



**Universidad de Chile**

**Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas**

**Efecto de la Normalización de la Expresión del Transportador  
Na<sup>+</sup>/Mioinositol SMIT1 sobre la función colinérgica de una  
Línea Celular Neuronal derivada de Corteza Cerebral de la  
Trisomía 16 Murina (modelo del Síndrome de Down humano)**

**Ignacio Díaz Franulič**

**Tesis para optar al título profesional de Bioquímico**

**Director de Tesis: Dr. Pablo Caviedes**

**Profesora patrocinante: Dra. María Antonieta Valenzuela**

**Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, ICBM, Facultad de  
Medicina, Universidad de Chile**

*Dedicado a mis Padres, Hermanos,  
Abuelos y tía Olimpia.*

# Agradecimientos

- Al doctor Pablo Caviedes y a su padre, el doctor Raúl Caviedes; por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y con ello redescubrir mi interés por la ciencia.
- A Karina por su apoyo y comprensión durante estos años.
- Finalmente, agradezco a todo el equipo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos; especialmente a don Fernando Guzmán, Adriana Armijo y Cristian Arriagada, quienes con su simpatía y conocimientos contribuyeron enormemente a la realización de este trabajo.

*Esta Tesis fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1040862 y por la Fundación Jerome Lejeune.*

## INDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1.- ANTECEDENTES	12
1.1- Introducción	12
1.2- Trisomía 16 murina	14
1.3- Líneas Celulares	16
1.4- Función Colinérgica	17
1.5- Cotransportador de Na <sup>+</sup> /Mioinositol	19
1.6- ¿Cómo revertir la sobreexpresión? RNA Antisentido	22
2.0- HIPOTESIS	24
3.0- OBJETIVOS	24
3.1- Objetivos generales	24
3.2-Objetivos específicos	24
3.0- METODOLOGIA	25
3.1- Modelos Experimentales	26

3.2- Cultivo celular	26
3.3- Oligonucleótidos de antisentido	28
3.4- Western Blot	27
3.5- Estudios Colinérgicos	29
3.6- Estadísticas	30
4.0- RESULTADOS	31
4.1- Normalización de la expresión de SMIT1	31
4.2- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb revierte el déficit en la Incorporación de Colina	34
4.3- Liberación Fraccional de Acetilcolina	38
5.3.1-La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb aumenta la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta a la estimulación con Nicotina	38
5.3.2- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb aumenta la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta a la estimulación con Muscarina	39
5.3.3- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb no tiene efectos la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta a la Despolarización inducida por KCl	41

5.3.4-	La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb no tiene efectos la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta al estímulo con Glutamato	42
5.0-	DISCUSIONES	44
5.1-	Incorporacion de [H-3] Colina	45
5.2-	Efecto del Knockdown sobre la Liberación Fraccional de Acetilcolina	47
6.2.1-	Estimulación con Nicotina	47
6.2.2-	Estimulación con Muscarina	52
6.2.3-	Despolarización inducida por KCl	59
6.2.4-	Estimulación con Glutamato	61
7.0-	ESQUEMAFINAL	64
8.0-	CONCLUSIONES	65
9.0-	BIBLIOGRAFIA	67

## ABREVIATURAS

- AA: Acido Araquidónico
- AChE: Acetil Colinesterasa
- ASO's: Oligonucléotidos Antisentido
- BCA: Acido Bicinconínico
- BSA: Albúmina Sérica Bovina
- cAMP: Adenosina monofosfato cíclico
- Ca<sup>+2</sup>/CaM: Complejo Calcio Calmodulina
- CHT: Transportador de Colina (Choline Transporter)
- ChAT: Colina Acetiltransferasa
- CTb: Línea celular derivada de corteza central de ratón trisómico
- CNh: Línea celular derivada de corteza central de ratón normal
- DAG: Diacilglicerol
- HRP: Horseradish Peroxidase
- IP<sub>3</sub>: Inositol Trifosfato
- IC: Incorporación de Colina
- KCl: Cloruro de Potasio
- MI: Mioinositol
- LF: Liberación Fraccional de acetilcolina
- mRNA: RNA mensajero
- PI: Fosfatidilinositol
- PIP<sub>2</sub>: Fosfatidil Inositol Bifosfato
- PKC: Proteína Quinasa C
- PKA: Proteína Quinasa A

- PLC: Fosfolipasa C
- PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
- SD: Síndrome de Down
- SDS: Dodecil Sulfato de Sodio
- Slc5a3: Gen que codifica para la proteína SMIT-1
- SMIT1: Sodium Myo-Inositol Transporter 1
- SNC: Sistema Nervioso Central:
- VDCC: Canales de Calcio Dependientes de Voltaje

## RESUMEN

El Síndrome de Down (SD) se determina por la trisomía del autosoma 21 humano, y sus alteraciones se asocian a sobreexpresión o bien desregulación de los productos génicos derivados de este cromosoma. La trisomía 16 (Ts16) murina es un modelo animal de este síndrome, debido a la gran homología entre los cromosomas humano y murino correspondiente. Desafortunadamente, la condición en el modelo murino no es viable. Frente a esto se han generado líneas celulares inmortalizadas derivadas de corteza de ratón normal y trisómico 16, denominadas CNh y CTb respectivamente. Estas líneas celulares sobreexpresan genes relacionados con el SD y muestran función colinérgica alterada (menor incorporación de colina de alta afinidad (IC), expresión de la acetilcolintransferasa (ChAT) y liberación fraccional de acetilcolina (LF) frente a una estimulación), similares a las previamente encontradas en cultivos primarios de corteza Ts16. También se han encontrado elevados niveles de Mioinositol en pacientes con SD, lo cual estar relacionado con la sobreexpresión del Transportador  $\text{Na}^+$ /Mioinositol SMIT1, cuyo gen se encuentra ubicado en cromosoma 16 murino. Con el objeto de dilucidar la participación de SMIT1 en la disfunción colinérgica descrita anteriormente, decidimos reducir la expresión de SMIT1 transfectando las células con secuencias de antisentido específicos para mRNA en nuestras líneas celulares derivadas de corteza cerebral de Ts16 (CTb) comparadas con la línea derivada de un animal normal (CNh). Posterior a la transfección, estudios de Western Blot (WB) mostraron una reducción en la expresión de SMIT1 en 10%, 40%, y 42% a 24, 48 y

72 horas respectivamente, comparadas con niveles de SMIT1 en cultivos de las líneas celulares trisómicas CTb sin transfectar (n=6 p<0,01). Una vez normalizada la expresión de SMIT1, estudiamos la IC en CTb y CNh, encontrando que la línea CTb exhibe una reducción en la IC de un 80%, 85% y a 2 y 5 minutos de incubación con 1µCi de [<sup>3</sup>H]-colina respectivamente, comparada con CNh. A 72 horas post-transfección los niveles en la IC fueron esencialmente similares en ambos tipos celulares. Finalmente, la LF, la cual está reducida en CTb comparada con CNh después de una despolarización generada por glutamato, nicotina, muscarina y KCl, muestra un progresivo incremento después del Knockdown del SMIT al ser estimulada con nicotina y muscarina, mostrando valores similares a CNh después de 48 horas post-transfección. Sin embargo, al inducir despolarización con KCl y estimular con Glutamato extracelular, las líneas CTB transfectadas no exhibieron diferencias con respecto a la línea celular trisómica CTb sin transfectar.

Los resultados sugieren que la normalización en la expresión de SMIT1 en la línea CTb mediante la transfección con oligonucleótidos antisentido revierten: 1) la reducción de la incorporación de <sup>3</sup>H colina, y 2) el déficit en la liberación de acetilcolina frente a agonistas Colinérgicos (Nicotina y Muscarina). Los resultados pueden constituir un punto de partida para el diseño de una terapia farmacológica que apunte a recuperar las funciones cognitivas, en particular las relacionados con sistemas colinérgicos, en pacientes con SD.

## ABSTRACT

Down's Syndrome (DS) is determined by the trisomy of autosome 21, and the condition exhibits alterations associated with excess gene products. Murine trisomy 16 is an animal model of the human condition, due to the great homology between both human and murine chromosomes. However, trisomy 16 in mice is inviable. To overcome this limitation, we used generated cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice, named CNh and CTb respectively. Among the genes present in the chromosome 21, we find the Sodium-Myo Inositol Transporter 1 (SMIT1). CTb cells show altered cholinergic function (reduced high affinity choline uptake, ChAT expression and fractional choline release after stimulation). Due to evidence of high levels of myo-inositol in Ts16 brain, we decided to reduce SMIT1 expression using specific mRNA antisense sequences in the CTb cell line, compared to the CNh line, derived from a normal animal. After transfection, Western blot studies showed knockdown of SMIT1 expression by 10% (24 hr), 40% (48 hr) and 42% (72 hr) . Upon achieving these reduced SMIT-1 levels, we studied [<sup>3</sup>H]-choline uptake in CTb and CNh cells. CTb, as previously reported, expressed reduced choline uptake compared to CNh cells ( 80% and 85% reduction at 2 and 5 min incubation, respectively). At 72 hr of SMIT1 knockdown, choline uptake levels were essentially similar in both cell types. Further, fractional release of [<sup>3</sup>H]-choline in response to nicotine , muscarine , which is reduced in CTb cells compared to CNh, showed a progressive increase after SMIT1 knockdown, reaching values similar to those of CNh after

48 hr of transfection. The SMIT1 knockdown had no effect in glutamate stimulation and KCl-induced depolarization had no effect on acetylcholine fractional release. The results suggest that SMIT1 overexpression in CTb cells contributes to impaired cholinergic function, and that gene knockdown in this cells line is a relevant tool to study DS-related dysfunction.

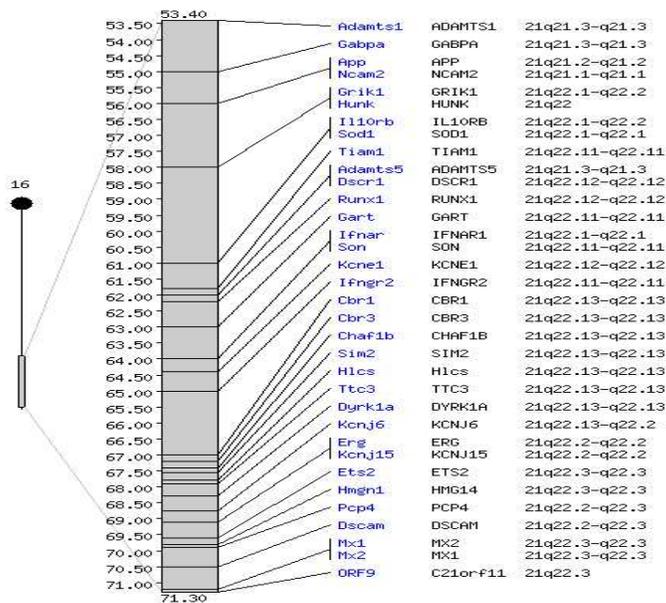
## **ANTECEDENTES**

### **1) Introducción**

La aneuploidia es una condición adversa para el desarrollo, y generalmente resulta en la muerte *in utero* (Epstein, 1986a). En el caso de las trisomías, la alteración de la homeostasis esta determinada por un incremento del material genético y los consecuentes efectos de un exceso en la dosis génica (Epstein, 1986b. En humanos, la causa de retardo mental más conocida que sobrevive la gestación es la trisomía del cromosoma 21 o Síndrome de Down (SD). El SD tiene una incidencia de 1 por cada 800 nacidos vivos (Reeves y cols,1986), y representa el 30% de todos los casos de retardo mental relacionado con causas genética, desde leve a severo (Pulsifer, MB, 1996).

El cromosoma 21 humano fue el primer cromosoma humano en ser completamente secuenciado (Hattori, M. y cols, 2000), identificándose 127 genes, más otros 98 posibles nuevos genes, todos los cuales podrían estar sobreexpresados (Epstein, CJ, 1986a). Actualmente se sabe que para el desarrollo del SD requiere de al menos la presencia de una

porción definida del cromosoma 21 (bandas 21q22.1a cuarta), denominada región crítica del SD. Claramente, el síndrome no está determinado por mutaciones, deleciones o una patología connatal, sino que consiste en un exceso de productos génicos normales. Sin embargo, las implicancias específicas en cuanto a la función a nivel celular derivadas de esta sobreexpresión generalizada aún permanecen desconocidas.



**Figura 1: Homología cromosómica entre el cromosoma 16 murino (MMU16) y el cromosoma 21 humano (HSA21).** Se señalan los genes homólogos presentes y la ubicación de estos en el cromosoma 21 humano. (The Jackson Laboratory).

## 1.1) Trisomía 16 Murina

Existen problemas éticos y prácticos en la obtención y mantención de tejidos humanos para llevar a cabo estudios fisiopatológicos en cualquier alteración genética. Afortunadamente, existe un modelo animal de la trisomía 21 humana, la cual es la trisomía 16 murina (Ts16), cuyo cromosoma triplicado presenta una gran homología genotípica con la condición humana (Epstein y cols, 1985).

Con el objeto de estudiar las anomalías observadas en condición trisómica humana se han desarrollado trisomías parciales (Davisson y cols, 1990 y 1993; Sago y cols, 1998) las cuales tienen una copia extra de segmentos que comprenden partes de la llamada región crítica del SD en el cromosoma 16 debido a la inviabilidad de la condición trisómica completa, puesto que los fetos de ratón trisómico mueren al día 15 de gestación

El problema en la utilización de modelos de trisomía parcial radica en hecho de 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 posible sobreexpresión generalizada (Mao y cols, 2003) determina una nueva “homeostasis”, siendo determinante la región crítica de SD del cromosoma 21 humano o alternativamente cromosoma 16 murino.

