes, R., Dagnino-Subiabre, A., Mendoza, I.E., Segura-Aguilar, J., Rapoport, S.I. and Caviedes, P. 2002a. Establishment and characterization of immortalized neuronal cell lines derived from the spinal cord of normal and trisomy 16 fetal mice, an animal model of Down Syndrome. *J. Neurosci. Res.* 68: 46-58.
- Cárdenas, A.M., Arriagada, C., Allen, D.D., Caviedes, R., Cortes, J.F. Martín, J., Couve, E., Rapoport, S.I., Shimahara, T. and Caviedes, P. 2002b. Neuronal cell lines from the hippocampus of the normal and trisomy 16 mouse fetus (a model for down syndrome) exhibit neuronal markers, cholinergic function and functional neurotransmitter receptors. *Exp. Neurol.* 177: 159-170.
- Cataldo, A.M., Petanceska, S., Peterhoff, CM., Terio, N.B., Epstein, C.J., Villar, A., Carlson, E.J., Staufenbiel, E.J., Nixon, R.A. 2003. App gene dosage modulates

endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of Down Syndrome, *J. Neurosci.* 23: 6788–6792.

- Cataldo, A.M., Petanceska, S., Peterhoff, C.M., Terio, N.B., Mercken, M., Mehta, P., Buxbaum, J., Haroutunian, V., Nixon, R. 2004. A β localization in abnormal endosomes: association with earliest A β elevations in AD and Down syndrome, *Neurobiol. Aging.* 25: 1263–1272

- Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 521–555.

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

- Caviedes, P., Olivares, E., Caviedes, R. and Jaimovich, E.. 1993. Calcium fluxes, ion currents and dihydropyridine receptors in a newly established cell line from rat heart muscle *J. Molec. and Cell Cardiol.* 25: 829-845.

- Caviedes, P., Caviedes, R., Rapoport, S.I. 2006. Altered calcium currents in cultured sensory neurons of normal and trisomy 16 mouse fetuses, an animal model for human trisomy 21 (Down syndrome). *Biol. Res.* 39: 471 - 481.

- Caviedes, R., Stanbury J.B. 1976. Studies on cell line from a functional rat thyroid tumor in continuous culture. *Endocrinology.* 99: 549-54

- Cho, Y.J., Abe, M., Kim, S.Y., Sato, Y. 2005. Raf-1 is a binding partner of DSCR1. *Arch. Biochem. Biophys.*, 439: 121–128.

- Collin, C., Papageorge, A.G., Lowy, D.R., Alkon, D.L. 1990. Early enhancement of calcium currents by H-ras oncoproteins injected into *Hermissenda* neurons, *Science* 250:1743–1745.

- Crabtree, G. 2001. Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription. *J. Biol. Chem.*, 276: 2313-2316

- Currie, K.P.M. y Scott R.H. 1992. Calcium-activated currents in cultured neurons from rat dorsal root ganglia. *Br. J. Pharmacol.* 106: 593-602

- Davisson, M.T. Schmidt, C. Akeson, E.C. 1990. E.C Segmental trisomy murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome, *Prog. Clin. Biol. Res.* 360: 263–280.

- Dekaban, A.S. 1978. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann. Neurol.* 4: 345–356.

- Díaz Franulič, I., Fernández, P., Cárdenas, A.M., Lockman, P., Allen, D.D., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J., Caviedes, R., Caviedes, P. 2007. Knockdown of myo-inositol transporter SMIT1 normalizes cholinergic and glutamatergic function in a cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 mouse, an animal model of Down syndrome. *Soc. Neurosci. Abstr.* 579.6.
- Dierssen, M., I.F. Vallina, C. Baamonde, M.A. Lumbreras, C. Martinez-Cue, S.G. Calatayud, and J. Florez. 1996. Impaired cyclic AMP production in the hippocampus of a Down syndrome murine model. *Brain Res Dev Brain Res.* 95:122-4.
- Dierssen, M., Vallina, I.F., Baamonde, C., Garcia-Calatayud, S., Lumbreras, M.A., Florez, J. 1997. Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res.* 749 :238-44.
- Epstein, C.J., Cox, D.R., Epstein, L. B., 1985 Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 450: 157-168.
- Epstein, C. J., 1986a. *The Neurobiology of Down syndrome*, Raven Press, N. Y. 1-15.
- Epstein, C. J., 1986b. *The Consequence of Chromosomal Imbalance: Principles, Mechanisms, Models*. Cambridge Univ. Press, New York.
- Epstein, C.J., Avraham, K.B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C., Groner, Y., 1987. Transgenic mice with increased Cu/Zn superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8044–8048.
- Estibeiro, P. and Godfray, J. 2001. Antisense as a neuroscience tool and therapeutic agent. *TINS.* 24: 56-62.
- Fenwick E.M., Marty, A., Neher, E. 1982. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* 331: 599-635.
- Fiedler, J., Rapoport, S.I., Epstein, C.J., Caviedes, R. and Caviedes, P. 1994. Altered cholinergic function in cultured neurons from the trisomy 16 mouse fetus, a model for Down Syndrome. *Brain Res.* 658:27-32.
- Fitzgerald, E.M., Dolphin, A.C. 1997. Regulation of rat neuronal voltage dependent calcium channels by endogenous p21-ras, *Eur. J. Neurosci.* 9: 1252–1261
- Fleig, A., Penner, R. 1996. Silent calcium channels generate excessive tail currents and facilitation of calcium currents in rat skeletal myoballs. *J Physiol* , 494 (1): 141-153.

- Fuentes J. J., Pritchard M. A., Planas A. M., Bosch A., Ferrer I. and Estivill X. 1995. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum. Mol. Genet.* 4: 1935- 1944
- Fuentes J. J., Genesca L., Kingsbury T. J., Cunningham K. W., Perez-Riba, M., Estivill X., de la Luna, S. 2000. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1681–1690
- Galdzicki, Z., Coan, E., Rapoport, S.I. 1993. Cultured hippocampal neurons from trisomy 16 mouse, a model for Down's syndrome, have an abnormal action potential due to a reduced inward sodium current, *Brain Res.* 604: 69–78.
- Galdzicki, Z., Coan, E., Rapoport, S.I, Stoll, J. 1998. Increased expression of voltage-activated calcium channels in cultured hippocampal neurons from mouse trisomy 16, a model for Down Syndrome, *Mol. Brain Res.* 56: 200–206.
- Galdzicki, Z., Siarey, R., Pearce, R., Stoll, J., Rapoport, SI. 2001. On the cause of mental retardation in Down Syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models. *Bra. Res. Rev.* 35: 115-145.
- Gallo, E.M., Canté-Barrett, K., Crabtree, G.R. 2006. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nature Immunol.* 7: 25-32.
- Ganesan, A.N., Maack, C., Johns, D.C., Sidor, A., and O'Rourke, B. 2006. b-adrenergic stimulation of L-type Ca²⁺ channels in cardiac myocytes requires the distal carboxyl terminus of α_1C but not serine 1928. *Circ. Res.* 98: e11–e18
- Genesca, L., Aubareda, A., Fuentes, J.J, Estivill, X., De La Luna, S., Perez-Riba, M. 2003. Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochem. J.* 374: 567–575 (GB)
- Ghosh, A., Greenberg, M. E. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268: 239–247.
- Gibbs, E.L. y Gibbs, F.A.. 1964. Rarity of 14-and 6-per-second positive spiking among mongoloids. *Neurology*, 14: 581.
- Gorlach J., Fox D. S., Cutler N. S., Cox G. M., Perfect J. R., Heitman J. 2000. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calcipressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* 19: 3618–3629
- Hagiwara S. y Byerly L. 1981. Calcium channel. *Annual Review of Neurosciences* 4:69-125.

- Hamill O.P, Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth S.J .1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100

- Harris, C.D., Ermak, G., Davies, K.J.A. 2005. Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product Calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 2477–2486

- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., Groner, Y., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., Schudy, A., Zimmermann, W., Rosenthal, A., Kudoh, J., Schibuya, K., Kawasaki, K., Asakawa, S., Shintani, A., Sasaki, T., Nagamine, K., Mitsuyama, S., Antonarakis, S.E., Minoshima, S., Shimizu, N., Nordtsiek, G., Hornischer, K., Brant, P., Scharfe, M., Schon, O., Desario, A., Reichelt, J., Kauer, G., Blocker, H., Ramser, J., Beck, A., Klages, S., Hennig, S., Riesselmann, L., Dagand, E., Haaf, T., Wehrmeyer, S., Borzym, K., Gardiner, K., Nizetic, D., Francis, F., Lehrach, H., Reinhardt, R., Yaspo, M.L.; Chromosome 21 mapping and sequencing consortium. 2000 The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405 (18): 311-319

- Hodgkin A.L, Huxley A.F. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol (Lond)* 117: 500-544.

