

**Universidad de Chile**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**Aumento en la expresión de DSCAM y su acción  
sobre parámetros morfológicos neuronales a través  
de efectores de la vía PAK en un modelo celular del  
Síndrome de Down**

Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:

**Ramón Daniel Pérez Núñez**

Directores de Tesis:

**Dr. Pablo Caviedes Fernández**

**Dr. Jean-Vianney Barnier**

Santiago - Chile  
2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

**RAMÓN DANIEL PÉREZ NÚÑEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendida el día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.

**Directores de Tesis:**

Dr. Pablo Caviedes F.

\_\_\_\_\_

Dr. Jean-Vianney Barnier

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. María Antonieta Valenzuela (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dra. Paola Morales

\_\_\_\_\_

Dra. Alejandra Álvarez

\_\_\_\_\_

Dr. Esteban Aliaga

\_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

Quiero comenzar agradeciendo a mi tutor, Dr. Pablo Caviedes por su incondicional apoyo en todos estos años de trabajo en su laboratorio, brindándome un permanente respaldo tanto en lo profesional como personal.

Además a mi co-tutor, Dr. Jean-Vianney Barnier por su gran apoyo y amistad.

A los integrantes del Laboratorio de Terapia Celular, por su gran ayuda y todos los gratos momentos que compartimos.

A mi familia por entregarme siempre su confianza y cariño en todos mis proyectos personales.

Y un especial agradecimiento a mi compañera de vida, Bárbara, por todo su amor y apoyo que día a día me brinda, esperando juntos la llegada de nuestro primer hijo Raimundo.

## **Financiamiento**

Esta tesis fue financiada parcialmente por los siguientes proyectos: FONDECYT 1090160 y 1130241. Además durante el desarrollo de este trabajo se recibió el apoyo de una beca CONICYT regular (marzo 2012 a marzo a marzo 2015) y una beca de extensión de CONICYT (marzo 2015 a agosto 2015)

## Publicaciones

### Revistas Indexadas

- **Pérez-Núñez R.**, Barraza N., Gonzalez A., Cárdenas A.M., Barnier J. y Caviedes P., Overexpressed Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) Dereglates P21-Activated Kinase (PAK) Activity in na In Vitro Neuronal Modelo f Down Syndrome: Consequences on Cell Process Formation and Extension. Neurotox Res. February, 30:76-87, 2016.

- Acuña M., **Pérez-Núñez R.**, Noriega J., Cárdenas AM., Bacigalupo J., Delgado R., Arriagada C., Segura-Aguilar J. Caviedes R. y Caviedes P., Altered Voltage Dependent Calcium Currents in a Neuronal Cell Line Derived From the Cerebral Cortex of a Trisomy 16 Fetal Mouse, an Animal Model of Down syndrome. Neurotox Res. Dec 28, 2011.

- Alicia Colombo, Lorena Armijo, Marina Mione, Camila Morales, Néstor Guerrero, Margarita Meynard, **Ramón Pérez**, José Suazo, Katherine Marcelain, Luis Briones, Steffen Härtel, Stephen W. Wilson y Miguel L. Concha. Daam1a mediates asymmetric habenular morphogenesis by regulating dendritic and axonal outgrowth. Development. July 8, 2013.

### Presentaciones en congresos internacionales

- Increased expression of DSCAM and its action on neuronal morphological parameters in immortalized cell models of Down Syndrome. Possible role of the PAK effector pathway, R. D. Pérez, J.V. Barnier, R. Caviedes, A. Cárdenas, P. A. Caviedes. Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, US, 2013.

- Increased expression of DSCAM and its action on neuronal morphological parameters in immortalized cell models of Down Syndrome. Possible role of the PAK effector pathway, R. D. Pérez, J.V. Barnier, R. Caviedes, A. Cárdenas, P. A. Caviedes. Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, US, 2014.

### Estadía internacional de investigación

Laboratorio de Señalización y Plasticidad Neuronal, CNRS, Université Paris-Sud, Orsay, Francia.

Profesor responsable Dr. Jean-Vianney Barnier. Mayo-Julio 2014.

## Índice

<b>Índice general</b>	IV
<b>Índice de Figuras</b>	VIII
<b>Abreviaciones</b>	1
<b>Resumen</b>	3
<b>Summary</b>	5
<b>1.- Introducción</b>	7
1.1.- Síndrome de Down	7
1.2.- Anomalías en el desarrollo neuronal	10
1.3.- Consecuencias del desbalance génico	11
1.4.- Modelo celular para el estudio del SD	14
1.5.- Rol de DSCAM en la función neuronal	19
1.6.- Señalización PAK en la fisiología neuronal	23
1.7.- Regulación de PAK por DSCAM	26
<b>2.- Hipótesis y Objetivos</b>	28
2.1.- Hipótesis	28
2.2.- Objetivo General	28
2.3.- Objetivos Específicos	29
<b>3.- Materiales y Métodos</b>	30
3.1.- Modelo Celular	30
3.2.- Diferenciación Celular	30
3.3.- Ensayo de Proliferación y Viabilidad Celular	31
3.4.- Análisis por Microscopía	31
3.5.- Inmunoblot	32
3.6.- Citometría de Flujo	33
3.7.- Extracción de RNA	34
3.8.- PCR en tiempo real	35
3.9.- Transfección Transitoria	35