Usando cultivos de neuronas de la trisomía 16 completa, varios grupos han descrito esencialmente las mismas alteraciones electrofisiológicas halladas en la condición humana (Nieminen y cols, 1988; Caviedes y cols, 1990) en compañía de corrientes de  $Ca^{2+}$  y función colinérgica central alteradas (Fiedler y cols, 1994). Aquellos resultados han

validado el modelo animal para la fisiopatología del SD. De hecho, 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, según lo descrito en el septum, medula espinal y neuronas ganglionares para los cuales se ha visto un acortamiento en la duración de la espiga) (Ault y cols, 1989; Acevedo y cols 1995) ,una mayor densidad de corrientes de  $\text{Na}^+$  (Orozco y cols, 1988) y una reducción en las corrientes de  $\text{Ca}^{+2}$  de tipo L (Caviedes y cols., 2006). La situación inversa se presenta en cultivos de neuronas trisómicas de Hipocampo(Galdzicki y cols.,1993, 1998) .En tanto, los estudios de función colinérgica en neuronas de la médula espinal mostraron que las células Ts16 tienen una menor afinidad en la captación de Colina ( $\text{Na}^+$ -dependiente, sensible a hemicolinio-3) en ambos territorios, en comparación con las células control. A su vez, la liberación fraccional de Colina está disminuida en cultivos trisómicos de cerebro, mientras que la médula espinal no presenta diferencias entre las dos condiciones (Fiedler y cols., 1994).

Los hallazgos descritos anteriormente refuerzan la idea que la trisomía tanto humana como murina determina efectos diferentes relacionados a la membrana celular y en distintas áreas del CNS.

## 1.2) Líneas Celulares

Debido a la importancia de evaluar la contribución individual de los genes sobreexpresados en la Trisomía 16 murina como modelo de Síndrome de Down, y para superar la limitante de la inviabilidad del modelo murino, 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 sistema de transformación mediado por factores solubles presentes en el medio condicionado de la línea celular UCHT1, lo cual induce transformación celular estable en periodos de tiempos variables. La línea celular derivada de corteza cerebral de ratón trisómico 16 (CTb), presenta un aumento del calcio intracelular basal y respuestas alteradas a estimulación de receptores de Glutamato, posiblemente debido a la alteración de los mecanismos reguladores del calcio citosólico (Cárdenas y cols. 1999).

Además la línea celular cortical trisómica 16 CTb presenta alteraciones en la función colinérgica, reflejado en la disminución de los niveles de la enzima acetilcolintransferasa (ChAT), menor incorporación de Colina y una deficiente liberación de acetilcolina en respuesta a agonistas (Allen y cols. 2000), comparable a lo observado en cultivos primarios del mismo origen (Fiedler y cols. 1994). También se han descrito anomalías en las vías que involucran la Proteína Kinasa A (PKA) y C (PKC) (Rapoportt and Gadzicki, 1994), las cuales podrían estar relacionadas a los elevados niveles de Mioinositol en los cerebros trisómicos (Shetty y cols, 1996; L Huang y cols, 1999).

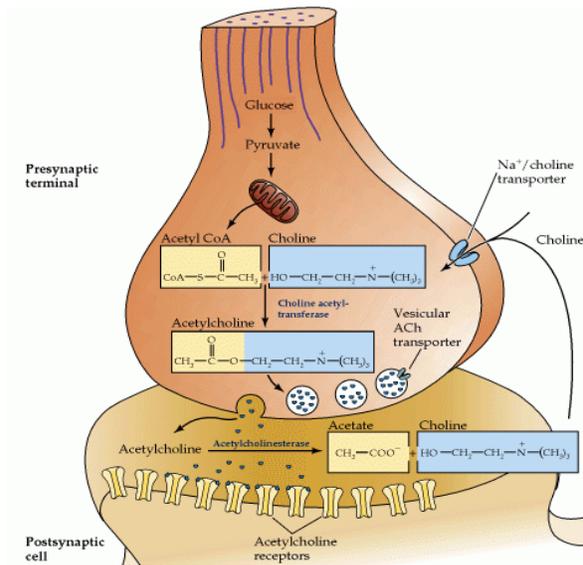
Estas líneas celulares neuronales derivadas de corteza cerebral murina tanto trisómica (CTb) como Normal (CNh) serán nuestro modelo de estudio en la normalización de la expresión del Transportador Na<sup>+</sup> / Mioinositol SMIT-1 y su relación con la Disfunción Colinérgica en la Trisomía 16 Murina como modelo de Síndrome de Down.

### **1.3) Función Colinérgica**

Las neuronas colinérgicas tienen un rol esencial tanto en el Sistema Nervioso Central como Periférico y han sido implicadas en importantes procesos tales como atención, memoria, sueño y otras funciones cognitivas. (Winkler et al., 1995; Sarter and Parikh 2005). El rol crucial del Sistema Colinérgico en la mediación de procesos cognitivos fue inicialmente ilustrado por estudios en los cuales el uso de antagonistas de Receptores Muscarínicos, tales como Scopolamina o Atropina producen la alteración de las capacidades cognitivas en humanos y animales (Deusch J A, 1971)

El neurotransmisor acetilcolina es sintetizado en el citoplasma de las neuronas colinérgicas a partir de colina y Acetil-CoenzimaA por la enzima Colina Acetiltransferasa (ChAT)(Collier y cols 1972) para luego ser transportado hacia el interior de las vesículas sinápticas por el Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT) (Bravo y cols, 2004). Luego de ser liberado al espacio intersináptico en respuesta a una despolarización la acetilcolina es rápidamente hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), y la colina resultante de este proceso es recuperada hacia los terminales presinápticos por medio

de dos sistemas de transporte activo ( Tucek y cols, 1985), uno de baja afinidad, Na<sup>+</sup> independiente y uno de alta afinidad Na<sup>+</sup>-dependiente sensible a hemicolinio-3 (figura 2) que predomina en neuronas Colinérgicas ( Vickroy y cols, 1985; Misawa y cols, 2001; Kobayashi ) y se ha demostrado su importancia en la neurotransmisión ya que el knockout de el gen que codifica CHT en ratones se traduce en la inviabilidad de la condición (Ferguson y cols, 2004)



**Figura 2 .Metabolismo de Acetilcolina en los terminales sinápticos.** La síntesis de Acetilcolina desde Colina y Acetil CoA requiere Colina Acetiltransferasa. Acetyl CoA proviene del Piruvato generado por la Glicolisis mientras que la Colina es transportada por el transportador de Alta Afinidad Na<sup>+</sup> dependiente. Después de su liberación al espacio intersináptico Acetilcolina es rápidamente degradada por la enzima Acetilcolinesterasa (Neuroscience, Purves, Dale y cols, Sinauer Associates, Inc. c2001 imagen descargada del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.)

Las señales intracelulares mediadas por acetilcolina ocurren a través de dos clases de receptores, los cuales han sido farmacológicamente clasificados como nicotínicos y muscarínicos debido a que son activados diferencialmente por dichos agonistas. Estos receptores actúan a través de dos mecanismos totalmente distintos; ya mientras el receptor nicotínico es un canal iónico activado por ligando, el receptor muscarínico ejerce su efecto acoplado a proteína G que a su vez es capaz de activar a la PLC (y así estimular la producción de IP3 y DAG) o bien inhibir a la adenilato ciclasa y reducir con ello los niveles de cAMP; la activación de una u otra vía depende del subtipo de receptor muscarínico en cuestión.

#### **1.4) Cotransportador de Na<sup>+</sup> / Mioinositol SMIT-1**

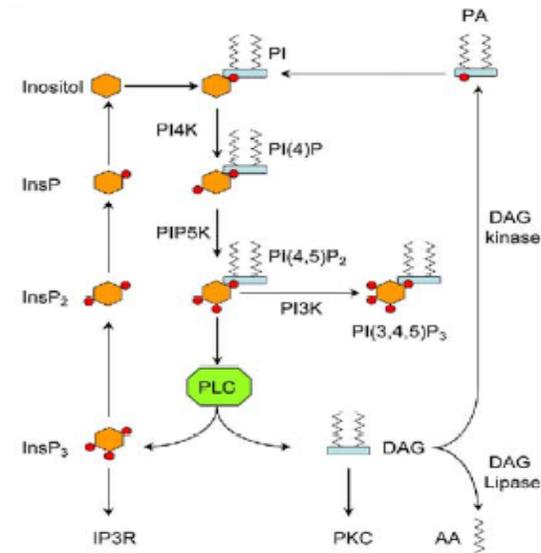
La evaluación de cualquier terapia en el SD requiere la definición precisa de las alteraciones multisistémicas y su relación específica con la trisomía en si misma. Por lo tanto, el conocimiento de la acción de los genes localizados específicamente entre las bandas 21q22.1 a cuarta del cromosoma 21 es de gran importancia. En este sentido, la región que se extiende desde D21S17 a ETS2, y que comprende aproximadamente 5Mbases, ha sido asociada con retardo mental y otras características de SD (Dahmane y cols, 1995; Rahmani y cols, 1989). Esta región ha sido progresivamente acotada hasta llegar a una comprendida entre D21S55 y Mx1 (Delabar y cols., 1993) y mas recientemente

hasta la región de CBR-ERG (Crete y cols., 1993; Dahmane y cols., 1998).

Sin embargo, no existe evidencia para excluir la participación de genes localizados fuera de la región D21S55 (Korembert y cols., 1994), lo cual refuerza el concepto de cooperatividad génica en este síndrome, y que la sobreexpresión de un solo gen en particular no puede ser responsable de generar toda la condición (Epstein y cols., 1991; Koremberg y cols., 1994).

El porque estudiar la sobreexpresión de SMIT1 en nuestro modelo radica en la importancia del mioinositol (MI) en los distintos procesos celulares. Por una parte, el MI es un osmolito orgánico, y su nivel se incrementa cuando las células están bajo un ambiente hipertónico (Thurston, y cols, 1989), pero también es el precursor de el fosfatidil Inositol (PI) y 4,5 fosfatidilinositol fosfato (PIP2), el cual participa en el ciclo de los fosfoinositideos.

El PIP3 es hidrolizado por la PLC para producir dos importantes moléculas de transducción de señales (Berridge y cols, 1988; Nitshizuka y cols., 1989 ), el Inositol- (1,4,5) Trifosfato (IP3), el cual provoca la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular almacenado en el Retículo Endoplásmico (RE) y que regula la función de varias proteínas kinasas y fosfatasas y el DAG, un activador de la PKC que además es sustrato de la DAG lipasa para la producción de Ácido Araquidónico (AA) ( Figura 3)



**Figura 3. Metabolismo del Inositol.** Al ser incorporado a la célula a través del Transportador Na<sup>+</sup>/Mioinositol, el Inositol es sucesivamente fosforilado hasta convertirse en Fosfatidilinositol Bifosfato PIP<sub>2</sub>, el cual sirve de sustrato a la Fosfolipasa C para dar origen a Fosfatidilinositol Trisfosfato PIP<sub>3</sub> y Diacilglicerol DAG. PIP<sub>3</sub> se une a receptores ubicados en la Membrana del Retículo Endoplasmático para producir la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde este y DAG es el principal activador de la Proteína Kinasas C, además de dar origen al Ácido Araquidónico mediante la acción de la DAG Lipasa. El DAG no utilizado es fosforilado para entrar nuevamente en el ciclo. Delmas y cols,2005

El MI celular se origina de 3 formas: su síntesis de novo desde Glucosa por medio de de la Mioinositol-1-fosfato sintasa (Geiger JH, 2006) y MI monofosfatasa (Gee NS,1988); reciclando el Fosfatidilinositol, y a través de su captación desde el medio extracelular, lo cual se produce a través de transportadores asociados a membrana

Se cree que el mayor transportador de MI dentro del Sistema Nervioso Central es SMIT-1 (Sodium dependent Myo-inositol cotransporter-1) (Berry G. T,2003), el cual aprovecha el gradiente electroquímico existente a través de la membrana para incorporar MI con dos

moléculas de  $\text{Na}^+$  por cada una de MI (Hager y cols. 1995). SMIT-1 es también denominado Slc5a3, debido a que es el tercer miembro de la familia de cotransportadores de  $\text{Na}^+$  / Glucosa Slc5. El gen que codifica para SMIT-1 está localizado, en el ratón, en la región telomérica del cromosoma 16, sinténica a la región humana 21q22 (Chau y cols. 2005).

### **1.5) Cómo revertir la Sobreexpresión: RNA antisentido**

Para entender el efecto individual de cada gen sobreexpresado estos deben ser evaluados en el contexto de la trisomía completa, determinando así la contribución relativa de cada gen específico a la condición general, en el contexto de una potencial sobreexpresión generalizada de la región SD del cromosoma 21o alternativamente el 16 murino

Nosotros proponemos como estrategia estudiar el efecto de los genes candidatos para las disfunciones de membrana mencionadas en los párrafos anteriores, y de Slc5a3 para este proyecto en particular mediante la disminución de la expresión de éste gen hasta llevarlo a sus niveles normales. Para esto se emplea un procedimiento conocido como *knockdown*, el cual consiste en normalizar la expresión de un gen de interés mediante el uso de secuencias específicas de RNA antisentido (AS) (Estibeiro y Godfray, 2002). Esta técnica está basada en el uso de secuencias de ácidos nucleicos, fabricadas específicamente para hibridizar el mRNA del gen cuya expresión se quiere normalizar. Estos oligonucleótidos están tratados

con grupos sulfuros para generar fosforotioatos (S-ODN) con el objeto de mejorar su solubilidad e incrementar su resistencia a RNasas y así extender su efecto en el tiempo (Peng Ho, S. y cols., 1998). Una vez hibridizado con el mRNA blanco se previene su traducción y el contenido de proteína disminuye progresivamente en función de su catabolismo, lo que define el concepto de knockdown (Estibeiro y Gofray, 2001). Una vez que los niveles de proteína sean similares a los normales es posible evaluar cambios en las funciones celulares que aparecen alteradas, como la función colinérgica en este caso.

## **2) HIPÓTESIS**

La sobreexpresión de Slc5a3 (SMIT-1) reduce la incorporación y liberación fraccional de  $^3\text{H}$  - Colina en las células derivadas de la corteza cerebral de los fetos murinos trisómicos para el cromosoma 16 (CTb). Por tanto, la normalización de la expresión de este gen revertirá estas anomalías total o parcialmente.