- Horwitz, B. Schapiro, M.B. Grady, C.L. Rapoport, S.I. 1990. Cerebral metabolic pattern in young adult Down's syndrome subjects: altered intercorrelations between regional rates of glucose utilization. *J. Ment. Defic. Res.* 34: 237–252.

- Huang, Z., Galdzicki, W., van Gelderen, P., Balbo, A., Chikhale, E.G., Schapiro, M.B., Rapoport, S.I. 2000. Brain myo-inositol level is elevated in Ts65Dn mouse and reduced after lithium treatment. *Neuroreport* 11: 445–448.

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

- Lee, K.S. y Tsien, R.W. 1984 High selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea-pig. *Journal of Physiology* 354: 253-272.

- Lei, S., Dryden, W.F., Smith, P.A. 1998. Involvement of Ras/MAP kinase in the regulation of Ca²⁺ channels in adult bullfrog sympathetic neurons by nerve growth factor, *J. Neurophysiol.* 80: 1352–1361.

- Lejeune, J., Turpin, R., Gautier, M. 1959. Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med.* 143: 256-65.
- Levitan, I.B. 1994. Modulation of ion channels by protein-phosphorylation and dephosphorylation, *Annu. Rev. Physiol.* 56: 193– 212.
- Liberona, J. L., Caviedes, P., Tascón, S., Giglio, J. R., Sampaio, S. V., Hidalgo, J., Caviedes, R. And Jaimovich, E. 1997. Expression of ion channels during differentiation of a human skeletal muscle cell line..*J. Muscle Res. & Cell Motil.* 18: 586-598.
- Lieberman D., Mody I. 1994. Regulation of NMDA channel function by endogenous calcium-dependent phosphatase. *Nature* 369: 235-239.
- Lukyanetz E. A. 1997 .Role of Calcineurin in Regulation of High Voltage-Activated Calcium Channel Activity. *Neurophys*, 29: 6: 442-447
- Lukyanetz E. A. , Piper T. P. and Sihra T. S., 1998. Calcineurin involvement in the regulation of high-threshold Ca^{2+} channels in NG108-15 (rodent neuroblastoma x glioma hybrid) cells. *Journal of Physiology* 510: 371—385.
- Lyle, R., Gehrig, C., Neergaard-Henrichsen, C., Deutsch, S., Antonarakis, S.E., 2004. Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of Down syndrome. *Genome Res.* 14: 1268–1274.
- Mansuy, I. M., Mayford, M., Jacob, B., Kandel, E. R., and Bach, M. E. 1998. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 92: 39–49
- Marcell, M.M. y Armstrong, V. 1982. Auditory and visual sequential memory of Down syndrome and nonretarded children. *Am. J. Ment. Defc.* 87: 86-95.
- Marín-Padilla, M. 1972. Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Res.* 44: 625–629.
- Marín-Padilla, M. .1976. Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 167: 63–81.
- Mikkola, J., Díaz Franulic, I., Cárdenas, A., Lockman, P., Allen, D.D., Shimahara, T., Jalonen, T., Segura- Aguilar, J., Caviedes, R. & Caviedes, P. 2008. SOD-1 knockdown is insufficient in correcting cholinergic dysfunction of a neuronal cell line derived from the trisomy 16 mouse, an animal model of Down's syndrome. 38th Annual meeting of the Society for Neuroscience, November 15 - 19, Washington, DC.

- Morris, J.K., Mutton, D.E, Alberman, E. 2002. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J. Med. Screen.* 9: 2-6
- Nieminen, K., Suárez-Isla, B and Rapoport, S. I. 1988. Electrical properties of cultured dorsal root ganglion neurons from normal and trisomy 21 human fetal tissue. *Brain Res.* 474: 246-254.
- Norris C. M., Blalock, E. M., Chen KC., Porter N. M, Landfield P. W. 2002. Calcineurin enhances l-type calcium channel activity in Hippocampal neurons: Increased effect with age in culture. *Neurosci.*110:213-225.
- Oliveria S., Dell'Acqua M., Sather W. 2007. AKAP79/150 Anchoring of calcineurin controls neuronal L-Type Calcium channel activity and nuclear signaling. *Neuron.* 55: 261-275.
- Opazo, P., Saud, K., de Saint Pierre, M., Cárdenas, A.M., Allen, D.D., Segura-Aguilar, J., Caviedes, R., & Caviedes, P. 2006. Knockdown of amyloid precursor protein normalizes cholinergic function in a cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 mouse, an animal model of Down syndrome. *J. Neurosci. Res.* 84: 1303-1310.
- Orozco, C.B. , Epstein, C.J., Rapoport, S.I. 1988. Voltage-activated sodium conductances in cultured normal and trisomy 16 dorsal root ganglion neurons from the fetal mouse, *Brain Res.* 466: 265–274
- Pulsifer, M.B. 1996. The neuropsychology of mental retardation. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2: 159–176
- Purpura, D.P. 1974. Dendritic spine 'dysgenesis' and mental retardation. *Science.* 186: 1126–1128.
- Reeves, R. H., Gearhart, J. D., Littlefield, J. W. 1986. Genetic basis for a mouse model of Down syndrome *Brain Res. Bull.* 16: 803-814.
- Rojas, G., Cárdenas, A.M., Fernández-Olivares, P., Shimahara, T., Segura-Aguilar, J., Caviedes, R., Caviedes, P. 2008. Effect of APP knockdown on intracellular calcium increases in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 mouse, an animal model of Down syndrome. *Exp. Neurol.* 209: 234–242.
- Rothermel B., Vega R. B., Yang J., Wu H., Bassel-Duby R. and Williams R.S. 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.* 275: 8719–8725

- Ruiz de Azua, I., Lumbreras, M.A., Zalduegui, A., Baamonde, C., Dierssen, M., Florez, J., Salles, J. 2001. Reduced phospholipase C-beta activity and isoform expression in the cerebellum of Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *J Neurosci Res.* 66:540-50.
- Rusnak, F., and Mertz, P. Calcineurin: form and function. 2000 *Physiol. Rev.* 80: 1483–1521.
- Sago, H., Carlson, E.J., Smith, D.J., Kilbridge, J., Rubin, E.M., Mobley, W.C., Epstein, C.J., Huang, T.T. 1998. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6256–6261.
- Sakmann, B. y Neher, E. 1983, *Single-Channel Recording*, Plenum Press, New York.
- Saud, K., Arriagada, C., Cárdenas, A. M., Shimahara, T., Allen, D.D., Caviedes, R., Caviedes, P. 2006. Neuronal dysfunction in Down syndrome: Contribution of neuronal models in cell culture. *J. Physiol (Paris)* 99: 201–210.
- Schapiro, M.B. Creasey H., Schwartz M., Haxby, J.V. White, B. Moore, A., Rapoport, S.I. 1987. Quantitative CT analysis of brain morphometry in adult Down's syndrome at different ages. *Neurology* 37: 1424–1427.
- Schapiro, M.B., Luxenberg, J.S.; Kaye, J.A.; Haxby, J.V.; Friedland, R., Rapoport, S.I. 1989. Serial quantitative CT analysis of brain morphometrics in adult Down's syndrome at different ages. *Neurology* 39: 1349–1353
- Schmidt-Sidor, B., Wisniewski, K.E., Shepard, T.H., 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
- Takashima, S., Becker, L.E., Armstrong, D.L., 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.
- Wasi, S. RNA Interference: The Next Genetics Revolution?. 2003. *Nature, Horizon Symposia.* Available at <http://www.nature.com/horizon/rna/background/pdf/interference.pdf>
- Winder, D. G., Mansuy, I. M., Osman, M., Moallem, T. M., and Kandel, E. R. 1998. Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell* 92: 25–37

- Yates C.M., Simpson, J., Maloney, A.F.J., Gordon, A. y Reid, A.H. 1980. Alzheimer-like cholinergic deficiency in Down syndrome. *Lancet*, 2: 979.
- Yates C.M., Simpson, J., Gordon, A., Maloney, A.F.J., Allison, Y. Ritchie, I.M. Urquart, A. 1983. Catecholamines and cholinergic enzymes in pre-senile and senile Alzheimer-type dementia and Down's syndrome. *Brain Res.* 280: 119-126.

ADÉNDUM.

Parte de esta tesis fue publicada en la Revista Científica ***Neurotoxicity Research***. Epub 2011.