3.10.- Inmunofluorescencia	36
3.11.- Análisis Densitométrico	37
3.12.- Análisis Estadístico	37
<b>4.- Resultados</b>	<b>38</b>
4.1.- Cuantificación de los niveles de expresión de DSCAM en la línea celular CTb, utilizando la línea CNh como control, en condiciones basales de proliferación y diferenciación celular	38
4.1.1.- Análisis de los niveles basales de expresión de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh	38
4.1.2.- Diferenciación de las líneas celulares CTb y CNh	42
4.1.3.- Estudio de proliferación y muerte celular bajo condiciones de diferenciación en las líneas CTb y CNh	44
4.1.4.- Caracterización neuronal de las líneas celulares CTb y CNh	46
4.1.5.- Expresión de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones basales de proliferación y diferenciación celular	48
4.2.- Análisis de parámetros morfológicos, número y longitud de neuritas, en las líneas CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular	53
4.2.1.- Cuantificación del número de neuritas en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular	53
4.2.2.- Cuantificación del largo total de neuritas en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular	55
4.2.3.- Estudio de parámetros morfológicos, número y longitud de neuritas, en las líneas CTb y CNh, al estimular con Netrina 1	56

4.2.4.- Estandarización del <i>Knockdown</i> de DSCAM en la línea celular CTb, normalizado a la línea control CNh	58
4.2.5.- Análisis de parámetros morfológicos, número y longitud de neuritas, con el <i>knockdown</i> de DSCAM en la línea celular CTb, utilizando la línea control CNh	60
4.3.- Cuantificación de la expresión de las proteínas PAK del grupo I, en las líneas celulares CTb y CNh	63
4.3.1.- Análisis de los niveles de las proteínas PAK del grupo I en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones basales de proliferación	63
4.3.2.- Cuantificación de los niveles proteicos de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular	65
4.3.3.- Análisis del estado de activación de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular	67
4.3.4.- Análisis del estado de activación de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh, al estimular con Netrina 1	68
4.3.5.- Cuantificación del estado de activación de PAK1, con el <i>knockdown</i> de DSCAM en la línea celular CTb, al estimular con Netrina 1	70
4.4.- Estudio de la activación de blancos moleculares río abajo de la vía PAK, mediante el estado de fosforilación de LIMK y Cofilina en las líneas celulares CTb y CNh	73
4.4.1.- Cuantificación del estado de activación de LIMK1 en las líneas celulares CTb y CNh, al estimular con Netrina 1	73



4.4.2.- Cuantificación del estado de activación de LIMK1, con el <i>knockdown</i> de DSCAM en la línea celular CTb, al estimular con Netrina 1	75
4.4.3.- Cuantificación del estado de activación de Cofilina en las líneas celulares CTb y CNh, al estimular con Netrina 1	77
4.4.4.- Cuantificación del estado de activación de Cofilina, con el <i>knockdown</i> de DSCAM en la línea celular CTb, al estimular con Netrina 1	79
<b>5.- Discusión</b>	82
5.1.- Expresión de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh en condiciones basales y de diferenciación celular	84
5.2.- Análisis de parámetros morfológicos neuronales en las líneas celulares CTb y CNh	87
5.3.- Análisis de los niveles de expresión y activación de PAK en las líneas celulares CTb y CNh	89
5.4.- Estudio de la activación de blancos moleculares río abajo de la vía PAK, mediante el estado de fosforilación de LIMK1 y Cofilina en las líneas celulares CTb y CNh	91
<b>6.- Conclusiones</b>	94
<b>7.- Proyecciones</b>	97
<b>8.- Referencias</b>	98