## **3) OBJETIVOS**

### **3.1) OBJETIVO GENERAL**

- 1- Normalizar la sobreexpresión de Slc5a3 en las líneas celulares trisómicas derivadas de la corteza cerebral de fetos murinos trisómicos para el cromosoma 16 (CTb).
- 2- Estudiar el efecto que tiene la normalización de la expresión de Slc5a3(SMIT-1) en la función Colinérgica de la Línea celular derivada de corteza cerebral de fetos murinos Trisómicos (CTb) , específicamente en la incorporación de Colina de Alta Afinidad y la Liberación de Acetilcolina en Respuesta Agonistas Colinérgicos.

### **3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Transfección de células CTb con los oligonucleótidos específicos para el mRNA de Slc5a3
- 2- Producir normalización de la sobreexpresión de Slc5a3 por medio de la técnica Western Blot, comparando con aquella de la línea de corteza de ratón normal, CNh.
- 3- Comparar la incorporación de 3[H]- Colina en las líneas celulares de corteza cerebral Normales CNh y Trisómicas CTb.
- 4- Comparar la liberación fraccional de 3[H] - Acetilcolina inducida por K<sup>+</sup> extracelular, nicotina, glutamato y muscarina en ambas líneas celulares.
- 5- Correlacionar el efecto de Knockdown de Slc5a3 con la incorporación y liberación fraccional de 3[H] - Colina en líneas celulares trisómicas derivadas de corteza cerebral de fetos murinos (CTb).

## **4.0- METODOLOGIA**

### **4.1- 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 receptores funcionales y poseen función colinérgica. Las líneas trisómicas reproducen las disfunciones colinérgicas propias de la Trisomía 16 murina (Fiedler y cols, 1994)

### **4.2- CULTIVO CELULAR**

Las células fueron cultivadas en placas de Petri, usando un medio de cultivo compuesto de:DMEM/HAM12(Sigma CO.,St. Louis,MO),el cual fue suplementado con 6g/L de Glucosa, 1g/L de Bicarbonato, 10%V/V de Sueros Bovino Adulto y 5% de Suero Bovino Fetal. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora equipada con camisa de agua, a una temperatura de 37°C, 100% de humedad y en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, siendo renovados los medios de cultivos dos veces por semana.

#### 4.3- WESTERN BLOT

La extracción de proteínas se realizó mediante lisis, usando un buffer compuesto de: 150mm NaCl, Tris Ph 8. Edta 2mM, 1% Triton, y 0.1% de dodecil sulfato de sodio(SDS), además de los siguientes inhibidores de proteasas: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) (1mM) y leupeptina (10mg/mL). El contenido total de proteínas fue determinado por el método del ácido bicinónico (BCA). 20 mg. de proteína fueron sometidos a electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 12%, para ser transferidas a membranas de nitrocelulosa. Para evitar la unión no específica la membrana se efectuó un bloqueo con 5 % BSA (Albúmina sérica de bovino) en un tampón salino de TRIS por 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos específicos para SMIT-1 con una dilución 1:1000 (Chicken Anti-SLC5A3, Genetel Laboratories LLC, Madison, WI., EEUU) los cuales fueron detectados con un segundo anticuerpo diluido 1:2000 (anti-chicken IgY biotinilado; chicken Anti-SLC5A3, Genetel Laboratories LLC, Madison, WI USA), el cual fue posteriormente reconocido con un conjugado Avidina –HRP con una dilución de 1:1000 (Pierce, Rockford, IL EEUU). Los geles fueron fotografiados y la densidad de las bandas medidas con el programa Image J (software de uso libre desarrollado por Wayne Rasband ([wayne@codon.nih.gov](mailto: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 fue normalizada con la intensidad obtenida de las bandas correspondientes a la proteína  $\beta$ -Tubulina, la cual fue también detectada por la Técnica de Western Blot (Anti-Mouse  $\beta$ -Tubulina, Sigma, Saint Louis, MI, EEUU). Esto dio como

resultado la cantidad relativa de la proteína SMIT1 presente en las líneas celulares CTb (Trisómicas), CNh (Normales) y Trisómicas CTb Transfectadas con el oligonucleótido antisentido para SMIT-1 a las 24, 48 y 72 horas post transfección.

#### **4.4- OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO**

Se emplearon Oligonucleótidos Antisentido modificados con Fosforotioatos (ASOs), los cuales presentan una solubilidad optima y baja toxicidad (Estibeiro y Godfray,2001).

La Secuencia Antisentido empleada para disminuir la expresión del gen Slc5a3 mediante la hibridación de esta con el mRNA producto de ese gen, que codifica la proteína SMIT-1 tenía las siguiente composición de nucleótidos

**AS-Slc5a3: 5'-TACGGCAATGTCTGCTGCCT -3**

Ésta secuencia de oligonucleótidos está diseñada para hibridar con una región específica del mRNA que codifica para la proteína SMIT1, de tal forma que al unirse a éste mRNA impide su traducción por parte del Ribosoma, produciendo el efecto de Knockdown que buscamos.

Con el objeto de asegurar que el efecto de knockdown sobre la expresión del gen Slc5a3 se debe única y exclusivamente a la hibridación del oligonucleótido antisentido específico descrito anteriormente con la secuencia target dentro del mRNA producto del gen Slc5a3 es que se realizó la transfección de las células de corteza cerebral trisómicas CTb con un oligonucleótido antisentido que presenta la misma composición de oligonucleótidos que el

antisentido específico AS-Slc5a3, con la diferencia que en este último, denominado *Scrambled*, los nucleótidos que lo componen están distribuidos al azar, razón por la cual no hibridizan con el mRNA de SMIT1 y por lo tanto no deben producir ningún efecto en los niveles de esta proteína, tal como se puede apreciar en la sección de Resultados.

**Scrambled: 5'-GCTCTGCTGCTCATAGCTAG-3'**

La producción de ASOs fue realizada por Sigma –Proligo (Saint Louis, MO, EEUU). Para incorporar las secuencias al interior de la célula se emplearon liposomas catiónicos (LipofectAmine, Life Sciences Technologies, Inc) en una concentración de 8 mg/mL por 5 horas (Tu y cols, 1998). Subsecuentemente, se determinaron los niveles de SMIT-1 a diferentes tiempos mediante WB, para realizar una comparación entre células normales y trisómicas. Esto permitió saber cual es tiempo requerido para efectuar la normalizar la sobreexpresión del gen Slc5a3.

#### **4.5- ESTUDIOS COLINÉRGICOS**

Se determinó la captación de Colina Triteriada (3H-Colina) sensible a Hemicolinio-3 en incubaciones de 2 y 5 minutos según el protocolo descrito por Fiedler y cols (1994). Las fracciones extracelulares fueron recolectadas en un baño externo y la fracción intracelular fue obtenida mediante la disrupción de la membrana con SDS 0,1%; ambas muestras fueron guardadas para determinación de proteínas. La Radiactividad de ambas fracciones fue medida por un contador de centelleo líquido. La captación fue medida en base a la función:

$$U^{3\text{H-C}} = [\text{IC (dpm)/0.9}]/[\text{EC (dpm)/0.05}]/\text{mg Prot (Allen y cols, 2000)}$$

Donde  $U^{3\text{H-C}}$  es la captación de Colina (expresada como volumen de distribución), IC y EC son las fracciones intra y extracelular, respectivamente. Para estudios de liberación fraccional, las células fueron cargadas con  $1\mu\text{M } ^3\text{H-Colina}$  (Perkin-Elmer, Boston, MA 02118, USA) por 30 minutos, y el eflujo basal fue determinado por la medición de la radiactividad en el medio extracelular tomada a los tiempos de 1, 3, 6 y 9 minutos. A los 10 minutos se aplicó el estímulo externo, a los 11 el medio fue recolectado y las células fueron lisadas para obtener las fracciones intra y extracelulares, las cuales fueron depositadas en 10 mL de Líquido de Centelleo (3,9 g/L de 2,5 Difenil Oxazol (PPO) y 0,8 g/L de 1,4-bis 2,5 Fenil Oxazol Benceno (POPOP) disueltos en Tolueno), el cual tiene por objeto amplificar las emisiones  $\alpha$  del Tritio, permitiendo su detección en el contador. El tiempo de conteo por muestra fue de 5 minutos debido a la inestabilidad en la emisión por parte de isótopos de baja actividad como el Tritio.

#### **4.6- ESTADÍSTICAS**

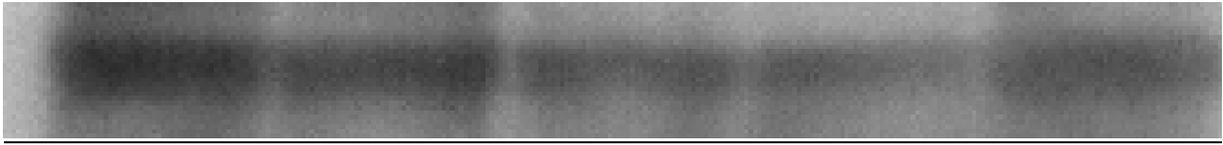
La significancia estadística fue determinada mediante el análisis de varianza ANOVA y t-Student para comparaciones individuales, asumiendo que las diferencias eran significativas para un  $p < 0.05$ .

## **5.0- RESULTADOS**

### **5.1- Normalización de la expresión de SMIT-1.**

Los resultados descritos en la figura 4 muestran una clara sobreexpresión de la SMIT1 en células CTb de alrededor de un 46% en comparación a CNh. Por otra parte, la expresión de SMIT1 en células CTb transfectadas con AS fue reducida en un 10%, 40% y 42% a 24, 48 y 72 horas del knockdown de SMIT1 respectivamente comparado con niveles de SMIT1 en células trisómicas CTb sin transfectar, indicando diferencias significativas en cada uno de los casos con respecto a CTb.

CTb                      24 hrs.                      48 hrs.                      72 hrs.                      CNh



Control de carga  $\beta$ -tubulina para Knockdown de SMIT1

CTb                      24 hrs.                      48 hrs.                      72 hrs                      CNh

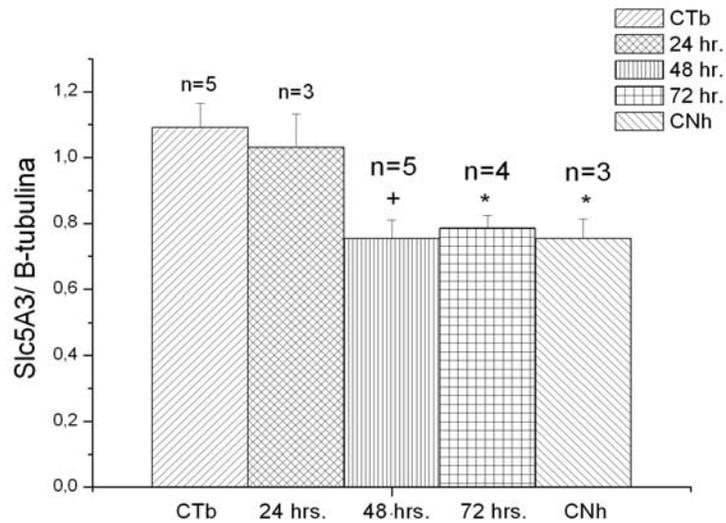
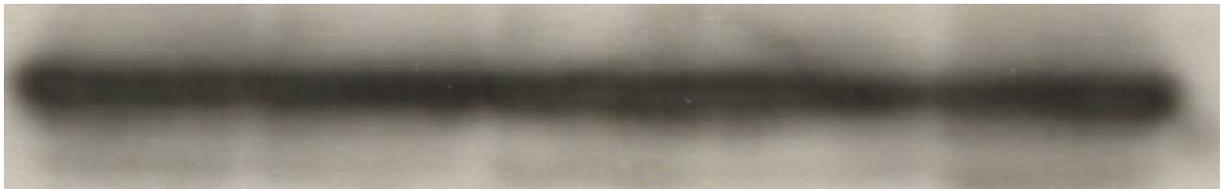


Figura 4: Expresión de SMIT1 utilizando secuencias de antisentido en líneas celulares CTb por medio liposomas catiónicos (lipofectamina) a una concentración de 8mgr/ml por 5 horas. Los valores representan el promedio  $\pm$  error estándar. ;  $p < 0,01$ (+);  $p < 0,05$ (\*) con respecto a la línea celular cortical CTb.

Las células CTb fueron transfectadas con una secuencia no específica de antisentido (scrambled) **Figura 5**. Los resultados no mostraron diferencias entre los niveles de SMIT1 en CTb sin transfectar con respecto a CTb transfectadas a 24, 48 y 72 horas. Esto demuestra que la disminución de la sobreexpresión de SMIT1 en líneas celulares CTb se debe al knockdown del transportador Na<sup>+</sup> /Mioinositol, por lo tanto, el efecto del AS es específico.