Acuña MA, Pérez-Nuñez R, Noriega J, Cárdenas AM, Bacigalupo J, Delgado R, Arriagada C, Segura-Aguilar J, Caviedes R, Caviedes P. Altered Voltage Dependent Calcium Currents in a Neuronal Cell Line Derived From the Cerebral Cortex of a Trisomy 16 Fetal Mouse, an Animal Model of Down Syndrome. *Neurotox Res*. 2011 Dec 28. [Epub ahead of print]PMID: 22203612 [PubMed - as supplied by publisher]

Altered Voltage Dependent Calcium Currents in a Neuronal Cell Line Derived From the Cerebral Cortex of a Trisomy 16 Fetal Mouse, an Animal Model of Down Syndrome

Mario A. Acuña · Ramón Pérez-Nuñez · Jorge Noriega · Ana María Cárdenas ·
Juan Bacigalupo · Ricardo Delgado · Christian Arriagada ·
Juan Segura-Aguilar · Raúl Caviedes · Pablo Caviedes

Received: 16 August 2011/Revised: 30 November 2011/Accepted: 13 December 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Human Down syndrome (DS) is determined by the trisomy of autosome 21 and is expressed by multiple abnormalities, being mental retardation the most striking feature. The condition results in altered electrical membrane properties (EMPs) of fetal neurons, which are qualitatively identical to those of trisomy 16 fetal mice (Ts16), an animal model of the human condition. Ts16 hippocampal cultured neurons reportedly exhibit increased voltage-dependent calcium currents (I_{Ca}) amplitude. Since Ts16 animals are unviable, we have established immortalized cell lines from the cerebral cortex of Ts16 (named CTb) and normal littermates (named CNh). Using the whole-cell patch-clamp technique, we have now studied I_{Ca} in CTb and CNh cells. Current activation occurs at -40 mV in both cell lines ($V_{\text{holding}} = -80$ mV). Trisomic cells exhibited a 2.4 fold increase in the maximal Ca^{2+} current density compared to normal cells (CNh = -6.3 ± 0.77 pA/pF, $n = 18$; CTb = -16.4 ± 2.423

pA/pF; $P < 0.01$, $n = 13$). Time dependent kinetics for activation and inactivation did not differ between the two cell types. However, steady state inactivation studies revealed a 15 mV shift toward more depolarized potentials in the trisomic condition, suggesting that altered voltage dependence of inactivation may underlie the increased current density. Further, the total charge movement across the membrane is increased in CTb cells, in agreement with that expected by the potential sensitivity shift. These results indicate that CTb cells present altered Ca^{2+} currents, similar to those of Ts16 primary cultured central neurons. The CTb cell line represents a model for studying DS-related impairments of EMPs.

Keywords Down syndrome · Calcium currents · Trisomy · Patch clamp

Introduction

Down Syndrome (DS) in humans is caused by the presence of an extra copy of chromosome 21 (HSA21) (Jacobs et al. 1959; Lejeune et al. 1959). The condition represents the most common cause of mental retardation of genetic origin (Oster-Granite 1986; Loesch-Mdzewska 1968; Johnson and Abelson 1969; Scott et al. 1983). Other abnormalities include cardiac malformations, immunological disorders, a higher incidence of leukemia and patients also develop Alzheimer's disease (AD)-like pathology after the fourth decade of life (Epstein 1986a, b; Ault et al. 1989; Schapiro et al. 1988). 127 genes have been identified in this chromosome, along with 98 possible new genes, and 59 pseudogenes, all of which could be overexpressed in DS (Epstein 1986a; Hattori et al. 2000; Saud et al. 2006), determining an excess gene dosage effect.

M. A. Acuña · R. Pérez-Nuñez · J. Noriega · J. Segura-Aguilar · R. Caviedes · P. Caviedes (✉)
Program of Molecular and Clinical Pharmacology, ICBM, Faculty of Medicine, University of Chile, Clasificador 7, Independencia 1027, 8389100 Independencia, Santiago, Chile
e-mail: pcaviede@med.uchile.cl

A. M. Cárdenas
Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso (CINV), Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

J. Bacigalupo · R. Delgado
Department of Biology and Millennium Institute, ICDB, Faculty of Science, University of Chile, Santiago, Chile

C. Arriagada
Program of Anatomy & Developmental Biology, ICBM, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile

Murine trisomy 16 (Ts16) has been proposed as an animal model of DS, as the mouse autosome 16 bears great synteny with HSA21. Regrettably, Ts16 mice are unviable, and they die in utero between 14 and 16 days of gestation (Epstein et al. 1985).

Using cultured neurons of Ts16, several groups have described essentially the same electrophysiological alterations found in the human condition: increased rates of depolarization and repolarization, with a consequent reduction in spike duration. Altered density and kinetics of Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} channels may underlie such abnormalities (Caviedes et al. 1990; Nieminen et al. 1988; Caviedes et al. 2006). Also Ts16 central neurons exhibit altered amplitude and kinetics of intracellular Ca^{2+} responses to agonists (Schuchman et al. 1998). These aforementioned results have validated the Ts16 model for the study of neuronal pathophysiology in DS, particularly those related to cell membrane function. Nevertheless, these alterations differ qualitative and quantitatively in different territories of nervous system (Ault et al. 1989; Galdzicki et al. 1993; Acevedo et al. 1995), indicating that specific alterations must be carefully defined for different cell types and tissues, and comparisons must be made between similar cell types.

Voltage dependent Ca^{2+} channels are critical for neuronal function, as they influence both excitability and various physiological pathways critical to neurons, such as neurotransmitter release. In this regard, Galdzicki et al. (1998), using cultured hippocampal neurons of Ts16 mice, reported an increase in L-type calcium current density in trisomic cells compared to controls, whereas the activation and inactivation kinetics remained similar. They concluded that the increase in the amplitude of the current was due to an increase in the calcium channel density measured by higher [3H]PN200-110 binding. On the other hand, Caviedes et al. (2006), using dorsal root ganglia cultured neurons, found that Ts16 cells exhibited a reduction in the Ca^{2+} current density. Further, they reported a reduction of the voltage dependence of activation at -30 and -20 mV levels. In terms of time dependent kinetics, activation was slower in trisomic cells, while inactivation kinetics were not different.

To overcome the inviability of the Ts16 condition, our group has successfully established continuously growing cell lines from the cerebral cortex of both a normal and trisomy 16 fetal mouse (Cárdenas et al. 1999), using an original UCHT1 protocol (Caviedes et al. 1993), which has yielded continuously growing cell lines from mammalian tissue of diverse origins. The cell lines studied here, named CNh (derived from a euploid animal) and CTb (derived from a trisomic subject) present neuronal markers by immunohistochemistry and lack glial traits after almost 15 years in continuous culture (Cárdenas et al. 1999; Allen et al. 2000; Rojas et al. 2008). They also exhibit similar

cholinergic dysfunctions as those of Ts16 cultured cells (Fiedler et al. 1994; Cárdenas et al. 1999; Allen et al. 2000; Cárdenas et al. 2002a, b) and they exhibit altered intracellular Ca^{2+} signals in response to neurotransmitter agonists (Cárdenas et al. 1999; Rojas et al. 2008). Considering the crucial role that voltage-gated Ca^{2+} currents play in neurotransmitter release, in particular in central territories of the nervous system, which are critical in cognitive function, we have now studied voltage activated Ca^{2+} currents in CTb and CNh cells, using the whole-cell patch-clamp technique. The results indicate that current density is increased in the trisomic cell line, in a manner that is comparable to that of Ts16 cultured central neurons.

Materials and Methods

Cell Culture

The cells were grown in glass Petri dishes and maintained in feeding medium, composed of DMEM/Ham F12 (Sigma Co., St. Louis, MO) nutrient mixture (1:1) modified to contain 6 g/l glucose, 1 g/l bicarbonate, 10% (v/v) bovine serum, 2.5% (v/v) FBS, and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin. Passages were carried out by detaching the cells with 0.1% trypsin (Gibco Invitrogen). The cultures were kept in incubators at 37°C , 100% humidity and an atmosphere of 5% CO_2 . Media was renewed twice a week. For recording, cells were seeded at low density onto 35-mm plastic Petri dishes, and were recorded at less than 30% confluency.