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Tasa de prevalencia de Síndrome de Down en Chile	9
<b>Figura 2.</b> Esquema de la obtención del medio condicionado de la línea celular de tiroides murina UCHT1	16
<b>Figura 3.</b> Modelo murino trisómico Ts16	18
<b>Figura 4.</b> Descripción esquemática de la proteína de DSCAM	19
<b>Figura 5.</b> Interacciones hetero y homofílicas de DSCAM	21
<b>Figura 6.</b> Estructura general de la proteína PAK del grupo I	24
<b>Figura 7.</b> Diagrama esquemático de la autorregulación y activación de PAK1 por Cdc42	25
<b>Figura 8.</b> Niveles de proteína de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh	39
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de la proteína de DSCAM a nivel de superficie celular en las líneas CTb y CNh	41
<b>Figura 10.</b> Diferenciación de las líneas celulares CNh y CTb	43
<b>Figura 11.</b> Marcadores de proliferación y muerte celular	45
<b>Figura 12.</b> Análisis de marcadores neuronales específicos en las líneas celulares CNh y CTb	47
<b>Figura 13.</b> Análisis de DSCAM mediante IF en las líneas celulares CNh y CTb	49
<b>Figura 14.</b> Niveles de proteínas de DSCAM en condiciones de diferenciación celular en las líneas CTb y CNh	50
<b>Figura 15.</b> Expresión del mRNA de DSCAM en condiciones de diferenciación celular en las líneas CTb y CNh	51
<b>Figura 16.</b> Estudio morfológico del número de procesos en las líneas CTb y CNh	54
<b>Figura 17.</b> Estudio morfológico del largo total de los procesos en las líneas CTb y CNh	55

<b>Figura 18.</b> Estudio morfológico del número de procesos en las líneas CTb y CNh estimuladas con Netrina 1	57
<b>Figura 19.</b> Estudio morfológico del largo total de neuritas en las líneas CTb y CNh estimuladas con Netrina 1	57
<b>Figura 20.</b> Knockdown de DSCAM en la línea celular CTb	59
<b>Figura 21.</b> Estudio morfológico del número de procesos en la línea celular CTb con el Knockdown para DSCAM	61
<b>Figura 22.</b> Estudio morfológico del largo total de neuritas con el <i>Knockdown</i> para DSCAM en la línea celular CTb comparada a la línea control CNh	61
<b>Figura 23.</b> Niveles de proteína basales del grupo I de PAK en las líneas celulares CTb y CNh	64
<b>Figura 24.</b> Niveles de proteína de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh	66
<b>Figura 25.</b> Estado de activación de PAK1 en las líneas CTb y CNh	67
<b>Figura 26.</b> Estado de activación de PAK1 en las líneas CTb y CNh al estimular con Netrina 1	69
<b>Figura 27.</b> Estado de activación de PAK1 en la línea CTb con siRNA-DSCAM	71
<b>Figura 28.</b> Estado de activación de LIMK1 en las líneas CTb y CNh al estimular con Netrina 1	74
<b>Figura 29.</b> Estado de activación de LIMK1 en la línea CTb con siRNA-DSCAM	76
<b>Figura 30.</b> Estado de activación de Cofilina en las líneas CTb y CNh al estimular con Netrina 1	78
<b>Figura 31.</b> Estado de activación de Cofilina en la línea CTb con siRNA-DSCAM	80
<b>Figura 32.</b> Modelo propuesto de la sobreexpresión de DSCAM sobre la vía PAK en la línea celular CTb	96

## Abreviaciones

**AMPA:** Ácido -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

**APP:** Proteína precursora amiloidea

**bFGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos básico

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**Cdc42:** Proteína de control de la división celular homóloga 42

**cDNA:** DNA complementario

**CNh:** Línea celular normal de corteza cerebral de ratón

**CTb:** Línea celular trisómica de corteza cerebral de ratón

**DCX:** Doblecortina

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DMEM/F12:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient F-12*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Acido desoxirribonucleico

**Dock:** Proteína decicada a la citoquinesis

**DSCAM:** Molécula de Adhesión Celular del Síndrome de Down

**DSCR:** Región crítica del Síndrome de Down

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**FACS:** Citometría de flujo

**F-actina:** Filamentos de actina

**FBS:** Suero fetal bovino

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**FNIII:** Fibronectina tipo III

**GABA:** Ácido -aminobutírico

**G-actina:** Monómero de actina

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GFAP:** Proteína Fibrilar Acídica Glial

**GTPasa:** Trifosfatasa de guanosina  
**HEPES:** Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-(1)] etanosulfónico  
**IF:** Inmunofluorescencia  
**Ig:** Inmunoglobulina  
**KD:** *Knockdown*  
**LIMK1:** Quinasa 1 con dominio LIM  
**MAPK:** Quinasas activadas por mitógenos  
**MAP2:** Proteína Asociada a Microtúbulos 2  
**Nck:** Proteína adaptadora tirosina quinasa de la región no catalítica  
**NeuN:** Marcador Neuronal Nuclear  
**NFATc4:** Factor Nuclear de Células T Activadas citoplasmático 4  
**NMDA:** Acido N-metil-D-aspartico  
**PAK:** Quinasa activada por p21  
**PBD:** Dominio de unión a p21  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno  
**Rac1:** Proteína sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con Ras 1  
**RIPA:** Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**SD:** Síndrome de Down  
**SDS:** Dodecilsulfato sódico  
**SEM:** Error estándar medido  
**siRNA:** ARN pequeño de interferencia  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**Ts16:** Trisomía 16 murina  
**Tuj1:** Tubulina -III  
**UCHT1:** Medio condicionado inmortalizante de tiroides de rata  
**WB:** Inmunoblot