CTb                      24hr.                      48hr.                      72hr.                      CNh



Control de carga para scrambled β-tubulina

CTb                      24hrs.                      48hrs.                      72hrs.                      CNh

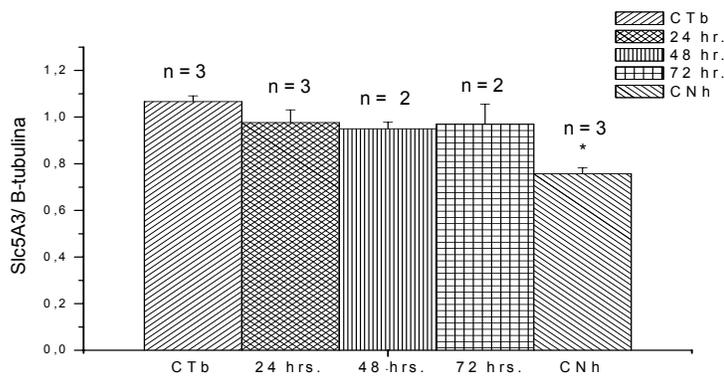


Figura 5 **Control Scrambled**: Expresión de SMIT1 utilizando secuencias de antisentido al azar en líneas celulares CTb por medio liposomas catiónicos (lipofectamina) a una concentración de 8mgr/ml por 5 horas

## **5.2- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb revierte el déficit en la Incorporación de Colina**

La acetilcolina es sintetizada a partir de la unión de colina con ácido acético en presencia de acetyl-CoA por medio la acción de la enzima ChAT y posteriormente es almacenada en vesículas sinápticas en las que se transporta a las terminaciones nerviosas donde se utiliza para la transmisión del impulso nervioso. La colina es una amina cuaternaria sintetizada en el hígado y luego transportado a la neurona por vía hepática. La colina libre se capta específicamente en las terminaciones nerviosas colinérgica mediante un sistema de transporte de alta afinidad dependiente de  $\text{Na}^+$  y de baja afinidad.

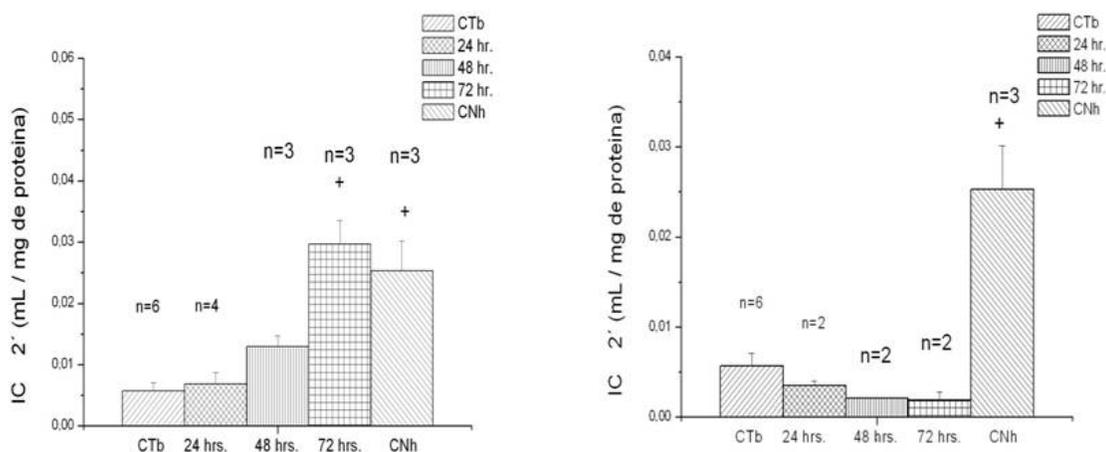
### **a) La Incorporación de Colina luego de 2 minutos de Incubación alcanza Niveles Normales en la Línea Celular Trisómica CTB transfectada con el Oligonucleótido Antisentido específico para SMIT1**

Incorporación de colina en líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con antisentido (figura 6 izquierda). Incorporación de colina en líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con scrambled (antisentido al

azar, figura 6 derecha) . Las células fueron incubadas con 1 $\mu$ Ci de [ $^3$ H]-colina durante 2 minutos

Las células CTb presentan una reducción en IC de un 83% comparada con la línea celular de corteza cerebral normal CNh. A 24 y 48 horas post-transfección la reducción en IC en células CTb es de 72,8% 52%. A las 72 horas la incorporación de Colina en la línea celular CTb transfectada con el antisentido para SMIT1 sobrepasa a lo registrado en la línea celular normal CNh en un 16%.

Al determinar la incorporación de Colina después de una incubación de 2 minutos en la línea celular de corteza cerebral trisómica CTb transfectadas con la secuencia Scrambled no se registraron diferencias con respecto a la misma línea celular sin transfectar.

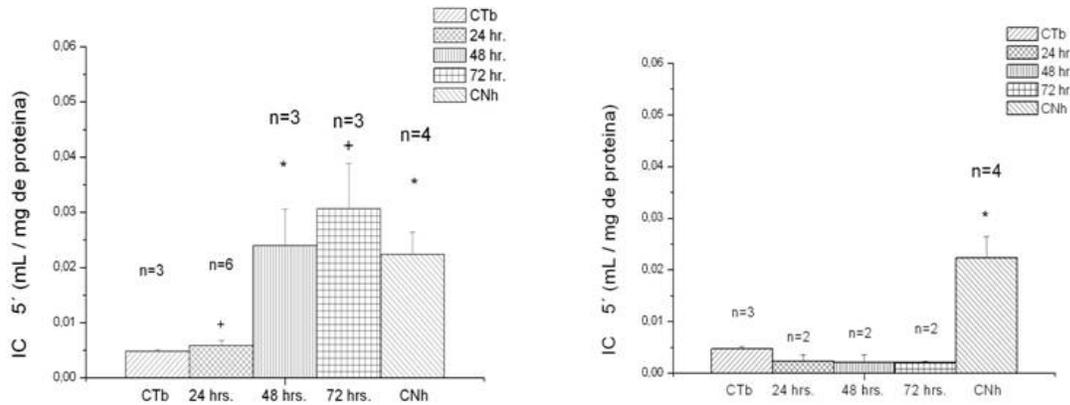


**Figura 6.** Incorporación de [ $^3$ H]- Colina después de 2 minutos de incubación en la línea celular trisómica CTb transfectada con el antisentido para SMIT1(izquierda) y secuencias scrambled (derecha) a 24, 48 y 72 horas post transfección, el control sin transfectar CTb y la línea celular normal CNh. Estadística  $p < 0.01$ (+), comparada con la línea celular CTb

**b) La Incorporación de Colina luego de 5 minutos de Incubación alcanza Niveles Normales en la Línea Celular Trisómica CTB transfectada con el Oligonucleótido Antisentido específico para SMIT1**

Incorporación de colina en líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con antisentido (figura 7 izquierda). Incorporación de colina en líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con scrambled (antisentido al azar) (figura 7 derecha). Las células fueron incubadas con 1 $\mu$ Ci de [ $^3$ H]-colina durante 5 minutos. Las células CTb presentan una reducción en IC de un 78.6% comparada con la línea celular de corteza cerebral normal CNh. A 24 horas post-transfección la reducción en IC en células CTb es de 73.7% y a las 48 y 72 horas la incorporación de Colina en la línea celular CTb transfectada con el antisentido para SMIT1 sobrepasa a lo registrado en la línea celular normal CNh en un 9% y 36% respectivamente (Figura 11).

Al determinar la incorporación de Colina después de una incubación de 5 minutos en la línea celular de corteza cerebral trisómica CTb transfectadas con la secuencia Scrambled no se registraron diferencias con respecto a la misma línea celular sin transfectar.



**Figura 7.** Incorporación de [H3]- Colina después de 5 minutos de incubación en la línea celular trisómica CTb transfecteda con el antisentido para SMIT1(izquierda) y secuencias scrambled (derecha) a 24, 48 y 72 horas post transfección, el control sin transfectar CTb y la línea celular normal CNh. Estadística  $p < 0.01(+)$ ,  $p < 0,05(*)$  comparada con la línea celular CTb.

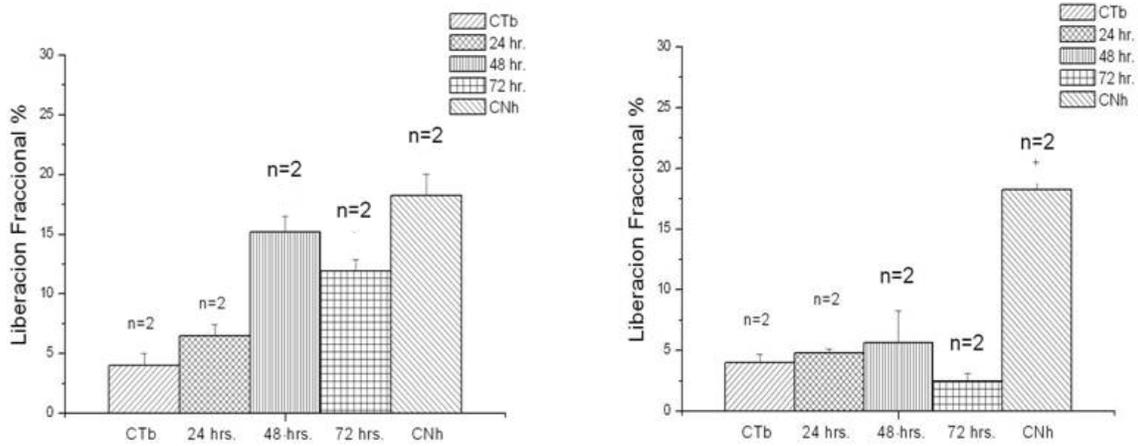
### **5.3- Liberación Fraccional de Acetilcolina**

#### **5.3.1- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb aumenta la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta a la estimulación con Nicotina**

Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con antisentido (Figura 8 izquierda). Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares CTb transfectadas con scrambled (antisentido al azar) (Figura 8 derecha), en respuesta a una despolarización externa generada por **0,1 mM de Nicotina**.

La LF estimulada por 0,1 mM nicotina en células trisómicas sin transfectar disminuye un 78% con respecto a CNh. A 24 y 48 horas del knockdown de SMIT1, la LF en CTb posterior a la despolarización alcanzo una reducción de 64% y 16,92% respectivamente en comparación con CNh. A 72 horas post-transfección la LF de CTb experimenta un leve descenso en la recuperación que venia experimentando, mostrando una disminución de un 34%. Esto sugiere entonces que la normalización en la LF por parte las células CTb se alcanza a 48 horas post-transfección en comparación a CNh (figura 8 derecha).

Los datos obtenidos con células trisómicas transfectadas con secuencia scrambled sugieren que no existen diferencias a 24, 48 y 72 horas post-transfección comparados con líneas celulares trisómicas sin transfectar (figura 8 derecha).

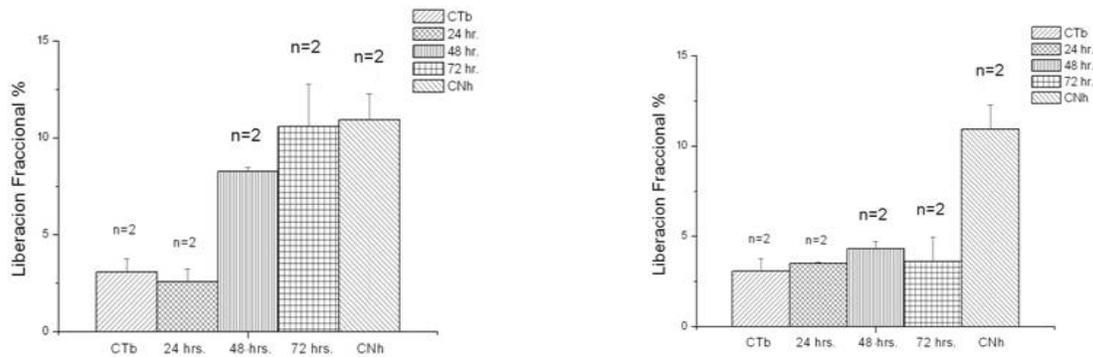


**Figura 8.** Liberación fraccional de acetilcolina en respuesta a estímulo con nicotina 0,1mM en la línea celular trisómica CTb transfectada con el antisentido para SMIT1(izquierda) y secuencias scrambled (derecha) a 24, 48 y 72 horas post transfección, en el control sin transfectar CTb y la línea celular normal CNh.

### 5.3.2- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb aumenta la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta a la estimulación con Muscarina

Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con antisentido (Figura 9 izquierda). Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares CTb transfectadas con scrambled (antisentido al azar) (Figura 9 derecha) en respuesta a una despolarización externa generada por **0,3 mM de Muscarina**.

La LF generada por la estimulación con 0,3mM Muscarina en células CTb exhibe una reducción de 71,7% en comparación con células CNh. A 24 y 48 horas post-transfección la LF de células CTb presenta una disminución de un 76,2% y 24,2% respectivamente con respecto a células CNh, sin mostrar mayores diferencias. Transcurridas 72 Horas post-transfección podemos ver que la liberación de Acetilcolina en las celulas CTb frente a la estimulación con Muscarina casi se iguala a la línea celular normal CNh, siendo inferior sólo por un 3% .Los datos obtenidos con células trisómicas transfectadas con secuencias Scrambled sugieren que no existen diferencias a 24, 48 y 72 horas post-transfección comparados con líneas celulares trisómicas sin transfectar (figura 9 derecha).



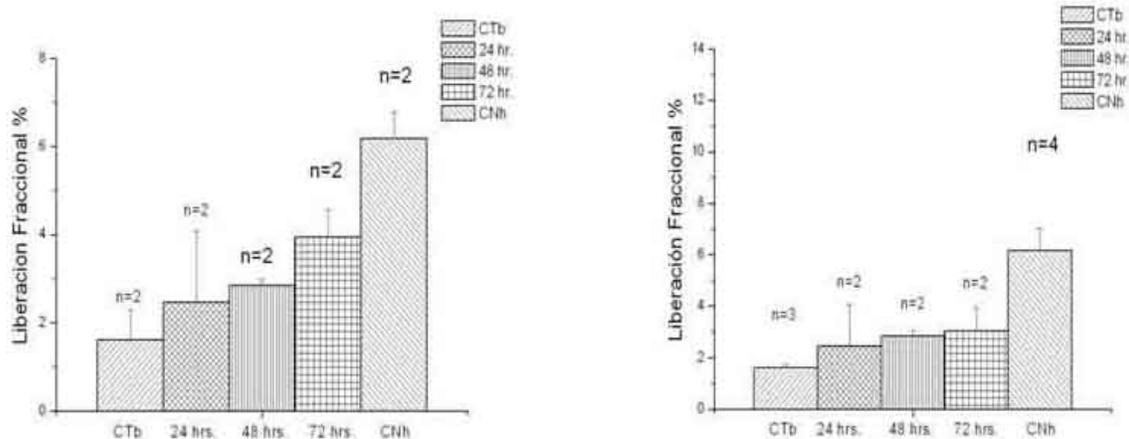
**Figura 9.** Liberación fraccional de acetilcolina en respuesta a estímulo con muscarina 0,3mM en la línea celular trisómica CTb transfectada con el antisentido para SMIT1(izquierda) y secuencias scrambled (derecha) a 24, 48 y 72 horas post transfección, en el control sin transfectar CTb y la línea celular normal CNh

### 5.3.5- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb no tiene efectos la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta a la Despolarización inducida por KCl

Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con antisentido (Figura 10 izquierda). Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transfectadas con scrambled (antisentido al azar) (Figura 10 derecha), en respuesta a una despolarización externa generada por **50 mM de KCl**.