Patch-Clamp Methodology

Macroscopic currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique (Hamill et al. 1981). The cells were visualized in a NIKON inverted microscope equipped with phase contrast optics. Glass electrodes (BLUETIP, Monoject Scientific, St. Louis, MO) were pulled in several stages using a Sachs-Sutter PC-84 puller to reach a pipette resistance between 2 and 4 M Ω . Prior to recordings, the cells were rinsed with 1 ml of saline composed of (in mM): 150 TEA-Cl, 2.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 Hepes-KOH, 10 Dextrose (pH 7.4). The pipettes were filled with a low K^+ solution composed of (in mM): 140 CsCl, 0.45 CaCl_2 , 5 EGTA-KOH, 5 Hepes-NaOH, 10 Dextrose. Gigaohm seals (2–10 G Ω) were established between the patch pipette and the cell membrane by applying a soft suction pulse inside the pipette. After canceling the fast capacity current transients using the null-bridge circuitry of our EPC-7 patch-clamp amplifier (HEKA Elektronik, Ger), the whole-cell configuration was achieved by applying a brief, stronger pulse of negative pressure inside the pipette. A minimum of 2 min was

allowed for exchange of solutions between the pipette and the cell and to stabilize the membrane resting potential. Command voltage and current steps were generated by a DIGIDATA 1200 digital-to-analog converter board (Molecular Devices Corporation, Foster City, CA) controlled by a customized program Pclamp 8.2 (Molecular Devices Corporation, CA) installed in a dedicated PC compatible computer. Cell responses were sampled at rates of 10–50 kHz. All recordings were conducted at room temperature (20–22°C).

- (a) *Current clamp* Passive properties were studied in current clamp mode, in response to an average of 5 hyperpolarizing pulses of 0.1 and 0.05 nA amplitude, 200 ms duration. Membrane resistance was estimated as the maximal voltage amplitude in steady state, divided by the applied current pulse amplitude. The membrane time constant (τ) was taken as the point in time corresponding to 0.632 of the maximal voltage amplitude. Cell capacitance (C) was calculated as $C = \tau/R$ and was used for calculation of ionic current density (pA/pF).
- (b) *Voltage clamp* Cells were clamped at a holding level of -80 mV, and depolarizing steps of 70 ms duration with increments of 10 mV were presented at 0.5 Hz. The base line was taken from a 5 ms period before the application of depolarizing pulses. Capacitive and leak currents were compensated using on-line subtraction with a conventional P/4 protocol: the leak subtraction protocol applied a series of 4 scaled replicas of the sweep (sub-sweeps) of the same polarity, 25 ms after the test pulse. The 4 sub-sweeps were added and the final added trace was subtracted to the test pulse. Positive-feedback, series-resistance compensation was not used. Voltage errors were calculated assuming a series resistance of two times the open-tip resistance of the electrode, multiplied by the peak amplitude of the active membrane current. Only traces with voltage errors less than 3 mV were used. Peak currents were measured and corrected for cell capacitance to obtain current density.

Activation and slow inactivation kinetics were studied by fitting the current traces to the classical m^3h Hodgkin and Huxley model for sodium current activation and inactivation (Hodgkin and Huxley 1952), using the “least squares fitting” method provided by the customized software Pclamp 8.2 (Axon Instruments). The function is:

$$I = [m^3h]I_{\max}$$

where,

$$m = 1 - \exp(-t/\tau_a),$$

and

$$h = \exp(-t/\tau_h).$$

The time constants are represented as τ_a for activation and τ_h for inactivation. The fitting region for activation ranged between the pulse start, immediately after the capacitive spike and the maximal current peak. For inactivation, the maximal current peak and the point at which the current reached 80% of the steady-state level were used as limits for the fit. Fits were considered adequate for least squares residual values equal or larger than 0.95. Steady-state inactivation was examined using conventional pre-pulse protocols (Hille 2001). A 1 s conditioning pre-pulse that held the membrane at potentials between -140 and 0 mV (incremented in steps of 10 mV) was followed by a holding potential of -80 mV for 2 ms to minimize the effect of tail currents after the pre-pulse. The test pulse had a duration of 100 ms and drove the membrane potential from -80 mV to $+20$. The current amplitude to the test pulse response after a -140 mV pre pulse was considered as I_{\max} . Values of the steady-state curve were fit to a sigmoidal curve using the Boltzmann equation to 200 iterations. Correlation levels were considered acceptable for values equal or greater than 0.95 (Caviedes et al. 2006). Calcium channel blockers (nifedipine 10 μ M, Cd^{2+} 1 mM) were added to the external solution directly, to determine the contribution of diverse type of calcium currents (L; non-L). Statistical significance was assessed with a two-tailed Student's t -test for values of $P < 0.05$.

Results

(1) Calcium current density is increased in the CTb neuronal cell line

Passive membrane properties did not differ between CNh and CTb (Table 1), and space clamp problems, like large cells bearing extensive processes, were not evident. When stepped from a holding potential of -80 mV, trisomic neurons evidenced a pronounced increase in the current amplitude compared with diploid neurons, as depicted in Fig. 1, which presents a typical record of a CNh and a CTb cell of comparable capacitance values. The traces were corrected with a P/4 subtraction protocol, as no anomalous rectification or active components were evident at those voltage levels, and the noise levels of the resulting corrected traces were the lowest. Activation occurs at approximately -40 mV in both cell lines. Nevertheless, as shown in the I–V curve in Fig. 2, reversal of the current could not be observed up $+60$ mV and the theoretical calculated reverse potential was $+205$ mV. The striking increase of the current density is evident in CTb, reaching average values 2.4-fold greater than those observed in CNh neurons at $+60$ mV.

Table 1 Passive membrane properties of CNh and CTb cells obtained in current clamp mode, in response to hyperpolarizing pulses of 0.1 and 0.05 nA, 200 ms duration

Passive membrane properties				
Parameter	CNh	<i>n</i>	CTb	<i>n</i>
Capacitance (pF)	33.9 ± 9.2	9	30.6 ± 10.3	14
Resistance (MΩ)	56.2 ± 34.04	11	47.9 ± 37.3	9

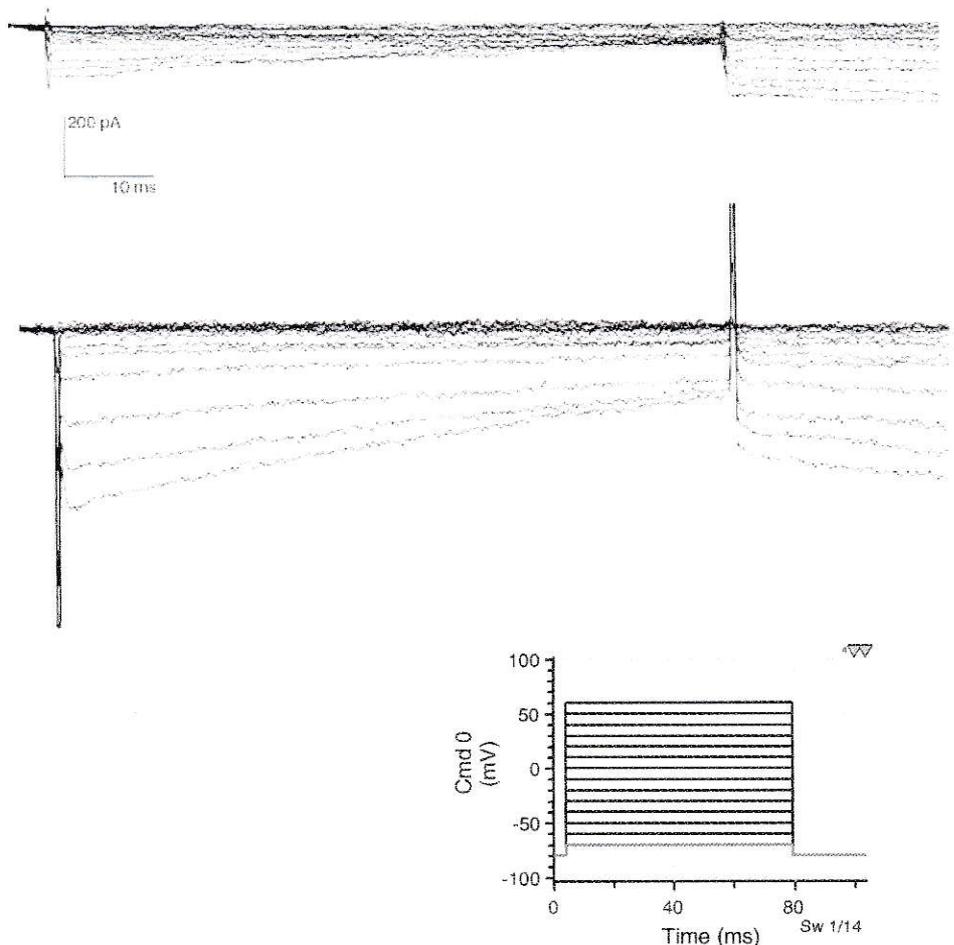
Membrane resistance was estimated as the maximal voltage amplitude divided by the applied current pulse amplitude. Time constant (τ) was taken as the point in time corresponding to 0.632 of the maximal voltage amplitude. Cell capacitance (C) was calculated as $C = \tau/R$

This current was largely carried by L-type calcium channels, since the blockade with nifedipine showed a reduction of the total current of $98.8 \pm 1.3\%$ ($n = 3$) (Fig. 3).