## Resumen

El Síndrome de Down se define como un desorden del desarrollo causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21, que va acompañado de anomalías multisistémicas principalmente a nivel del sistema nervioso central, generando una discapacidad cognitiva. Se ha descrito que el gen *dscam*, que codifica para la Molécula de Adhesión Celular del Síndrome de Down (DSCAM), presente en el cromosoma extra, actúa como una molécula de adhesión en el establecimiento y maduración de sinapsis y formación de nuevas redes neuronales a través de quinasas relacionadas directamente en procesos fisiológicos neuronales denominadas PAKs. Estas juegan un rol central en los mecanismos de señalización celular mediante LIMK1, la cual a su vez regula a Cofilina que reordenan el citoesqueleto en particular los filamentos de actina. En esta tesis se trabajó con líneas neuronales trisómicas de corteza cerebral de fetos de ratones Ts16, llamada CTb, y líneas control derivadas de un ratón normal de la misma camada llamada CNh, donde se desconocía la relación DSCAM-PAK sobre parámetros morfológicos neuronales. En este trabajo hipotetizamos que el aumento en la expresión de la proteína DSCAM en la línea celular CTb, en comparación con la línea normal CNh, produce una hiperactivación de PAK y sus efectores río abajo en la vía de señalización, lo que se traduce en una disminución del número y longitud de neuritas.

El objetivo general fue determinar los niveles de expresión del gen *dscam* y su acción sobre la activación de PAK, analizando parámetros morfológicos en la línea neuronal CTb, utilizando como control a la línea CNh. Los objetivos específicos fueron: 1) Cuantificar los niveles de expresión de DSCAM. 2) Estudiar parámetros morfológicos, número y longitud de neuritas. 3) Determinar el nivel de expresión de las proteínas PAK y su estado de activación. 4) Determinar la activación de blancos moleculares río abajo de la vía PAK como LIMK1 y Cofilina.

Se encontró en la línea CTb: 1) Un aumento en la expresión de DSCAM en comparación a la línea CNh, en condiciones basales de proliferación y diferenciación celular. 2) Menor complejidad neuronal, en cuanto al número y largo de sus neuritas en comparación a la línea normal. El *knockdown* para DSCAM en la línea CTb revirtió de manera parcial el fenotipo normal observado en CNh. 3) Las quinasas PAK se expresan de manera similar en ambas líneas celulares, con una mayor activación temporal de PAK1 en la línea CTb con respecto a CNh, tras activar DSCAM a través de su ligando específico, Netrina. La reducción de los niveles de DSCAM en la línea CTb a niveles comparables a aquellos de CNh, revierten la mayor activación de PAK1 inducida por Netrina. 4) Al igual que la activación temporal de LIMK1 y Cofilina.

En conclusión, en esta tesis se demuestra que DSCAM se encuentra sobrepresado en la condición trisómica, lo que lleva a una mayor sensibilidad de efectores transduccionales de la vía PAK, traduciéndose finalmente en una menor capacidad de extensión de procesos. Por lo tanto, en este trabajo identificamos un circuito regulador clave dentro de la patología del Síndrome de Down, donde PAK juega un rol relevante como potencial blanco terapéutico específico.

## Summary

Down syndrome is defined as a developmental disorder caused by the presence of an extra copy of chromosome 21, which is accompanied by multisystem anomalies mainly in the central nervous system, which translates into a feature cognitive impairment. A gene that has many implications for development is *dscam*, which encodes for the Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM), which is present in the triplicated chromosome and acts as an adhesion molecule in the establishment and maturation of synapses, formation of new neural networks through kinases called p21-activated kinases (PAKs). PAKs play a central role in cell signaling mechanisms by LIMK1, which in turn regulates Cofilin, that reorganizes the cytoskeleton in particular by governing actin filament dynamics. In this thesis, we worked with trisomic neural lines from cerebral cortex of fetal Ts16 mice, called CTb, and control lines derived from the same tissue of a euploid littermate called CNh, where DSCAM-PAK relationship on neural morphological parameters was unknown. In this work we hypothesized that the increased expression of DSCAM protein in the cell line CTb, compared to that of the normal line CNh, produces a hyperactivation of PAK and its effectors downstream in the signaling pathway, resulting in a decreased number and length of neurites.

The overall objective was focused on determining the expression levels of *dscam* gene and its effect on the activation of PAK, in terms of morphological parameters regulating the latter, in neuronal line CTb using as controls CNh line. The specific objectives were: 1) Quantification of DSCAM expression levels. 2) Study of morphological parameters, number and length of neurites. 3) Determination of the expression levels PAK proteins and their activation state; and 4) to determine the activation of downstream molecular targets of the PAK pathway, LIMK1 and Cofilin.