En este caso, los resultados muestran diferencias significativas de las células CTb sin transfectar al ser estimuladas con 50 mM KCl con respecto a su control diploide CNh, presentando una disminución en la LF de acetilcolina de un 85% en comparación con células CNh. A 24, 48 y 72 horas del *Knockdown* de SMIT1 la LF tiene un leve aumento pero sin significancia estadística entre los distintos tiempos observados posterior a la despolarización generada por la aplicación de 50 mM KCl

Los datos obtenidos con células trisómicas transfectadas con la secuencia scrambled indican que no existen diferencias significativas a 24, 48 y 72 horas post-transfección comparados con líneas celulares trisómicas sin transfectar (figura 10 derecha)



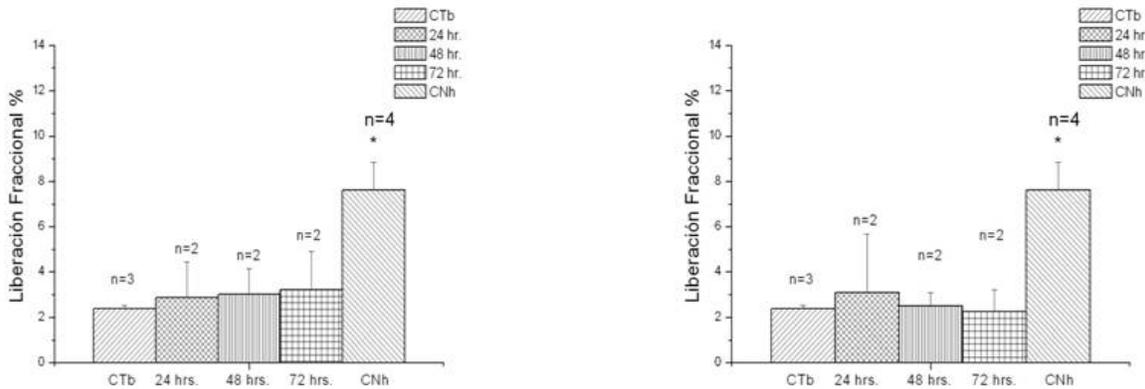
**Figura 10.** Liberación fraccional de acetilcolina en respuesta a estímulo con KCl 50mM en la línea celular trisómica CTb transflectada con el antisentido para SMIT1(izquierda) y secuencias scrambled (derecha) a 24, 48 y 72 horas post transfección, en el control sin transfectar CTb y la línea celular normal CNh

### 5.3.6- La Normalización de la expresión de SMIT1 en neuronas de la línea celular Trisómicas CTb no tiene efectos sobre la liberación fraccional de Acetilcolina en respuesta a la estimulación con Glutamato

Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares trisómicas CTb transflectadas con antisentido (Figura 11 izquierda) Liberación fraccional de acetilcolina desde líneas celulares CNh y líneas celulares CTb transflectadas con

scrambled (antisentido al azar) (Figura 11 derecha), en respuesta a una estimulación externa de 0,2 mM de Glutamato.

La LF generada por estimulación con 0,2 mM de Glutamato en células CTb exhibe una reducción de 75% en comparación con células CNh. En las células trisómicas CTb transfectadas con el antisentido para SMIT1 esta disminución en la liberación de acetilcolina no cambia significativamente, así como tampoco en las células transfectadas con scrambled (antisentido al azar).



**Figura 11.** Liberación fraccional de acetilcolina en respuesta a estímulo con glutamato 0,2 mM en la línea celular trisómica CTb transfectada con el antisentido para SMIT1 (izquierda) y secuencias scrambled (derecha) a 24, 48 y 72 horas post transfección, en el control sin transfectar CTb y la línea celular normal CNh

## 6.0- DISCUSION

El análisis de los niveles del transportador Na<sup>+</sup>/Mioinositol SMIT-1 en células trisómicas de corteza (CTb) por medio de Western Blot indica que este se encuentra sobreexpresado con respecto a la línea de corteza normal (CNh) en un 46%, lo cual es levemente inferior a la dosis génica esperada en la trisomía 16 murina para secuencias ubicadas en dicho cromosoma (50). Al transfectar las células con el oligonucleótido antisentido este hibridiza con el mRNA de SMIT-1 basado en la complementariedad de bases, lo que impide su traducción por parte del ribosoma. Esta disminución en la síntesis proteica sumado al catabolismo propio de la célula tiene por resultado la normalización de los niveles de SMIT-1 al cabo de 48 y 72 horas post-transfección.

Es posible que, debido a la sobreexpresión del transportador de Na<sup>+</sup>/ Mioinositol SMIT-1 descrita en la presente tesis, estén aumentados también los niveles intracelulares de Mioinositol, lo que concuerda con lo descrito en neuronas de ratón en la trisomía parcial Ts65Dn así como también en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con Síndrome de Down. Debido a que el PIP<sub>2</sub> derivado del Mioinositol es el principal sustrato de la PLC, que mediante hidrólisis genera IP<sub>3</sub> y DAG, es probable que los niveles de estos 2 metabolitos estén a su vez incrementados en la trisomía 16 murina.

Existen varias consecuencias del incremento en la concentración intracelular de Mioinositol, cuyos derivados tienen gran importancia en la fisiología celular. En primer lugar, el IP<sub>3</sub> se une a receptores ubicados en el Retículo Endoplasmático y produce la

liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el mismo y el DAG es el principal activador de la PKC (Toker y cols, 1998). Bajo este punto de vista es razonable pensar que los niveles elevados de Mioinositol pueden contribuir al aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular basal encontrado en las células de corteza trisómicas CTb (Cárdenas, 1999) , pero en los estudios realizados por Fernández (2007) en el marco de este mismo proyecto no se observó una normalización en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular basal en las células de corteza trisómicas CTb transfectadas con el antisentido para SMIT-1 con respecto a las células de corteza normales CNh. Este hecho sugiere que el IP3 generado por la elevada concentración de MI no es el responsable del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular basal y que este podría deberse mas bien a las alteraciones a producidas por la sobreexpresión de otras proteínas ubicadas en el cromosoma 16 murino, tales como APP (Opazo y cols, 2007).

Lo anterior nos lleva entonces a discutir la posible contribución del Diacilglicerol (DAG en la recuperación parcial de la función colinérgica en el knockdown génico de SMIT-1. Este metabolito, también derivado del Mioinositol, estaría incrementado en la trisomía 16 murina.

## **1. INCORPORACION DE [H-3] COLINA**

Como se dijo anteriormente, el Diacilglicerol es el principal activador de la proteína quinasa C, la cual tiene entre sus múltiples blancos al transportador de colina de alta afinidad (CHT) . Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la

incorporación de alta afinidad de [H-3]-Colina en estado estacionario (de equilibrio) (5 minutos de incubación) así como en la fase previa al mismo (2 minutos de incubación) por parte de las células trisómicas de corteza CTb, la cual es casi 5 veces menor con respecto a las células diploides CNh. Es posible que en las células de corteza trisómicas se encuentre sobreactivada la PKC debido al exceso de diacilglicerol generado, tal como se explicó en párrafos anteriores, por el exceso de MI derivado de la sobreexpresión de SMIT-1.

Lo anterior podría explicar, entre otras cosas, el déficit en la incorporación de [H-3] Colina por transporte de alta afinidad, ya que se ha visto que la incorporación de colina en células de hipocampo de rata disminuye en presencia de activadores de PKC, así como también al emplear inhibidores de proteínas fosfatasa como PP1/PP2 A, al parecer debido a cambios en la localización subcelular del transportador (Gates y cols., 2004).

De esta forma, podrían explicarse los resultados obtenidos en el presente trabajo, que dan cuenta de una normalización en la incorporación de [H-3]- colina de alta afinidad en estado estacionario a las 48 y 72 horas posteriores a la transfección de las células de corteza trisómicas CTb con el oligonucleótido antisentido para SMIT-1, ya que, al disminuir la expresión de SMIT-1, se verían reducidos los niveles de este metabolito, así como también de sus derivados, IP3 y DAG. Si disminuyen los niveles de DAG la actividad de la PKC volvería a los niveles normales, por lo que el transportador de colina de alta afinidad dejaría de estar hiperfosforilado, recuperando el patrón de distribución subcelular propio de células diploides CNh, permitiendo una normal incorporación de colina hacia el interior de la célula.

## **2. LIBERACION FRACCIONAL DE ACETILCOLINA**

Para evaluar el grado de participación que tiene el transportador SMIT-1 en la disfunción colinérgica (Allen y cols., 2000), se midió el eflujo de Tritoio (donde se considera que la mayor parte corresponde a Acetilcolina, Fiedler y cols.1994) en respuesta a agonistas (Nicotina, Muscarina, Glutamato y KCl) en células de corteza cerebral trisómicas CTb transfectadas con el antisentido para SMIT-1 a las 24, 48 y 72 horas post transfección, con resultados dispares.

### **2.1 Estimulación con Nicotina**

Los receptores Nicotínicos de Acetilcolina son canales iónicos selectivos para cationes de constitución pentamérica activados por ligando. Hasta la fecha, se han clonado 17 subunidades en vertebrados,  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  expresadas en músculo donde median la transmisión neuromuscular (Edmonds B y cols, 1995) y las subunidades “neuronaes”  $\alpha 2$ - $\alpha 10$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ , ampliamente expresadas en el SNC (figura 20).( McGehee y cols. 1995, Dani J A y cols , 2001). Existen numerosas evidencias que sitúan a estos receptores en terminales

presinápticos donde modulan la liberación de neurotransmisores quizás a través del incremento de la concentración  $Ca^{2+}$ , ya que se ha descrito un sustancial influjo de este ion a través de estos canales. (Wonnacott S y cols, 1997, MacDermott A B y cols, 1999, Fucile S, 2004).

En cuanto a la liberación de acetilcolina en las células de corteza trisómicas CTb, podemos observar una menor respuesta frente a la estimulación con nicotina en comparación a las células de corteza diploides CNh, observándose la normalización en el eflujo de tritio en respuesta al estímulo en células de corteza trisómicas CTb transfectadas con el antisentido para SMIT-1 a las 48 y 72 horas post-transfección lo cual fue sorprendente, ya que se trata de un receptor ionotrópico, el cual no presenta dependencia directa del metabolismo del Mioinositol. Por otra parte, estudios realizados en el marco de este mismo proyecto indican que la constante de decaimiento  $\tau$  de las señales de  $Ca^{2+}$  evocadas en respuesta a la estimulación con Nicotina, son mayores en las células de corteza trisómicas CTb que en su control diploide CNh. Ello resulta en una inactivación más lenta post estimulación, y una persistencia de entrada de  $Ca^{2+}$  por un tiempo más prolongado. Estos estudios indican que este último parámetro se normaliza al realizar el knockdown génico del transportador SMIT-1 (Fernández, 2007). Esto indica que la disfunción colinérgica en las células de corteza trisómicas CTb podría ser causada por una alteración a nivel del receptor nicotínico en sí y no por la falla de los sistemas de tamponamiento de  $Ca^{2+}$ , ya que los niveles basales de  $Ca^{2+}$  intracelular, permanecen elevados en las células de corteza trisómicas CTb transfectadas con el antisentido para SMIT-1.

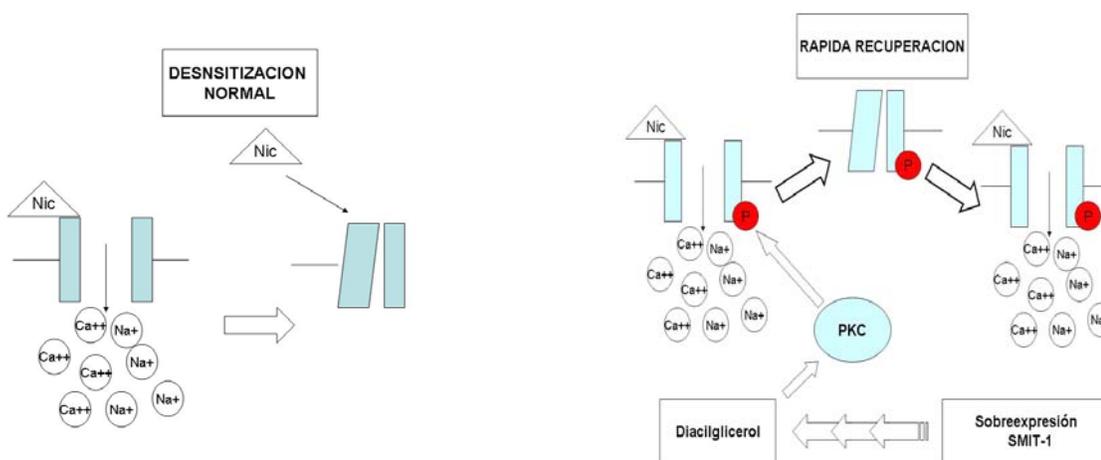
Para dar explicación a la recuperación de la función colinérgica mediada por nicotina es necesario definir el fenómeno de desensibilización de receptores (Quick and Lester, 2002), el cual se entiende como la disminución o pérdida de respuesta biológica posterior a una estimulación prolongada o repetitiva (Ochoa y cols., 1998), y se puede manifestar, por ejemplo, como la falta de respuesta total de una célula muscular a la presencia de un agonista, reflejado en la disminución de la amplitud en respuesta a breves pulsos de acetilcolina (Katz y Thesleff, 1957). A nivel microscópico este fenómeno refleja una acumulación, dependiente del tiempo, de receptores en estados no conductores (Sakmann y cols, 1980).