(2) Voltage dependence of Ca^{2+} current inactivation is impaired in CTb cells

As reversal of Ca^{2+} current was not reached in our conditions, we could not evaluate voltage dependence of activation in CNh and CTb cells. Nevertheless, the steady-state

Fig. 1 Calcium current responses in CNh (53pF) and CTb (45pF) cells recorded in Voltage-clamp mode ($V_{\text{holding}} = -80$ mV) in depolarizing steps of 10 mV and 70 ms duration, presented at 0.1 Hz



voltage-dependent inactivation curve exhibits a 15 mV shift toward more depolarized potentials in CTb cells, compared to CNh (Fig. 4). This suggests that a greater number of Ca^{2+} channels are available for activation at negative potentials (-130 ; -110 , -90 and -80 mV), compared to CNh. The latter is specially relevant at the pre-pulse level of -80 mV, where a 3.2-fold increase in current is evident in CTb cells, compared to CNh. To relate this finding with those results obtained from the activation protocols, we integrated the surface under the curve of the current signals taken from the activation protocols at the step levels of $+20$ mV. This procedure yielded the total charge moving across the membrane, which at the said potential levels resulted in a 2.7-fold increase of charge movement in CTb cell compared to CNh (CTb = 331.4 ± 190 nC, $n = 11$; CNh = 128.7 ± 63.5 nC, $n = 10$. Mean \pm SD, $P < 0.01$).

(3) Calcium currents in CTb and CNh cells have similar activation and inactivation time dependent kinetics

To evaluate the contribution of the intrinsic gating properties of the Ca^{2+} current, we studied the time dependent

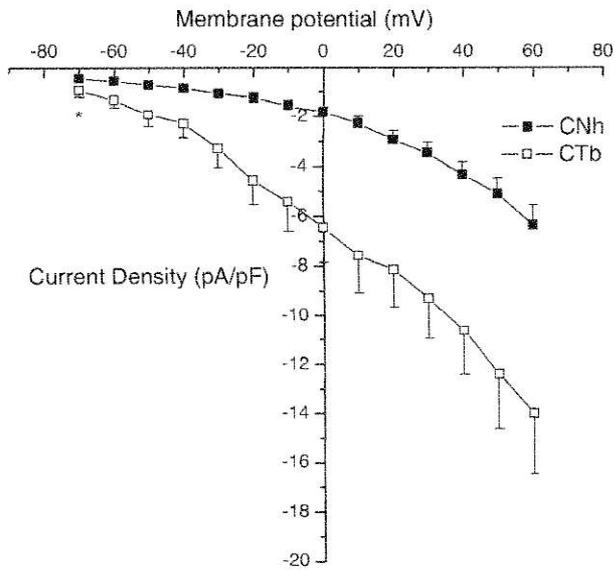


Fig. 2 I - V curve of CNh and CTb cells. Values (mean \pm SEM) are significantly different between both conditions for $P < 0.05$, except *(N.S.) (CNh, $n = 18$; CTb, $n = 13$). Note the substantial increase of current density in the trisomic condition

activation and inactivation kinetics by fitting the current traces to the m^3h Hodgkin and Huxley model. The m^3 function for activation proved to be the function that best converged to our pre-established correlation level of 0.95. No significant differences were encountered in time constant values between CNh and CTb cells (Table 2). These results argue against a role of time dependent kinetics in the altered Ca^{2+} conductance in CTb cells.

(4) Tail currents are largely carried by Cl^-

The presence of large, very slowly inactivating tail currents were seen in all our recordings and in both cell types. To determine the nature of such currents, we conducted recordings, where external TEA-Cl was replaced with TEA-acetate, thus introducing a non permeant anion. Figure 5 shows recordings in CTb, which are comparable to the same recordings in CNh cells. Cells kept in TEA-acetate show a marked reduction of tail current amplitude ($\sim 60\%$) (Fig. 5a, c). Further, the blockade of Ca^{2+} currents with the addition of 1 mM Cd^{2+} in the external bath, resulted in a blockade of all currents (Fig. 5b). These results suggest that tail currents in our cell lines are largely carried by Cl^- (60%), and to a lesser extent by Ca^{2+} .

Discussion

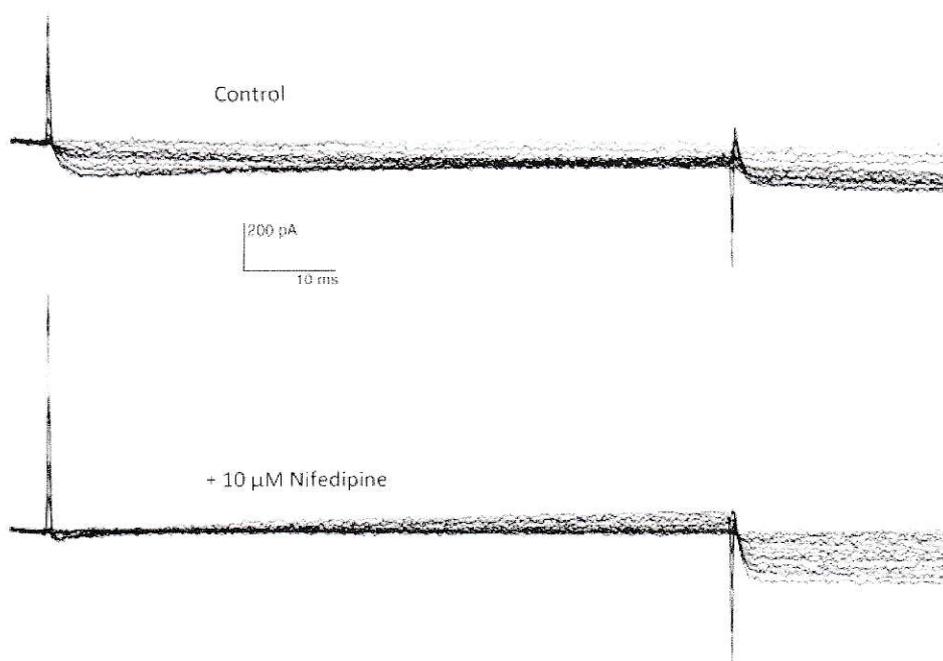
Our results indicate that the calcium current density in CTb neurons was ~ 2.5 -fold greater than that of CNh cells. This

finding in essence resembles that of Galdizicki et al. (1998), who reported a greater current density in primary cultures of Ts16 hippocampal neurons. These authors attribute the enhanced calcium currents to increased calcium channel density in the membrane, reflected by a greater binding of $[3H]PN200-110$. Interestingly, mRNA expression of L-type channel subunits remained unchanged between Ts16 and euploid cultures. There is no clear explanation to this phenomenon, as no genes of such channel subunits have been mapped to human autosome 21 or murine chromosome 16. Increased half life in the membrane of such channels may underlie increased channel density, a possibility that arises from the reduced membrane internalization and endosomal abnormalities reported in other DS models (Cataldo et al. 2003; 2004) as well as in the CTb cell line (Arriagada et al. 2007). We are currently evaluating the expression of L-type calcium channel subunits in our trisomic and normal cell lines, in order to elucidate a possible increased expression of L-type calcium channels in our trisomic cell line.

Regarding the voltage dependency of activation for Ca^{2+} currents, the lack of reversal precluded an accurate analysis, as the necessary values of I_{max} could not be obtained. Possible explanations to this situation may lie on the high Ca^{2+} gradient used in our experiments, condition selected to optimize current amplitude. This yielded a calculated reversal potential for Ca^{2+} of $+205$ mV, levels that were not reachable in our experiments, as membrane breakdown became evident at levels beyond $+60$ mV. In this regard, Hagiwara and Byerly (1981) pointed out that outward calcium currents could not be recorded even at potential levels more positive of the calcium electrochemical equilibrium potential (E_{Ca}), and they conclude that "calcium channels are inherently one way channels." Outward currents presented in every calcium channel recording (e.g., Galdizicki et al. 1998; Caviedes et al. 2006) have been shown to be carried by monovalent cations (e.g., Cs^+ and/or K^+) moving outward through Ca^{2+} channels (Fenwick et al. 1982; Lee and Tsien 1984), thus keeping the reversal potential consistently well below the predicted thermodynamical E_{Ca} . In this regard, it is quite possible that the calcium channels present in our recordings are not permeable to such monovalent ions, thus remaining the thermodynamical E_{Ca} intact. Further, previous results using other cell lines established with the UCHT1 method also reveal lack of Ca^{2+} current reversal (Caviedes et al. 1993; Liberona et al. 1997), in particular when differentiation protocols were not used. The aforementioned assumption will need to be addressed by diminishing the electrochemical gradient, and perhaps further differentiating the cells.