We found in line CTb: 1) An increase in the expression of DSCAM, compared to the CNh line at both basal proliferation and differentiation conditions. 2) Exhibits lower neuronal complexity by Sholl analysis, expressed in a reduced number as well as length of their neurites compared to the normal line. DSCAM *knockdown*, partially reversed to the normal phenotype observed in CNh cells. 3) PAK kinases were expressed similarly in both cell lines, but there is a greater temporal PAK1 activation in CTb line compared to on CNh cells, in response to DSCAM activation by its specific ligand Netrin. Upon knockdown-induced reduction of DSCAM levels in the CTb to levels comparable to those of CNh cells, the Netrin-induced activity of PAK1 is reduced to levels similar to those of CNh. 4) Similarly to the temporal activation way of LIMK1 and Cofilin.

In conclusion, this thesis shows that DSCAM is overexpressed in the trisomic condition, which in turn leads to an increased translational activation of effectors of PAK pathway, finally resulting in a lower capacity to extend processes. Therefore, we have identified a specific key regulator circuit in Down Syndrome pathology, where PAK could play an important role as a potential therapeutic target.

# 1.- Introducción

## 1.1.- Síndrome de Down

El Síndrome de Down (SD) se define como un desorden del desarrollo causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21, la cual puede ser completa o parcial. El SD presenta una incidencia de 1/800 nacidos vivos a nivel mundial, y a diferencia de otras condiciones hiperdiploides, puede sobrevivir la gestación. Más del 95% de los pacientes con SD poseen tres copias completas del cromosoma 21 (Ts21), mientras que el 5% restante presenta mosaicos o translocaciones, estas últimas generando trisomías parciales (Epstein, 1986a-b).

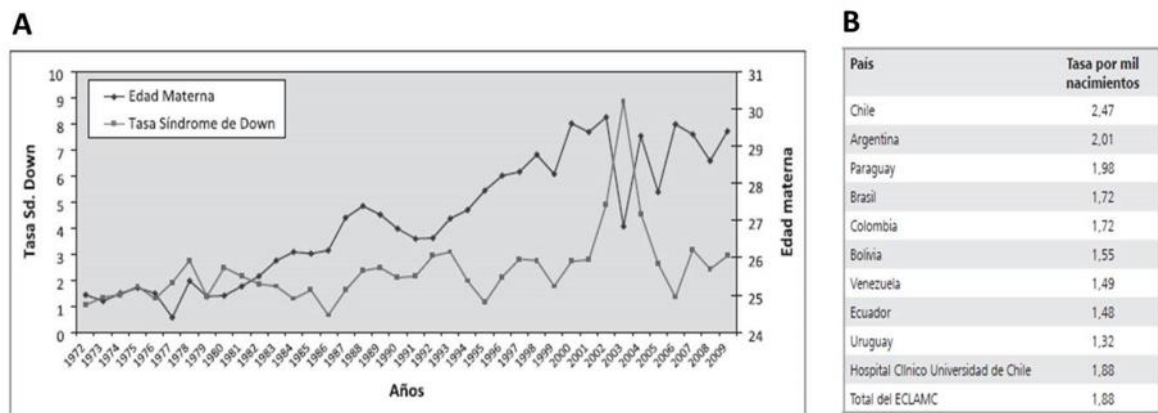
La presentación del síndrome va acompañada de anomalías multisistémicas como malformaciones cardíacas, intestinales, mayor incidencia de leucemias, y una relación directa con la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares, que son indistinguibles de aquellas presentes en la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Ault y cols., 1989; Epstein y cols., 1986a-b y 1991). Esta anomalía se presenta principalmente a nivel del sistema nervioso central (SNC), generando en una discapacidad cognitiva característica que se manifiesta a distintos niveles. Por un lado, se ha observado un deterioro en la memoria de largo plazo, particularmente en la adolescencia, alteración conductual sugerente

de disfunción hipocampal. Ello es consistente con estudios de resonancia magnética que muestran una reducción en los volúmenes hipocampales en estos pacientes. También existe evidencia de disfunciones en la corteza cerebral y cerebelosa, afectando principalmente al lenguaje y control de actividad motora voluntaria, respectivamente. Por otra parte, se ha visto un deterioro en el aprendizaje en estos pacientes, al enfrentar desafíos cognitivos. Sin embargo, todos estos defectos y su severidad son variables para cada paciente (Rachidi y Lopes, 2008).