Basado en experimentos de reconstitución de receptores purificados en bicapas lipídicas, podemos decir también que el fenómeno de desensibilización es intrínseco al receptor (Ochoa y cols, 1989), pero que a su vez este proceso es regulado por variados señales exógenas y agentes celulares (Huganir and Greengard,1990) siendo estos últimos nuestro principal interés.

De los estudios realizados sobre la regulación del receptor nicotínico neuronal sabemos que es fosforilado en la subunidad  $\alpha$  tanto por proteína PKA (H. Nakayama et.1993) como por PKC (Downing and Role, 1987). Los antecedentes que existen sobre la influencia de PKC sobre el proceso de desensibilización en el receptor nicotínico son contradictorias dependiendo del tipo celular en que este se estudie, pero según lo descrito para subtipos neuronales presentes en el SNC, la activación de la PKC favorece la recuperación desde estados desensitizados favoreciendo un estado leve por sobre uno más pronunciado (Fenster

y cols, 1998, Marzalec W y cols, 2005).

Al haber un exceso de Diacilglicerol en las células trisómicas CTb, estas podría ver activada en forma permanente la PKC, favoreciendo con esto la recuperación de los receptores nicotínicos de acetilcolina al ser estimulados. De esta forma, una fracción de receptores anormalmente fosforilados por PKC se recuperaría más rápido por presentar una desensitización mas leve y estarían disponibles para unir nuevamente la fracción de acetilcolina que los receptores no-fosforilados, (que presentan un proceso de desensitización normal), no unen en circunstancias normales (figura 21)



**Figura 21. PKC podría favorecer la recuperación de los receptores nicotínicos** desde estados desensibilizados, aumentando así la constante de decaimiento  $\tau$  en las señales de  $Ca^{2+}$  en respuesta a Nicotina, según lo descrito por Cardenas y cols. 1999 en la línea celular de Corteza cerebral Trisómica CTb.

De esta manera dichos receptores presentarían una conductancia de  $Ca^{2+}$  que si bien no es mayor ( manifestado en la nula alteración en el peak de la corriente de  $Ca^{2+}$  en respuesta a

Nicotina en el knockdown génico de SMIT-1, observado por Fernández, 2007 ), sí podrían mantener una entrada de  $Ca^{2+}$  por un mayor lapso de tiempo con respecto a lo que ocurre en las células normales CNh ,reflejado en una mayor constante cinética de decaimiento  $\tau$  en las células trisómica, único parámetro que , como dijimos antes , se revierte con el knockdown génico del transportador SMIT-1.

Por otra parte esta cinética anormal de señales de  $Ca^{2+}$  generada por la fosforilación anormal del receptor nicotínico puede traducirse en alteraciones de otras proteínas relacionadas con la liberación de acetilcolina en las células de corteza trisómicas, ya que existe una marcada regulación dependiente de  $Ca^{2+}/CaM$  en canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje (VDCC) del tipo P, Q y N (Lee y cols, 2000, Liang y cols, 2003) así como también podría determinar la Inactivación de proteínas del complejo SNARE, por ejemplo mediante la interacción con  $Ca^{2+}/Calmodulina$  (Ohyama y cols, 2002) o siendo blanco para fosforilación dependiente de PKC (Fujita Y y cols, 2000) o Ca/ CaM kinasas. , lo que podría verse reflejado en la disminución de la liberación de acetilcolina frente al estímulo con Nicotina según lo observado por distintos autores (Allen y cols 2002, Opazo y cols 2006) así como también en el presente trabajo.

## 2.2 Estimulación con Muscarina

Los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) median la mayoría de las acciones de este neurotransmisor tanto en el sistema nervioso central como periférico, además de los órganos blanco de nervios parasimpáticos. A la fecha se han clonado 5 subtipos de este receptor: M1 a M5) ( Bonner y cols., 1987), siendo cada uno el producto de un gen distinto. Estos receptores pertenecen a una superfamilia de receptores con 7 dominios transmembrana los cuales activan sus cascadas transduccionales a través de su interacción con proteínas G heterotriméricas. Los receptores M1, M3 y M5 están acoplados a los subtipos de proteínas G  $G_{\alpha q/11}$  y  $G_{\alpha 13}$  (insensibles a la toxina pertrussis) cuya activación conduce a la estimulación de la fosfolipasa C y D, mientras que los receptores M2 y M4 están acoplados preferencialmente a proteínas  $G_o$  y  $G_i$ , las cuales inactivan a la adenilato ciclasa. (Felder y cols, 1995). Estos receptores participan, entre otros procesos celulares, en la liberación de acetilcolina de diversas maneras, por lo que su función, así como también su conexión con la sobreexpresión del transportador SMIT-1 y la disfunción colinérgica en la trisomía 16 será discutida a continuación.

Con respecto a los efectos del agonista colinérgico muscarina, se observó una disminución significativa en la liberación de acetilcolina ante el estímulo en las células de corteza trisómicas (CTb) con respecto a su control diploide (CNh). Una vez realizado el knockdown génico del transportador SMIT-1, se produjo una normalización en el eflujo de tritio en respuesta a muscarina a las 48 y 72 horas post-transfección con respecto a la línea

de corteza normal CNh . A continuación, se discuten dos posibles mecanismos que podrían contribuir a esta parte de la disfunción colinérgica en la trisomía 16 murina y que podrían ser revertidos con la normalización de la expresión del transportador de Na<sup>+</sup>/Mioinositol SMIT-1.

Las causas de la disfunción colinérgica en respuesta a Muscarina observada en las células de corteza CTb podrían ser varias, pero es posible que se deba, tal como se dijo en párrafos anteriores para el caso del receptor Nicotínico, a una mayor actividad de la PKC en respuesta los elevados niveles de DAG generados por la PLC, la cual dispondría de una mayor cantidad de sustrato disponible (PIP2 derivado del MI), proporcionado por la sobreexpresión del transportador SMIT-1. Por otra parte, resultados obtenidos por Fernández indican un mayor peak y enlentecimiento de la cinética de decaimiento en las señales de Ca<sup>2+</sup> evocadas en respuesta a muscarina en las células de corteza CTb, siendo este último parámetro el único que se ve normalizado al transfectar dichas células con el antisentido para SMIT-1. Por lo tanto, es posible relacionar el reestablecimiento de la cinética de Ca<sup>2+</sup> con la normalización en la función colinérgica en respuesta a muscarina en células de corteza trisómicas CTb transfectadas con el antisentido para SMIT-1 según lo descrito en este trabajo.

Es posible que la mayor constante cinética de decaimiento  $\tau$  observada en las células de corteza trisómica en respuesta a Muscarina (Fernández, 2007) así como también el déficit en la función colinérgica mediada por este mismo agonista descrita en este trabajo se deban principalmente a dos factores: 1) una mayor inactivación de los canales de K<sup>+</sup>

KCNQ y 2) una disminución en la interacción inhibitoria que ejercen las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de la proteína  $G\alpha_q$  acoplada al receptor muscarínico M1 (que junto al subtipo M3 predomina en corteza cerebral e hipocampo, Levei A I , 1993) posterior a la estimulación del agonista; por una mayor fosforilación dependiente de PKC.

### **2.2a) Inactivación de KCNQ y fosforilación dependiente de PKC**

En circunstancias normales, los canales KCNQ 2/3 permiten el flujo de  $K^+$  hacia el exterior de la célula, lo cual se ha denominado Corriente M, debido a que es suprimida por receptores Muscarínicos (Brown and Adams 1980) y contribuye a mantener el potencial de membrana. A pesar de que el mecanismo por el cual se suprime esta corriente M ha sido un misterio en el campo de la neurociencia a lo largo de los últimos 20 años la teoría mas aceptada en la actualidad es que el cierre del canal KCNQ se produce a través de la depleción del  $PIP_2$  en la membrana plasmática una vez activada la Fosfolipasa C. Una vez activado el receptor Muscarínico M1 , la Proteína  $G_q$  con la que se encuentra asociado se disocia activando a su vez a la PLC , la cual produce  $IP_3$  y DAG a partir de  $PIP_2$  siendo la disminución de este fosfolípido el que produce el cierre del canal KCNQ(Suh and Hille , 2007)

En cuanto a la regulación de este proceso, Hoshi y cols. (2003) observo que PKC forma un complejo trimérico con la proteína adaptadora AKAP y KCNQ. Al ser fosforilado por PKC, KCNQ se inactiva, impidiendo el eflujo de  $K^+$  hacia el exterior de la célula y

aumentando así la excitabilidad neuronal (Higashida and Brown 1985).

Antes de continuar es necesario ahondar en este último punto: ambos factores, tanto los posibles requerimientos estructurales a nivel de la membrana plasmática en cuanto al PIP2 se refiere por parte KCNQ como la fosforilación del mismo dependiente de PKC son importantes, ya que estos mecanismos están directamente relacionados con el transportador SMIT-1. Al existir más mioinositol a causa de la sobreexpresión de SMIT-1, podría estar alterada la concentración óptima de PIP2 para el funcionamiento de KCNQ a nivel de la membrana plasmática, lo que podría derivar en una mayor inactivación de este canal de  $K^+$ . A su vez, es también posible que al existir una mayor concentración de DAG, la PKC estaría sobreactivada, fosforilando a KCNQ en forma anormal, resultando igualmente en una mayor inactivación del canal.

### **2.2b) Fosforilación de Canales de $Ca^{2+}$ Regulados por Voltaje (VDCC) y Exocitosis**

En circunstancias normales, al aumentar la excitabilidad neuronal producto del cierre de KCNQ, el Potencial de Membrana se desplazaría hacia valores positivos, lo que se traduce en la activación de VDCC, los cuales permiten el flujo de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula, más específicamente a la Zona Activa de la membrana plasmática. Este  $Ca^{2+}$  que ingresa a la zona activa provoca cambios conformacionales en las proteínas involucradas en el proceso de exocitosis (Matthews, 1996), permitiendo su fusión con la membrana plasmática para liberar el neurotransmisor al espacio intersináptico y así ejercer su efecto ya sea en la célula

blanco o en auto receptores que modulan varios procesos celulares, tales como la misma liberación de neurotransmisor y plasticidad sináptica (Shinoe T y cols., 2005), entre otros.

Una vez que los VDCC se activan es necesaria su inactivación, debido a los efectos perjudiciales que puede tener el incremento en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Ello podría llevarse a cabo a través de una inhibición por parte de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  de la proteína Gq acoplada al receptor muscarínico M1 (figura 24), proceso que se ha visto disminuye en presencia de activadores de PKC (Cooper y cols, 2000).

Al haber un exceso de PIP2 en la membrana plasmática de las células de corteza cerebral CTb, determinado por la sobreexpresión de SMIT, podrían existir alteraciones tanto en la función del canal KCNQ como en la actividad de la PKC, cuya actividad estaría aumentada. Ante ello, el canal KCNQ podría mantenerse inactivado por un periodo de tiempo mayor que en la condición normal, favoreciendo una despolarización más larga e induciendo un aumento en el tiempo de activación en los canales de  $Ca^{2+}$  regulados por voltaje tipo N y P/Q (VDCC) lo que sumado a la fosforilación de VDCC por parte de PKC (Doerner y cols, 1988) traería como consecuencia una menor inactivación por parte de la proteína G $\alpha$ q lo que podría explicar el mayor tiempo de decaimiento de las señales de  $Ca^{2+}$  observado por Fernández, y tal como se dijo para el caso del receptor nicotínico de acetilcolina, es posible que este mayor tiempo de decaimiento de las corrientes  $Ca^{2+}$  (reflejado en una constante cinética  $\tau$  mayor) en las células de corteza trisómicas CTb determine una alteración a nivel de proteínas del complejo SNARE, ya que, como se ha visto en distintos tipos celulares incluyendo corteza cerebral, es característico del proceso

de exocitosis una rápida remoción del Calcio que ingresa a la zona activa.

Este hecho se vería revertido al normalizar la expresión del transportador de MI SMIT-1, ya que al generarse menos DAG disminuiría la actividad de la PKC, y los sustratos de ésta recuperarían su estado de fosforilación normal. Esto traería por consecuencia la normalización de la liberación de acetilcolina en respuesta a muscarina como se vio en la sección de resultados.

### **2.2c PKC podría impedir la Internalización de Autoreceptores M2**

Otra posible causa del déficit en la liberación de acetilcolina en respuesta a muscarina en células de corteza trisómicas CTb podría ser la alteración en los mecanismos de inhibición de los VDCC por parte del receptor muscarínico de acetilcolina M2. Al activarse este autorreceptor, que se encuentra acoplado a la proteína  $G_{o/i}$ , se produce la liberación de la subunidad  $\beta\gamma$ , la cual interactúa con los VDCC disminuyendo su actividad y modulando así el proceso de exocitosis. (Shapiro M y cols, 2001)

En un proceso similar a lo que ocurre en receptores nicotínicos, los receptores muscarínicos experimentan desensibilización en respuesta a agonistas, con la diferencia de que en este caso dicho proceso es mediado por proteínas quinasas GRK (G coupled-protein Receptor Kinase, GRK), las cuales fosforilan a la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_i/o$  acoplada al receptor M2, favoreciendo su internalización por medio de arrestinas (Figura 26, Koppen y cols, 2003) contribuyendo al proceso de desensibilización. Sin embargo, estas proteínas quinasas GRK experimentan fosforilación dependiente de PKC, lo cual tiene un

efecto inhibitorio en la actividad y afinidad de GRK por la subunidad  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_i/o$  (Pronin y cols, 1997). Además se ha reportado la fosforilación del receptor muscarínico M1 por parte de PKC, lo cual también tiene un efecto inhibitorio en la fosforilación dependiente de GRK (Haga et al., 1996)

Estos dos factores podrían explicar la disminución significativa en la liberación de acetilcolina observada en las células de corteza trisómicas CTb, ya que es posible que las proteínas kinasas GRK estén siendo anormalmente fosforiladas por PKC debido al exceso de su metabolito activador, el DAG, a causa de la sobreexpresión del transportador SMIT1. Esto traería por consecuencia la presencia de una mayor cantidad de auto receptores inhibitorios M2 en las células trisómicas, ya que al disminuir la actividad o afinidad de GRK, la internalización de los auto-receptores inhibitorios M2 estaría siendo interrumpida. Así, el efecto inhibitorio sobre los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje sería mayor y el fenómeno de desensibilización *post-estímulo* podría ser más pronunciado.