Several plausible explanations may underlie the enhanced Ca^{2+} current density observed in CTb cells. One

Fig. 3 Effect of nifedipine (10 μM) on calcium currents. The upper figure shows a whole-cell recording of a CNh cell line ($V_{\text{holding}} = -80$ mV). The lower figure shows current responses after application of nifedipine. Note the sharp reduction in current density



possibility is the presence of accelerated time dependent kinetics in the activation gates, which would in turn result in faster opening. However, this mechanism loses strength in light of the lack of significant differences in activation times constants between CTb and CNh cells (Table 2). On the other hand, delayed time dependent kinetics in the deactivation phase could result in persistence of current for longer periods of time. Yet again, the time constant values calculated and detailed in Table 2, show no differences between both cell types in this parameter.

In the absence of differences in time dependent kinetics, voltage dependence of activation and inactivation may come into play that could explain the increased current density in trisomic cells. Again, in our experimental conditions, we did not observe inversion of the current, possibly due to the increased Ca^{2+} gradient used in our experimental conditions. Nevertheless, our studies using pre-pulse protocols to assess steady-state inactivation and voltage dependence of inactivation, clearly show a 15 mV shift toward more depolarized potential in the trisomic condition. This determines that at the pre-pulse membrane potential levels noted in Fig. 4, more channels are available for activation. Further, if we closely observe the differences in normalized current at the pre-pulse level of -80 mV, which was the holding level used in the current activation protocols (Fig. 1), a 3.2 fold increase in current is evident in trisomic compared to normal cells. To relate this phenomena to the actual current, we calculated the charge moving across the membrane in the activation protocols, namely in

responses to pulses that took the membrane from -80 to $+20$ mV, by integrating the surface under this curve. This yielded values of around 2.7-fold increases in charge for the trisomic condition, compared to normal cells. This is then highly suggestive that this impaired voltage sensitivity to inactivation plays a major role in the genesis of the increased Ca^{2+} current density in the trisomic cell line.

The presence of large, very slowly inactivating tail currents was a striking finding in both CNh and CTb cells. We hypothesized that such currents could be carried by either Cl^- or Ca^{2+} . When replacing external Cl^- with acetate, tail current amplitude was reduced dramatically by approximately 60%. Further, addition of the Ca^{2+} channel blocker Cd^{2+} blocked practically all current. It is then plausible that the reduction of the tail charge movement is due to the outward flux of Cl^- ions flux, which follows the influx of Cl^- ions during the depolarizing test pulses. This may, in turn, have an effect on the reduction of the time-dependent inactivation kinetics (shown in Fig. 5a). Such results suggest that tail currents in our cell lines are driven mainly by Cl^- , with a remnant current most likely carried by Ca^{2+} . Further, as shown in Fig. 3, tail currents persist when cells are recorded in the presence of TEA-Cl and nifedipine is added, suggesting that the tail current component driven by Ca^{2+} is not carried out via L-type channels. Such tail currents have been described in other neuronal cell types (Barnes and Bui 1991; Currie and Scott 1992; Fleig and Penner 1996), and also in other cell lines established with our UCHT1 method (Caviedes et al.

Fig. 4 Voltage-dependent inactivation of calcium currents.

a 1 s conditioning pre-pulse held the membrane at potentials between -140 and 0 mV (10 mV steps) followed by a $V_{\text{holding}} = -80$ mV for 3 ms. Later a test pulse that drove the membrane potential to $+20$ mV was applied (see inset).

a I_{max}/I curve fitted to Boltzmann function. Values are normalized to peak current traces for pre-pulse levels of -140 mV in each cell (Boltzman fit results: CNh, $\chi^2 = 0.00073$, $P < 0.01$. CTb, 0.00074 , $P < 0.01$. 200 iterations) filled squares CNh, open squares CTb. Points represent mean \pm S.E.M. (CNh $n = 5$; CTb $n = 5$). $*P < 0.05$.

b Representative figures of recordings in CNh -upper- and CTb -bottom-

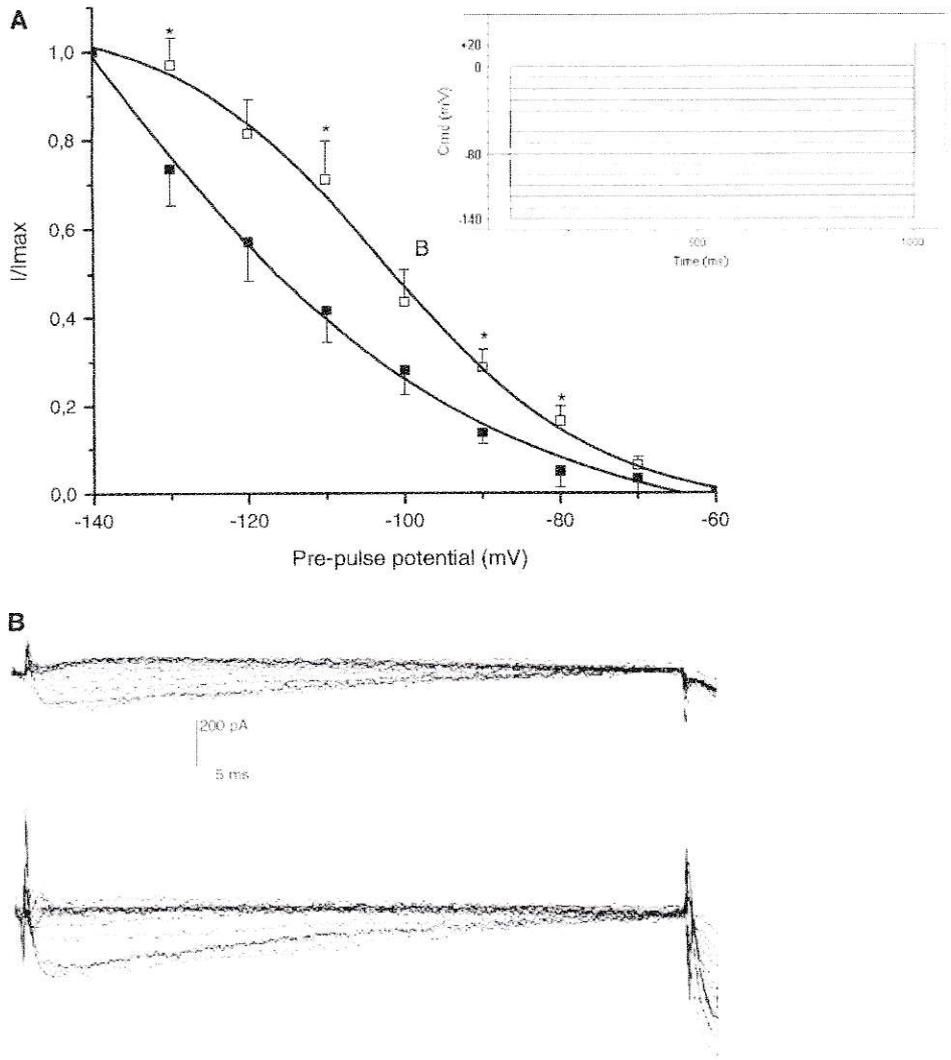


Table 2 Values derived from exponential fits to a m^3h Hodgkin and Huxley model

Time constant values of activation and inactivation kinetics									
τ (ms)									
Activation					Inactivation				
V_m	CNh	n	CTb	n	CNh	n	CTb	n	n
-20	0.35 ± 0.16	7	0.46 ± 0.37	8	n/c		n/c		
-10	0.43 ± 0.2	7	0.44 ± 0.37	8	n/c		n/c		
0	0.34 ± 0.22	7	0.42 ± 0.43	8	27.21 ± 21.5	3	55.3 ± 55.5		4
$+10$	0.35 ± 0.23	7	0.35 ± 0.31	8	37.5 ± 36.5	4	64.1 ± 76.2		7
$+20$	0.36 ± 0.23	9	0.32 ± 0.21	10	101 ± 58	7	56.6 ± 22.4		7
$+30$	0.44 ± 0.27	9	0.31 ± 0.2	11	16.3 ± 89.5	7	79.71 ± 83		7
$+40$	0.46 ± 0.3	9	0.33 ± 0.22	11	62.7 ± 14.3	8	100.5 ± 103.3		8
$+50$	0.42 ± 0.3	9	0.33 ± 0.31	10	65.09 ± 15.7	8	72.2 ± 22.9		8
$+60$	0.38 ± 0.3	8	0.33 ± 0.31	10	69.4 ± 22.1	7	69 ± 32.2		8

For activation, the fitted region was taken from the point immediately following the small capacitive transient, up to the current peak. For inactivation, the fitted region started at the peak of the current and ended at the point corresponding to 80% of the current steady-state value. (n/c non convergent, Corr. Coef. < 0.95). Values are mean \pm SD