En los últimos años, se han ensayado distintos tratamientos en estos pacientes (hormona tiroidea, hormona del crecimiento, ácido glutámico, dimetilsulfóxido, complejos vitamínicos y minerales, 5-hidroxitriptófano o piracetam) que no han mostrado efecto positivo significativo en el desarrollo motor, social, intelectual o de expresión verbal. No existe hasta la fecha ningún tratamiento farmacológico eficaz para tratar la discapacidad cognitiva en estos pacientes, fundamentalmente porque aún se desconocen sus bases celulares y moleculares (Epstein 1986b; Haxby, 1989; Schapiro y cols., 1989; Pulsifer, 1996; Park y cols., 2009).

En nuestro país, las tasas anuales de prevalencia de niños nacidos con SD han aumentado significativamente estos últimos años, donde Chile a nivel latinoamericano posee la tasa más alta, estimada en 2,47 por cada mil nacidos vivos, comparado con países como Argentina y Brasil que poseen un mayor

número de habitantes. Pudiendo influir en esto la existencia de diferentes etnias, pero el aumento de la edad materna se ha asociado como el principal factor de riesgo el cual ha sido demostrado en múltiples estudios, con una directa relación con la incidencia del SD (Nazer y Cifuentes, 2011) (Figura 1).



**Figura 1. A.** Evolución de las tasas anuales por 1000 con SD y promedio de edad materna. **B.** Tasas de prevalencia al nacimiento de SD en países sudamericanos, periodo 1998-2005 (Nazer y Cifuentes, 2011).

La condición trisómica es de particular interés para comprender como la expresión génica desregulada en el cerebro lleva a una función alterada y específicamente a un compromiso de funciones intelectuales (Dierssen y cols., 2009). En efecto, las alteraciones observadas en el SD se asocian a la sobreexpresión de varios genes localizados en el cromosoma 21. En teoría, los genes presentes en tres copias pueden estar sobreexpresados 1.5 veces, y se les conoce como genes dosis-sensible. Sin embargo, los mecanismos patogénicos a nivel molecular y asociados a dicha sobreexpresión prácticamente no se conocen (Delabar y cols, 1993; Hattori y cols., 2000).

## **1.2.- Anomalías en el desarrollo neuronal**

La discapacidad cognitiva en el SD es también una consecuencia de alteraciones que ocurren durante el desarrollo del cerebro, principalmente a nivel de la neurogénesis, diferenciación neuronal, mielinización, dendritogénesis y sinaptogénesis. Estas alteraciones neuronales se producen durante el periodo prenatal y postnatal temprano (Rachidi y Lopes, 2008). A este respecto, el desarrollo incompleto del árbol dendrítico es un signo típico del SD en la infancia (Weitzdoerfer y cols., 2001).

Morfológicamente, las anomalías dendríticas son las correlaciones anatómicas más consistentes con la discapacidad cognitiva (Fodale y cols., 2006). En efecto, los pacientes con SD exhiben una disminución en el volumen hipocampal, cerebeloso y de la corteza anterior, que incluyen el lóbulo frontal y temporal anterior. Estas alteraciones podrían estar implicadas en las disfunciones cognitivas y de comportamiento observadas en el SD (Rachidi y Lopes, 2008). Sin embargo, las evidencias morfológicas observadas en cerebros de fetos de jóvenes y adultos con SD son contradictorias, lo que ha llevado a pensar que la discapacidad cognitiva sería el reflejo de alteraciones funcionales más que estructurales, particularmente generadas en fases tempranas del desarrollo (Galdzicki y cols., 1998 y 2001).

Todo esto ha llevado al estudio de potenciales terapias *in útero* en modelos de ratón para el SD, donde se ha demostrado que diversas aproximaciones farmacológicas en estadios tempranos del desarrollo promueven la neurogénesis y mejoran la función cognitiva (Bianchi y cols., 2010).

### **1.3.- Consecuencias del desbalance génico**

Como es de suponer, la sobreexpresión se traduce en un desbalance génico cuya implicancia sobre la función cerebral se ha intentado explicar mediante dos hipótesis: La primera hipótesis es conocida como el “efecto de la dosis génica”, la cual postula que los efectos acumulativos de un aumento en la expresión y función específica de gran parte de los genes identificados en el cromosoma triplicado (o de una región cromosómica) son los responsables de las anomalías cerebrales y la discapacidad cognitiva observada. De esta manera, un grupo de genes en el cromosoma triplicado serían directamente responsables de las patologías asociadas con esta trisomía, como lo demuestran estudios en ratones transgénicos que sobreexpresan genes del cromosoma 21 humano (o sus ortólogos de ratón). En estos, es posible observar diversos fenotipos asociados al SD, como por ejemplo, patologías cardíacas, alteración de la morfología cráneo-facial, malformaciones del cerebelo y una deficiencia general de las funciones cognitivas (Olson y cols., 2004; Rachidi y Lopes, 2008).