De esta forma, al normalizar la expresión del transportador SMIT-1 en las células de corteza cerebral trisómicas CTb, disminuirían los niveles de mioinositol,  $PIP_2$  y finalmente DAG, normalizándose finalmente la actividad de PKC. Así, se reestablecería el proceso de internalización del receptor muscarínico M2 mediado por GRK's- arrestina, y los VDCC verían restituida su actividad normal con lo que la liberación de acetilcolina alcanzaría los niveles observados en las células diploides CNh, tal como se puede ver en este trabajo.

### **2.3) Despolarización inducida por KCl**

Los resultados obtenidos indican que al inducir una fuerte despolarización con KCl en una concentración de 50  $\mu$ M se observa un déficit en la liberación de acetilcolina entre las células de corteza Trisómicas CTb y el control diploide CNh lo que concuerda con los resultados obtenidos por Opazo y cols. (2006). En el presente estudio, observamos que este déficit en la liberación de acetilcolina en la línea celular de corteza cerebral trisómica CTb no es revertido por la normalización de los niveles del Transportador Na<sup>+</sup>/Mioinositol SMIT-1.

Al inducir esta fuerte despolarización en la membrana plasmática se activan principalmente canales iónicos de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje, siendo estos dos mecanismos los que median la liberación del neurotransmisor hacia el espacio intersináptico. Una posible causa de la disminución en la liberación de acetilcolina en respuesta a K<sup>+</sup> en las células trisómicas es el menor número (35% menos que el control diploide CNh) de canales de Na<sup>+</sup> sensibles a TTX expresados en estas células trisómicas, tal como se ha descrito en líneas celulares de Hipocampo Trisómicas (Galdzicki y cols, 2001), o bien a una alteración en la regulación de estos canales dependiente de PKA y Ca/Calmodulina Kinasa II, ya que se ha descrito que los canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje también son susceptibles a fosforilación por parte de estas proteínas Quinasas (Costa y cols, 1984; , Li M y cols, 1992, Wagner S y cols, 2006). Por otra parte también se ha descrito que la sobreexpresión de A $\beta$

Amiloide también disminuye la liberación de acetilcolina en células de Hipocampo de rata (Kar S y cols, 1996) hecho que cobra importancia en vista de que los niveles de esta proteína se encuentran elevados en la línea celular de corteza trisómica CTb de acuerdo a la dosis génica (50%), (Opazo y cols, 2006) ya que el gen que la codifica se encuentra efectivamente ubicado en el cromosoma 16 murino. Cabe destacar que en este último estudio también se determinó que la normalización de los niveles de APP en las células trisómicas de corteza cerebral CTb restaura la liberación de Acetilcolina en respuesta a  $K^+$ , lo que reafirma la participación de APP en la disfunción colinérgica en la trisomía 16 murina .

El hecho de que la normalización de los niveles de SMIT-1 no revierta la disminución en la liberación de acetilcolina ante la estimulación con  $K^+$  en las células trisómicas CTb podría ser atribuido a que tampoco se observa, como se dijo en párrafos anteriores, una normalización en los elevados niveles basales de  $Ca^{2+}$  intracelular. Al estar elevados los niveles de Calcio es posible que esté activado el complejo  $Ca^{2+}$ /Calmodulina, el cual es capaz de activar a la enzima adenilato ciclasa (Wu y cols. 1993), lo cual puede derivar en altos niveles de cAMP (Siarey y cols, 2000). Esto podría tener relación con la hipersensibilidad de esta enzima en células de hipocampo de ratón trisómico parcial Ts65Dn ante la estimulación con forskolina. El incremento en los niveles de este metabolito activaría a la PKA induciendo una fosforilación excesiva de los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje inactivándolos lo cual podría explicar la reducción en las corrientes de  $Ca^{2+}$  observadas en cultivos de neuronas del DRG de fetos murinos Trisómicos 16 (Caviedes y

cols, 2006) lo que sumado a la disminución en el número de los mismos, podría ser una causa de la menor liberación de acetilcolina en respuesta a  $K^+$ .

#### **2.4) Estimulación con Glutamato**

El glutamato es el neurotransmisor más común en las sinapsis excitatorias del SNC, actuando tanto a través de receptores ionotrópicos como metabotrópicos.

En las líneas celulares de corteza cerebral normales (CNh) y Trisómicas (CTb) las acciones del glutamato son ejercidas principalmente a través de receptores Ionotrópicos (Rodríguez, 1997, Cárdenas y cols, 1999) los que se clasifican farmacológicamente en tres subtipos: NMDA, AMPA y Kainato.

Estudios de este mismo grupo en líneas celulares de corteza cerebral habían arrojado resultados contradictorios ya que Allen y cols (2000) no obtuvieron diferencias significativas en la liberación de Acetilcolina en respuesta a la estimulación con Glutamato entre las líneas celulares de corteza cerebral normal (CNh) y trisómica (CTb). Sin embargo, Opazo y cols (2006) sí observaron diferencias significativas entre ellas siendo menor la respuesta en la línea celular trisómica CTb, las cuales se revertían al normalizar la expresión de la proteína APP en (2006).

En lo que respecta a este trabajo, observamos diferencias entre células normales y trisómicas, pero al transfectar con el antisentido para el transportador SMIT1 no se pudo

observar recuperación alguna en la función colinérgica frente a la estimulación con glutamato.

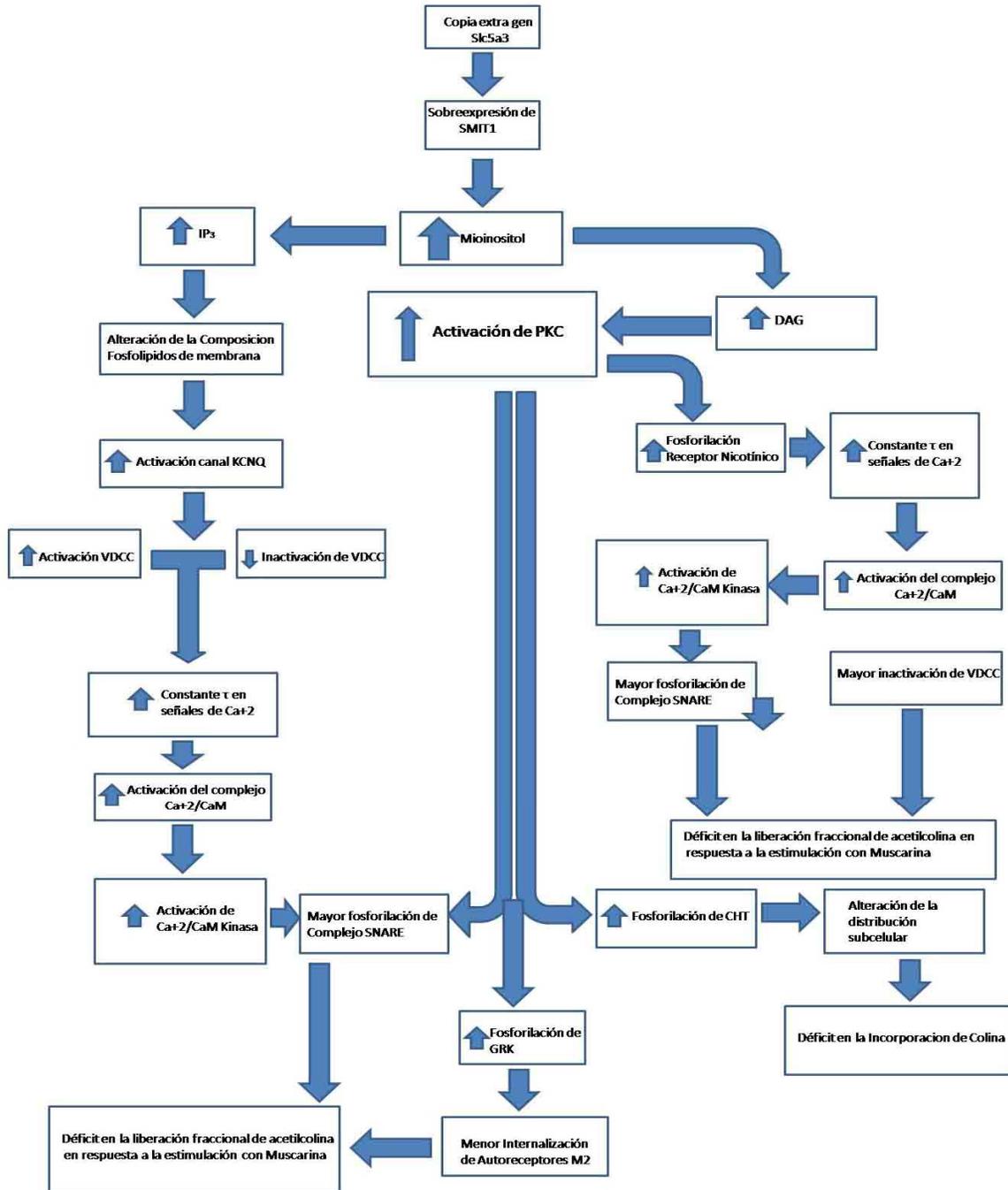
Esta diferencia entre ambas líneas celulares (normales y trisómicas) podría explicarse en parte debido a la sobreexpresión del mRNA de la subunidad reguladora NR2A ya que el gen que codifica para esta proteína efectivamente se encuentra ubicado en el cromosoma 16 (Nagasawa y cols, 1996).

La razón por la cual la normalización de SMIT1 no produjo la recuperación de la liberación de Acetilcolina en respuesta a la estimulación con glutamato es desconocida, pero es posible que dicha alteración no este relacionada con los elevados niveles de MI que determinan el posible incremento en los metabolitos derivados del mismo, y que mas bien responda, como se dijo anteriormente a la sobreexpresión de la subunidad NR1A o a mecanismos de fosforilación a través de proteínas quinasas dependientes de  $Ca^{2+}$  (Tan y cols, 1994) o cAMP (Greengard y cols, 1991), ya que es posible que la alteración de estos mecanismos de fosforilación persista una vez normalizado SMIT1, en vista de que los elevados niveles basales de  $Ca^{2+}$  intracelular no son mediados por el aumento en el transporte de Mioinositol derivado de la sobreexpresión del transportador.(Fernández, 2007)

De acuerdo a los resultados analizados en la presente discusión podemos decir para finalizar, que la sobreexpresión de SMIT1 en la Trisomía 16, el posible aumento de la concentración de Inositol y los metabolitos derivados de el, afectarían principalmente a la función neurotransmisora mediada por agonistas colinérgicos tales como Nicotina y

Muscarina, aunque no es posible descartar otras acciones, especialmente si consideramos que aunque sabemos que los niveles del Transportador SMIT1 disminuyen al emplear los oligonucleótidos antisentido, desconocemos varios aspectos relacionados, tales como la variación en los fosfolípidos de membrana en el lapso de tiempo posterior a la transfección, los niveles de los metabolitos derivados del PIP3 a partir de la estimulación de la Fosfolipasa C , el grado de fosforilación que experimentan receptores Nicotínicos y Muscarínicos así como también la actividad de las proteína quinasas que median dichos procesos.

No fue el objetivo de este estudio esclarecer todas estas variables, pero sí puede constituir un excelente punto de partida para futuras investigaciones en las cuales se considere a SMIT1 o bien a alguno de los metabolitos, proteínas y/o receptores posiblemente afectados por su sobreexpresión como un blanco farmacológico en una terapia que apunte a revertir la disfunción colinérgica en el Síndrome de Down, y con ello recuperar en parte algunas de las alteraciones cognitivas e intelectuales características de este síndrome.



1Esquema que describe posibles alteraciones ocasionadas por la sobreexpresión de SMIT1 en distintas vías implicadas en la neurotransmisión y que podrían contribuir a la Disfunción Colinérgica en la Trisomía 16 Murina (Modelo Síndrome de Down)

## 7.0- CONCLUSIONES

1. El análisis de Western Blot indica que SMIT1 se encuentra sobreexpresado en la línea celular de corteza cerebral trisómica CTb.
2. El análisis de Western Blot muestra que es posible la normalización o reducción de la sobreexpresión del Transportador de Na<sup>+</sup>/ Mioinositol SMIT1 mediante el tratamiento con secuencias de AS específicas para mRNA alcanzando niveles normales de expresión de esta proteína en líneas celulares trisómicas CTb.
3. La IC, por parte de las células CTb, es significativamente menor en comparación con CNh Sin embargo, a 48 y 72 horas del knockdown de SMIT1, la Incorporación de Colina, por parte de CTb, alcanza niveles normales al comparar con su control diploide CNh.
4. Los niveles de Liberación Fraccional de Acetilcolina en respuesta a 0,1mM de nicotina ,0,3mM de Muscarina, 50 mM de K<sup>+</sup> y 0,2 mM Glutamato se encuentran disminuidos en la línea celular de corteza cerebral trisómica CTb con respecto a su control diploide CNh
5. A 48 y 72 horas del knockdown de SMIT1, los niveles de liberación fraccional de Acetilcolina, estimulados por 0,1mM de nicotina y 0,3mM de Muscarina, fueron esencialmente similares a los niveles de Liberación Fraccional registrados en líneas celulares normales.