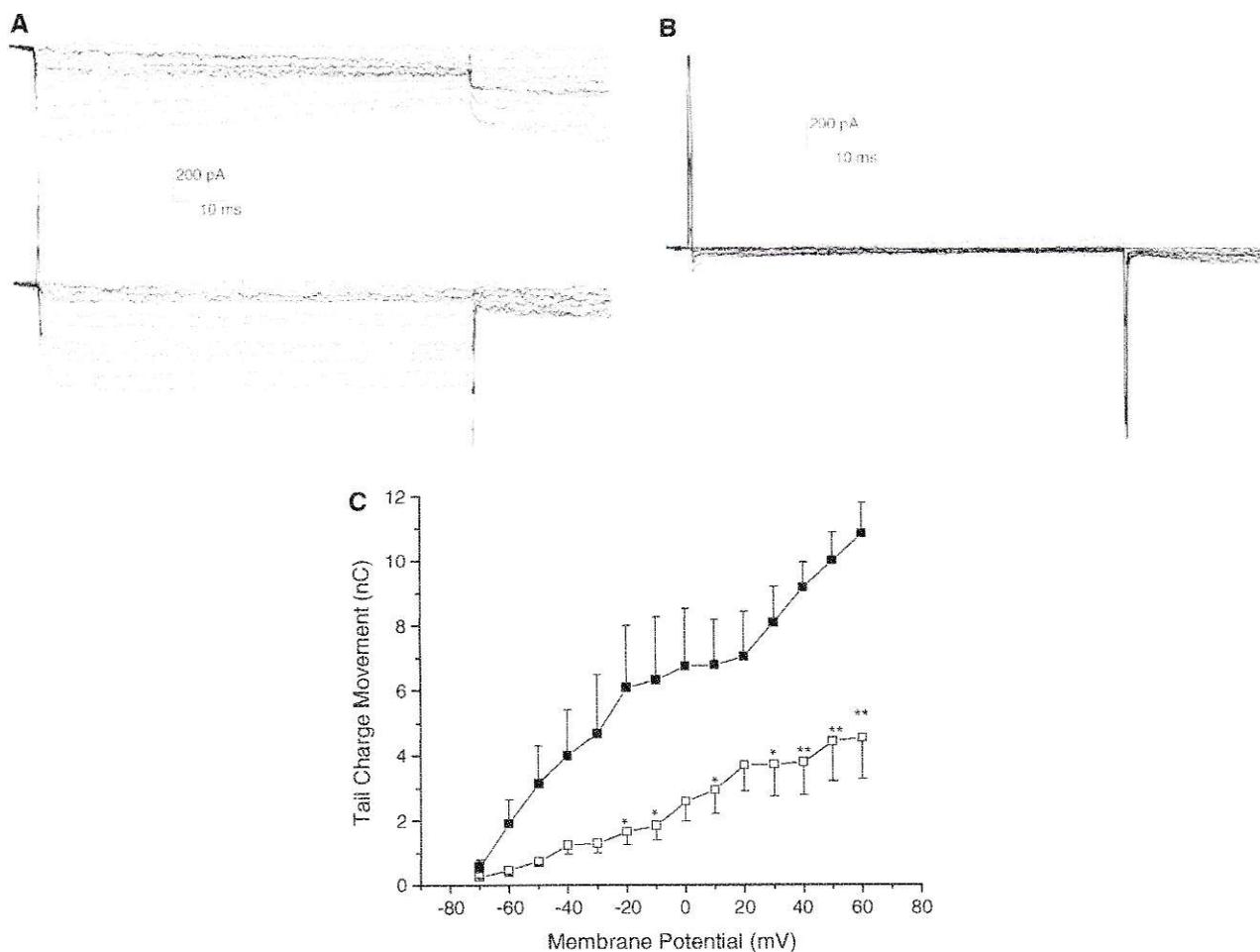


Fig. 5 Role of chloride in tail currents. **a** Representative recordings from CTb cells. The upper figure shows current in presence of TEA-Cl. Note the decrease in the charge movement when TEA-Cl was replaced with TEA-acetate (**a** lower figure). **b** Effect of addition of 1 mM Cd^{2+} to extracellular solution on the Ca^{2+} and tail currents.

c Charge/voltage relation of tail currents registered from CTb cells. Filled squares represent data recorded with 140 mM external TEA-Cl, and open squares recording obtained in the presence of 140 mM external TEA-acetate. Values are mean \pm SEM, $n = 6$ in both conditions, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

1993). A clear explanation as to why external Cl^- reduction would result per se in a reduced tail current is unclear. A tentative explanation could be potential effects of the anion chosen to replace Cl^- (acetate). In this regard, Kenyon and Gibbons (1977) reported that Ca^{2+} ion activity and strength can be compromised by replacement of external Cl^- with a non permeant anion, and that adjustments need to be made to Ca^{2+} concentrations to retain its activity. Further, axotomized neurons show a calcium dependent Cl^- tail current, which could be compromised when Ca^{2+} ion activity is reduced (Sanchez-Vives and Gallego 1994). Further experiments are needed with the application of specific Cl^- blockers such as DITS and niflumic acid, in order to further clarify this situation. Yet, the peak of the inward current during the depolarization pulse is

not compromised in our recordings. This suggests that the increased peak current in the trisomic condition, compared to values of control cells, is preserved in CTb cells.

Another interesting result was presented by Barnes and Bui (1991). These authors, using cultured cone photoreceptor, determined a pH-dependent regulation of chloride tail current via calcium channels, and stated that at a pH level of 7.4 there is a notable increase in this current, which is reportedly large in amplitude and quite persistent in time. Therefore, in our experimental conditions, it is possible that the tail currents are been carried by Cl^- ions as we discussed above, especially considering that our extracellular solution were adjusted precisely to these pH levels.

All these results indicate an abnormal behavior of calcium channels in both CNh and CTb cell line. Hence, this

may not be attributable to intrinsic properties of the trisomic condition, but to the immortalization process. Therefore, all results present here have to be taken carefully and may represent the effect of an immature form of L-type calcium channels, which have been described in other cell lines established with the UCHT1 method (Caviedes et al. 1993; Liberona et al. 1997), and which interestingly exhibit slow inactivation and great sensitivity to nifedipine and to inorganic Ca^{2+} channel blockers. It is plausible that further differentiation may be needed to obtain a full spectra of mature voltage activated channels, a possibility which is currently being investigated. (Caviedes et al. 1993; Liberona et al. 1997). Nevertheless, in the conditions where Cl^- influx is eliminated, peak inward current values are not compromised in our cell lines. This suggests that, even if a Cl^- current may have contaminated the whole cell current when recording in the presence of extracellular Cl^- , their slower kinetics possibly may affect the inactivation phase of the current.

Another interesting finding lies in the values of input resistance encountered in our cell lines, which are roughly 1/10 of those reported by Galdzicki et al. (1998). We have no clear explanation to account for these differences. Yet, our maximal peak Ca^{2+} current values are comparable in magnitude to those of Galdzicki et al., who in turn used substantially higher Ca^{2+} gradients in their experiments (10 mM extracellular vs. 0 mM inside the pipette), suggesting our cell lines have greater overall conductance. Again, further *in vitro* differentiation may contribute in elucidating this situation.

Amazingly, our findings are essentially similar to previous studies on Na^+ currents in cultured dorsal root ganglia neurons from normal and trisomy 21 human neurons (Caviedes et al. 1990). In brief, these authors reported a 10 mV depolarization shift in both TTX-sensitive and TTX-resistant Na^+ current for Ts16 neurons. Even though this entails a comparison between different species, cell types, and ionic currents, it also prompts a tempting speculation regarding the effect of excess gene products or metabolites that could have a common target in the inactivation of diverse voltage sensitive channels, resulting in a similar alteration (Caviedes et al. 1990). In this regard, the gene encoding for the regulator of calcineurin-1 (Rcan1) is present in human autosome 21 and murine autosome 16 (Hattori et al. 2000). This protein exerts a negative regulation on the phosphatase calcineurin, which in turn regulates the α subunit of L-type calcium channels (Armstrong 1989; Oliveria et al. 2007). We have recently determined the overexpression of Rcan1 in our CTb line (Acuña et al. 2011), and we are currently evaluating the effect of knocking down this gene with specific siRNAs, in order to ascertain a possible reversal on the increased Ca^{2+} current density reported here.

Conclusion

The pathophysiology of Down syndrome results from excess gene dosage effects, where the central nervous system remains as the most relevant target. Membrane related dysfunction is critical in neuronal activity and function. Understanding such pathological mechanisms would help link specific gene dosage effects to various neuronal alterations, and help in the quest to determine therapeutical targets. *In vitro* models such as the CTb and CNh cell lines may constitute valuable tools in such endeavors.