Basados en esta hipótesis, se ha propuesto que para la manifestación del síndrome se requiere al menos la presencia en triplicado de una porción definida del brazo largo del cromosoma 21 (banda 21q22.1 a qter) denominada región crítica del SD (DSCR-1), la cual contiene aproximadamente 50 a 100 genes, los cuales han sido estudiados en diversos modelos animales de SD, que sustentan el fenotipo característico de la patología por la reproducibilidad de los resultados tanto estructurales como funcionales de pacientes con SD (Rahmani y cols., 1989; Epstein, 2006).

Ya que el aporte de la región crítica no es suficiente para explicar la totalidad de la fisiopatología del síndrome, ya que existen genes fuera de esta región que son relevantes en la patogenia de la enfermedad, surge una segunda hipótesis llamada “inestabilidad del desarrollo” la que sugiere que las anomalías observadas en el SD ocurren principalmente debido a la disrupción de la homeostasis génica, donde sería el número de genes triplicados lo que explicaría el fenotipo del SD, más que sus funciones específicas (Olson y cols., 2004; Dierssen y cols., 2009). En otras palabras, el concepto de región crítica propone que un pequeño número de genes dosis-sensibles tiene grandes efectos en el fenotipo cuando están triplicados. Por otro lado, la hipótesis de la inestabilidad del desarrollo considera que un pequeño efecto no específico de muchos genes puede perturbar notoriamente la homeostasis génica.

Considerando ambas teorías, se podría inferir que un gen triplicado, cuyo efecto en solitario es discreto, podría contribuir fuertemente al fenotipo trisómico en combinación con otros genes, basado en la especificidad de efectos e interacciones entre estos mismos genes (Olson y cols., 2004).

La disrupción de la homeostasis genética en estos pacientes, cuando no es letal, implica que sus células logran establecer un equilibrio que eventualmente es anómalo y que tiene un impacto fenotípico. Por lo tanto, la identificación de los genes involucrados en el marco de esta situación adaptativa es crucial para comprender estas patologías e identificar blancos moleculares con potencial terapéutico. Vale decir, para poder estudiar la participación de algún gen en la presentación del SD, se debe estudiar en el contexto de sobreexpresión generalizada u homeostasis alterada. Para ello, se ha recurrido a la técnica de *knockdown* con antisentidos y/o siRNA para normalizar la sobreexpresión de genes específicos asociados al SD, estudios que demuestran que es posible revertir los efectos sobre determinadas disfunciones neuronales, como por ejemplo, funciones colinérgicas alteradas, señalización anómala de  $Ca^{+2}$  intracelular (Cárdenas y cols., 1999). Además, sería indicativo de que un aumento en la dosis de ciertos genes altera específicamente las funciones descritas y potencialmente otras (Opazo y cols., 2006; Rojas y cols., 2008).



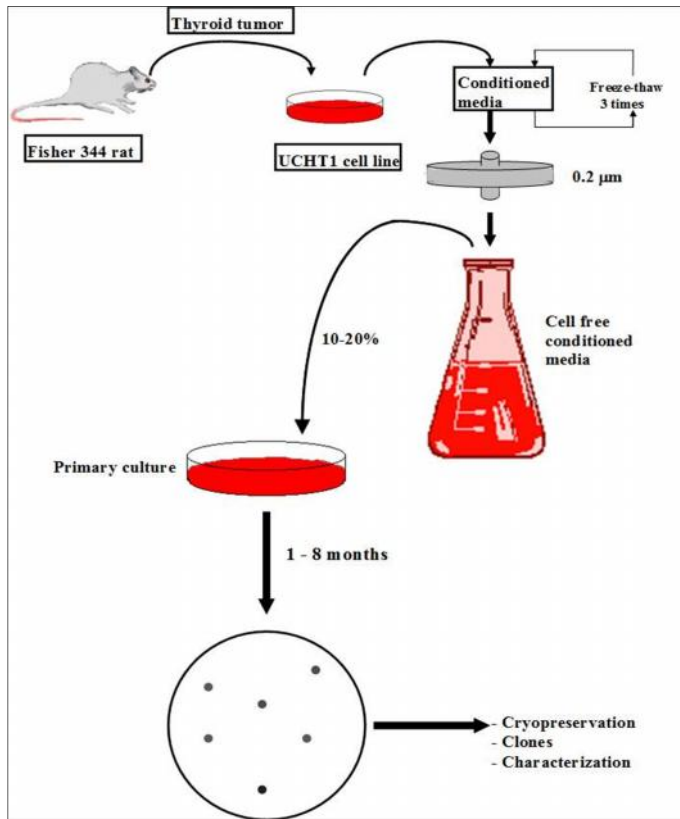
## 1.4.- Modelo celular para el estudio del SD

Debido a las implicancias de carácter tanto prácticas como éticas, la investigación fundamental sobre tejido humano es difícil. Es por ello que se ha recurrido al uso de modelos celulares desarrollados a partir de modelos animales, los cuales han aportado valiosa información (Reeves y cols, 1986).