6. A 48 y 72 horas del knockdown de SMIT1, los niveles de liberación fraccional de Acetilcolina, estimulados por 50 mM de  $K^+$  y 0,2 mM Glutamato **no logran igualarse** a los de la línea celular de corteza normal CNh, permaneciendo en niveles similares a lo observado en la línea de corteza cerebral trisómica CTb sin transfectar.
7. Los resultados sugieren, que la sobreexpresión de SMIT1 en CTb podría contribuir al deterioro en la función colinérgica mediada por agonistas de receptores Nicotínicos y Muscarínicos, y que el knockdown génico en modelos celulares del síndrome de Down es una herramienta importante que permite identificar posibles blancos terapéuticos en el Síndrome de Down.

## 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., Martín, J., Arriagada, C., Cárdenas, A.M., Rapoport, S.I., Caviedes, R. and Caviedes, P. (2000) Impaired cholinergic function in cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3259 - 3264.
- 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.
- Ault, B., Caviedes, P. and Rapoport, S. I., Neurophysiological abnormalities in cultured dorsal root ganglion neurons from the trisomy 16 mouse fetus, a model for Down Syndrome *Brain Res.*, 485 (1989a) 165-170.
- Berridge MJ, Cobbold PH, Cuthbertson KS (1988). Spatial and temporal aspects of cell signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Jul 26;320(1199):325-43. Review
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR.(1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* Jul 31;237(4814):527-32. Erratum in: *Science* 1987 Sep 25;237(4822):237.
- Bravo DT, Kolmakova NG, Parsons SM.(2004) Choline is transported by vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem.* Nov;91(3):766-8.
- Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science.* May 15;256(5059):1021-5.
- Brown, D.A., and P.R. Adams. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate. *Nature.* 283:673-676
- 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(2), 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(2), 46-58.
- 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., Fiedler, J., Caviedes, R., Epstein, C.J. and Rapoport, S.I.. (1995). Altered Calcium currents and cholinergic function in neurons of murine trisomy 16 fetuses, an animal model for human trisomy 21 (Down syndrome). 4th IBRO World Congress in Neuroscience, 9 - 14 de Julio, Kioto, Japón,
- Chau JF, Lee MK, Law JW, Chung SK, Chung SS (2005) Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves. *FASEB J.* Nov;19(13):1887-9. Epub 2005 Sep 20.
- Collier B, Poon P, Salehmoghaddam S. (1972) The formation of choline and of acetylcholine by brain in vitro. *J Neurochem.* Jan;19(1):51-60.
- Cooper CB, Arnot MI, Feng ZP, Jarvis SE, Hamid J, Zamponi GW (2000). Cross-talk between G-protein and protein kinase C modulation of N-type calcium channels is dependent on the G-protein beta subunit isoform. *J Biol Chem.* Dec 29;275(52):40777-81.
- Costa, M.R., Catterall, W.A. (1984) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the alpha subunit of the sodium channel in synaptic nerve ending particles, *J. Biol. Chem.* 259 8210–8218.
- Crete, N. Gosset, P. Theophile, D., Duterque-Coquillaud, M. Blouin, J.L. Vayssettes, C. Sinet, P.M. Creau-Goldberg, N. (1993) Mapping the Down syndrome chromosome region. Establishment of a YAC contig spanning 1.2 megabases, *Eur. J. Hum. Genet.* 1 51–63
- Dahmane, N. Charron, G. Lopes, C. Yaspo, M.L. Maunoury, C. Decorte, L. Sinet, P.M. Bloch, B. Delabar, J.M. (1995) Down syndrome critical region contains a gene homologous to *Drosophila sim* expressed during rat and human central nervous system development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 9191–9195.
- Dani JA (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry.* Feb 1;49(3):166-74. Review
- Davisson, M.T., Schmidt, C. Reeves, R.H. Irving, N.G. Akeson, E.C Harris, B.S. Bronson R.T (1993) Segmental trisomy as a mouse model Down syndrome, *Prog. Clin. Biol. Res.* 384 117–133.
- Delabar, J.M. Theophile, D. Rahmani, Z. Chettouh, Z. Blouin, J.L. Prieur, M. Noel, B. Sinet, P.M. (1993) Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21, *Eur. J. Hum. Genet.* 1 114–124.
- Delmas P, Coster P, Gamper N, Shapiro M, (2001) Phosphoinositides Lipid

Second Messenger: New Paradigms for Calcium Channel Modulation, *Neuron*, Vol. 47, 179–182, July 21

- De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick P (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*. Mar 15;271(5255):1533-9. Review.
- Deutsch JA (1971). The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*. Nov;174(11):788-94
- Doerner D, Pitler TA, Alger BE (1988). Protein kinase C activators block specific calcium and potassium current component in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci*. Nov;8(11):4069-78.
- Downing JE, Role LW. (1987). Activators of protein kinase C enhance acetylcholine receptor in sympathetic ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7739-773
- Edmonds B, Gibb AJ, Colquhoun D (1995). Mechanisms of activation of muscle nicotinic acetylcholine receptors and the time course of endplate currents. *Annu Rev Physiol.* ;57:469-93. Review.
- Epstein, C.J., Cox, D.R. and Epstein, L. B., Mouse trisomy 16: an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome) (1985). *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. Korenberg, J.R. Anneren, G. Antonarakis, S.E. Ayme, S. Courchesne, E. Epstein, L.B. Fowler, A. Groner, Y. Huret, J.L. (1991) Protocols to establish genotype–phenotype correlations in Down syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 49 207–235.
- Estibeiro, P and Godfray, J. (2001) Antisense as a neuroscience tool and therapeutic agent *TINS* Vol.24 No.11 (Suppl.), S56-S62.
- Fenster, C.P., Beckman, M.L., Parker, J.C., Sjefffield, E.B., Whitworth, T.L., Quick, M.W., Lester, R.A.J., (1999). Regulation of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C. *Mol.Pharmacol.* 55, 432– 443.
- Felder CC (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.* May;9(8):619-25. Review.
- Ferguson SM, Bazalakova M, Savchenko V, Tapia JC, Wright J, Blakely RD. (2004 ) Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 8;101(23):8762-7. Epub Jun 1.
- 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.

- Fucile, S., (2004). Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1–8.
- 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.J. 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, S.I. (2001) On the cause of mental retardation in Down syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models *Brain Research Reviews* 35 115–145.
- Siarey RJ, Kline-Burgess A, Cho M, Balbo A, Best TK, Harashima C, Klann E, Galdzicki Z. (2006) Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Journal of Neurochemistry* Aug;98(4):1266-77
- Hager, K., Hazama, A., Kwon, H. M., Loo, D. D., Handler, J. S., and Wright, E. M. (1995) Kinetics and specificity of the renal Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Membr. Biol.* **143**, 103–113
- Hattori, M, Fujiyama, A., Taylor, TD, Watanabe, H. y cols. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405 (18), 311-319
- Higashida H, Brown DA.(1986) Two polyphosphatidylinositide metabolites control two K<sup>+</sup> currents in a neuronal cell. *Nature*. Sep 25-Oct 1;323(6086):333-5
- Hosey MM. (1992) Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors. *FASEB J.* Feb 1;6(3):845-52. Review
- Hoshi N, Zhang JS, Omaki M, Takeuchi T, Yokoyama S, Wanaverbecq N, Langeberg LK, Yoneda Y, Scott JD, Brown DA, Higashida H. (2003) AKAP150 signaling complex promotes suppression of the M-current by muscarinic agonists. *Nat Neurosci.* Jun;6(6):564-71
- 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.
- Haganir RL, Greengard P. (1990) Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron.* Nov;5(5):555-67. Review.
- Kar, S., Issa, A. M., Seto, D., Auld, D. S., Collier, B., & Quirion, R.. (1998) Amyloid β-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 70, 2179– 2187.
- Katz, B., Thesleff, S., (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end plate. *J. Physiol.* 138, 63– 80.

- Kobayashi Y, Isa T. (2002). Sensory-motor gating and cognitive control by the brainstem cholinergic system. *Neural Netw.* Jun-Jul; 15(4-6):731-41. Review.
- Korenberg, J.R. Chen, X.N. Schipper, R. Sun, Z. Gonsky, R. Gerwehr, S. Carpenter, N. Daumer, C. Dignan, P. Disteche, C. Graham, J.M. Hugdins, L. McGillivray, B. Miyazaki, K. Ogasawara, N. Park, J.P. Pagon, R. Pueschel, S.M. Sack, G. Say, B. Schuftion, S. Fenhauer, S. Soukup, S. Yamanaka, T. (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 4997–5001
- Levey AI.(1993) Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.*; 52(5-6):441-8. Review
- Li M, West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA.(1993) Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* Sep 10;261(5127):1439-42.
- Liang H, DeMaria CD, Erickson MG, Mori MX, Alseikhan BA, Yue DT (2003) Unified mechanisms of Ca<sup>2+</sup> regulation across the Ca<sup>2+</sup> channel family. *Neuron.* Sep 11;39(6):951-60.
- MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA.(1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci.*; 22:443-85. Review.
- Misawa H, Nakata K, Matsuura J, Nagao M, Okuda T, Haga T (2001). Distribution of the high-affinity choline transporter in the central nervous system of the rat. *Neuroscience.*;105(1):87-98
- -Marszalec W, Jay Z. Yeh, Toshio Narahashi\*. (2005) Desensitization of nicotine acetylcholine receptors: Modulation by kinase activation and phosphatase inhibition. *European Journal of Pharmacology* 514 83–90
- -Matthews G. (1996) Synaptic exocytosis and endocytosis: capacitance measurements. *Curr Opin Neurobiol.* Jun;6(3):358-64. Review.
- McGehee, D.S., Role, L.W., (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 57, 521– 546
- Nagasawa M., Sakimura K., Mori K. J., Bedell M. A., Copeland N. G., Jenkins N. A., Mishina M. (1996) Gene structure and chromosomal localization of the mouse NMDA receptor channel subunits. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **36**, 1 11.10.1016/0169-328x(95)00225-h
- Nakayama H, Okuda H, Nakashima T. (1993) Phosphorylation of rat brain nicotinic acetylcholine receptor by cAMP-dependent protein kinase in vitro. *Brain Res Mol Brain Res.* Oct;20(1-2):171-7.
- Nishizuka Y. (1989) Studies and prospectives of the protein kinase c family for cellular regulation. *Cancer.* May 15;63(10):1892-903.
- 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.

- Ochoa EL, Chattopadhyay A, McNamee MG. (1989). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol Neurobiol* 9:141–178.}
- Opazo P, Saud K, de Saint Pierre M, Cardenas AM, Allen DD, 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.* Nov 1;84(6):1303-10.
- Orozco, C.B. Smith, S.A. Epstein, C.J. Rapoport, S.I. (1987) Electrophysiological properties of cultured dorsal root ganglion and spinal cord neurons of normal and trisomy 16 fetal mice, *Brain Res.* 429 111–122.
- 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.
- Pronin A , Daulet K. Satpaev, Vladlen Z. Slepak, and Jeffrey L. Benovic (1997) Regulation of G Protein-coupled Receptor Kinases by Calmodulin and Localization of the Calmodulin Binding Domain *JBC* Vol. 272, No. 29, Issue of July 18, pp. 18273–18280
- Pulsifer, M.B. (1996) The neuropsychology of mental retardation, *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2, 159–176.
- Quick MW, Lester RA.(2002) Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* Dec;53(4):457-78. Review.
- Purves Dale y cols (2001), *Neuroscience*, Sinauer Associates, Inc. imagen descargada del sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Rapoport, SI and Galdzicki, Z. (1994). Electrical studies of cultured fetal human trisomy 21 and mouse trisomy neurons identify functional deficits that may lead to mental retardation in Down's syndrome *Dev. Brain Dysfunct.* 7 265- 288.
- Reeves, R. H., Gearhart, J. D. and Littlefield, J. W. (1986) Genetic basis for a mouse model of Down syndrome *Brain Res. Bull.*, 16 803-814.
- 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, Patlak J, Neher E. (1980). Single acetylcholine activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* 286:71–73.
- Sarter M, Parikh V. (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci.* Jan;6(1):48-56. Review.
- Shetty, H.U. Holloway, H.W. Acevedo, L.D. Galdzicki, Z. (1996) *Brain*

accumulation of myo-inositol in the trisomy 16 mouse, an animal model of Down's syndrome, *Biochem. J.* 313: 31–33.

- Shawn M. Ferguson\*, Mihaela Bazalakova\*, Valentina Savchenko, Juan Carlos Tapia‡, Jane Wright†, and Randy D. Blakely (2004) Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice 8762–8767 *PNAS* June 8, vol. 101 no. 23
- Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T. (2005) Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* Nov 30;25(48):11194-200.
- Shapiro M, Jesus Gomez Susan E. Hamilton, Bertil Hille, Michael D. Loose Neil M. Nathanson John P. Roche , Jürgen Wess (2001) Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca and K channel activity in sympathetic neurons *Life Sciences* 68 ;2481–2487
- Suh BC, Hille B.(2007) Regulation of KCNQ channels by manipulation of phosphoinositides. *J Physiol.* Apr 5;
- Tucek S.(1985) Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J Neurochem.* Jan;44(1):11-24. Review.
- Toker A. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci.* (1998) Nov 1;3:D1134-47. Review.
- Van Koppen CJ, Kaiser B. (2003) Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther.* May;98(2):197-220. Review
- Vickroy TW, Roeske WR, Yamamura HI. (1984) Sodium-dependent high-affinity binding of [3H] hemicholinium-3 in the rat brain: a potentially selective marker for presynaptic cholinergic sites. *Life Sci.* Dec 3;35(23):2335-43.
- Wagner S, Maier LS. (2006) Modulation of cardiac Na(+) and Ca(2+) currents by CaM and CaMKII. *J Cardiovasc Electrophysiol.* May;17 Suppl 1:S26-S33. Review
- Wu Z, Wong ST, and Storms DR.(1993) Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 268:23766–23768