Acknowledgments This study was funded by Fondecyt (Chile) grant #1090160, Contingency grant,VID, Univ. of Chile (to PC). MIDEPLAN ICM P05-001-F.

References

- Acevedo LD, Galdzicki Z, McIntosh AR, Rapoport SI (1995) Increased inward current in septal neurons from the trisomy 16 mouse, a model for Down's syndrome. *Brain Res* 701:89–98
- Acuña MA, Noriega J, Pérez-Núñez R, Cárdenas AM, Segura-Aguilar J, Delgado R, Bacigalupo J, Caviedes R, Caviedes P (2011) Overexpressed RCAN1 (regulator of calcineurin 1) underlies alterations in calcium currents in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 mouse, a model of down syndrome. Abstract V. Neurotoxicity Society Meeting, Argentina
- Allen DD, Martín J, Arriagada C, Cárdenas AM, Rapoport SI, Caviedes R, 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
- Armstrong DL (1989) Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca^{2+} -activated phosphatase in mammalian brain. *Trends Neurosci* 12(3):117–122
- Arriagada C, Astorga C, Atwater I, Rojas E, Mears D, Caviedes R, Caviedes P (2007) Endosomal abnormalities related to amyloid precursor protein in cholesterol treated cerebral cortex neuronal cells derived from trisomy 16 mice, an animal model of Down syndrome. *Neurosci Lett* 423(2):172–177
- Ault B, Caviedes P, Rapoport SI (1989) Neurophysiological abnormalities in cultured dorsal root ganglion neurons from the trisomy 16 mouse fetus, a model for Down syndrome. *Brain Res* 485:165–170
- Barnes S, Bui Q (1991) Modulation of calcium-activated chloride current via pH-induced changes of calcium channel properties in cone photoreceptors. *J Neurosci* 17(12):4015–4023
- Cárdenas AM, Rodríguez MP, Cortés MP, Alvarez RM, Wei W, Rapoport SI, Shimahara T, Caviedes R, Caviedes P (1999) Intracellular calcium signals in immortal cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 fetal mice, an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Neuroreport* 10(2):363–369
- Cárdenas AM, Allen DD, Arriagada C, Olivares A, Bennett LB, Caviedes R, Dagnino-Subiabre A, Mendoza IE, Segura-Aguilar J, Rapoport SI, Caviedes P (2002a) Establishment and characterization of immortalized neuronal cell lines derived from the spinal cord of normal and trisomy 16 fetal mice, an animal model of Down syndrome. *J Neurosci Res* 68(2):46–58
- Cárdenas AM, Arriagada C, Allen DD, Caviedes R, Cortés JF, Martín J, Couve E, Rapoport SI, Shimahara T, Caviedes P (2002b) Neuronal cell lines from the hippocampus of the normal and

trisomy 16 mouse fetus (a model for Down syndrome) exhibit neuronal markers, cholinergic function and functional neurotransmitter receptors. *Exp Neurol* 177(1):159–170

- Cataldo AM, Petanceska S, Peterhoff CM, Terio NB, Epstein CJ, Villar A, Carlson EJ, Staufenbiel EJ, Nixon RA (2003) App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *J Neurosci* 23:6788–6792
- Cataldo AM, Petanceska S, Peterhoff CM, Terio NB, Mercken M, Mehta P, Buxbaum J, Haroutunian V, Nixon R (2004) A β localization in abnormal endosomes: association with earliest A β elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging* 25:1263–1272
- Caviedes P, Ault B, Rapoport SI (1990) The role of altered sodium currents in the action potential abnormalities of cultured dorsal root ganglion neurons from trisomy 21 (Down syndrome) human fetuses. *Brain Res* 510:229–236
- Caviedes P, Olivares E, Caviedes R, Jaimovich E (1993) Calcium fluxes, ion currents and dihydropyridine receptors in a newly established cell line from rat heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 25:829–845
- Caviedes P, Caviedes R, Rapoport SI (2006) Altered calcium currents in cultured sensory neurons of normal and trisomy 16 mouse fetuses, an animal model for human trisomy 21 (Down syndrome). *Biol Res* 39:471–481
- Currie KPM, Scott RH (1992) Calcium-activated currents in cultured neurones from rat dorsal root ganglia. *Br J Pharmacol* 106:593–602
- Epstein CJ (1986) The neurobiology of Down syndrome. Raven Press, New York, pp 1–15
- Epstein CJ, Cox DR, Epstein LB (1985) Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome). *Ann N Y Acad Sci* 450:157–168
- Eptein CJ (1986) The consequence of chromosomal imbalance: principles, mechanisms, and models. Cambridge University Press, New York
- Fenwick EM, Marty A, Neher E (1982) Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 331:599–635
- Fiedler J, Rapoport SI, Epstein CJ, Caviedes R, Caviedes P (1994) Altered cholinergic function in cultured neurons from the trisomy 16 mouse fetus, a model for Down syndrome. *Brain Res* 658:27–32
- Fleig A, Penner R (1996) Silent calcium channels generate excessive tail currents and facilitation of calcium currents in rat skeletal myoballs. *J Physiol* 494(1):141–153
- Galdzicki Z, Coan E, Rapoport SI (1993) Cultured hippocampal neurons from trisomy 16 mouse, a model for Down's syndrome, have an abnormal action potential due to a reduced inward sodium current. *Brain Res* 604(1–2):69–78
- Galdzicki Z, Coan E, Rapoport SI, Stoll J (1998) Increased expression of voltage-activated calcium channels in cultured hippocampal neurons from mouse trisomy 16, a model for Down syndrome. *Mol Brain Res* 56:200–206
- Hagiwara S, Byerly L (1981) Calcium channel. *Annu Rev Neurosci* 4:69–125
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth SJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391:85–100
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Groner Y, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Schibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordsiek G, Hornischer K, Brant P, Scharfe M, Schon O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blocker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo ML (2000) Chromosome 21 mapping and sequencing consortium. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405:311–319
- Hille B (2001) Ionic channels of excitable membranes, 3rd edn. Sinauer Press, Sunderland
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol (Lond)* 117:500–544
- Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA (1959) The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet* 1:710
- Johnson RC, Abelson RB (1969) The behavioral competence of mongoloid and non-mongoloid retardates. *Am J Ment Defic* 73:856–857
- Kenyon Gibbons (1977) Effects of low-chloride solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 70:635–660
- Lee KS, Tsien RW (1984) High selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea-pig. *J Physiol* 354:253–272
- Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959) Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med* 143:256–265
- Liberona JL, Caviedes P, Tascón S, Giglio JR, Sampaio SV, Hidalgo J, Caviedes R, Jaimovich E (1997) Expression of ion channels during differentiation of a human skeletal muscle cell line. *J Muscle Res Cell Motil* 18(5):586–598
- Loesch-Mdzewska D (1968) Some aspect of the neurology of Down syndrome. *J Ment Defic* 12:237–244
- Nieminen K, Suárez-Isla B, Rapoport SI (1988) Electrical properties of cultured dorsal root ganglion neurons from normal and trisomy 21 human fetal tissue. *Brain Res* 474:246–254
- Oliveria S, Dell'Acqua M, Sather W (2007) AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls neuronal L-type calcium channel activity and nuclear signaling. *Neuron* 55(2):261–275
- Oster-Granite ML (1986) The neurobiological consequences of autosomal trisomy in mice and men. *Brain Res Bull* 16:767–771
- Rojas G, Cárdenas AM, Fernández-Olivares P, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes R, Caviedes P (2008) Effect of APP knockdown on intracellular calcium increases in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 mouse, an animal model of Down syndrome. *Exp Neurol* 209:234–242
- Sanchez-Vives M, Gallego R (1994) Calcium-dependent chloride current induced by axotomy in rat sympathetic neurons. *J Physiol* 475.3:394–400
- Saud K, Arriagada C, Cárdenas AM, Shimahara T, Allen DD, Caviedes R, Caviedes P (2006) Neuronal dysfunction in Down syndrome: contribution of neuronal models in cell culture. *J Physiol (Paris)* 99:201–210
- Schapiro MB, Ball MJ, Grady CL, Haxby JV, Kaye JA, Rapoport SI (1988) Dementia in Down syndrome: cerebral glucose utilization, neuropsychological assessment and neuropathology. *Neurology* 28:938–942
- Schuchmann S, Müller W, Heinemann U (1998) Altered Ca²⁺ signaling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *J Neurosci* 18:7216–7231
- Scott BS, Becker LE, Petit TL (1983) Neurobiology of Down's syndrome. *Prog Neurobiol* 21:199–237