Se han realizado varios estudios en neuronas de ratones con trisomía 16 (Ts16), modelo que mejor refleja la condición humana del SD debido a la similitud del cromosoma 16 murino con el autosoma 21 humano, particularmente en la porción distal del brazo largo (Oster-Granite, 1986), donde se ubican la mayor cantidad de genes relacionados con esta patología. Sin embargo, estos animales tienen la desventaja de no ser viables y mueren *in útero* entre los días 14 y 16 de gestación (Saud y col., 2006). Posteriormente, se fueron desarrollando otros modelos murinos trisómicos y transgénicos de SD que expresan un número más reducido de genes, y que son viables. Pero, estos últimos no otorgan el escenario completo de una sobreexpresión generalizada como es el caso de los modelos Ts65Dn y Ts1Cje, donde se pierden genes importantes del fenotipo de la patología como el de *app* (proteína precursora amiloidea) en este último modelo en particular (Haydar y Reeves, 2012; Créau, 2012).

A ello se agregan dificultades involucradas en la producción y mantención de estos modelos trisómicos murinos y a la cantidad limitada de tejido procurable (Ault y cols., 1989). Para sobrellevar estas limitaciones, se han establecido líneas celulares neuronales inmortalizadas derivadas de diversas regiones del sistema nervioso del ratón Ts16, con un método original denominado protocolo UCHT1, desarrollado en nuestro laboratorio, con el objeto de estudiar *in vitro* la participación de cada gen trisómico en el desarrollo del síndrome (Cárdenas y cols., 1999; Arriagada y cols., 2007).

Este método se describe en la figura 2, y se basa en la actividad inmortalizante del medio condicionado por la línea celular de la tiroides UCHT1, derivada de una rata Fisher 344 adulta. La exposición de cultivos primarios al medio condicionado UCHT1 induce la aparición de focos de transformación con rápida proliferación tras períodos variables de tiempo, señalando el establecimiento de una línea celular. Con este método, se han establecido numerosas líneas celulares que se han constituido en modelos de función y disfunción celular.

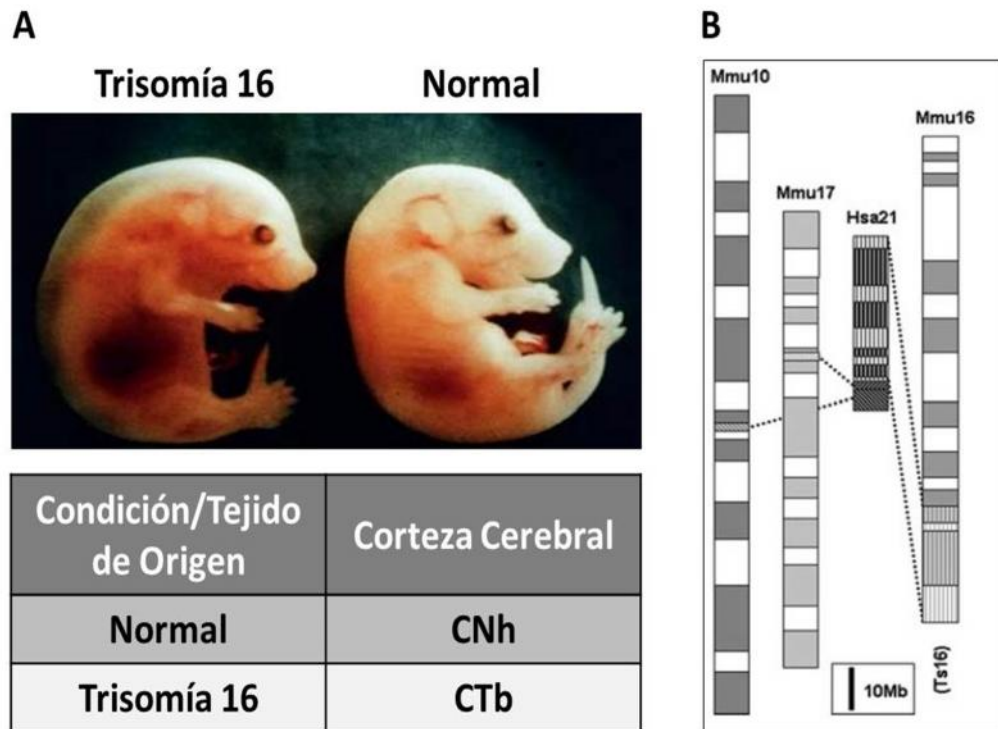


**Figura 2.** Esquema de la obtención del medio condicionado de la línea celular de tiroides murina UCHT1 y su actividad inmortalizante sobre cultivos celulares primarios (Patente N° US 2008/0089865).

Usando este mismo protocolo, se han establecido exitosamente ocho líneas neuronales de ratones fetales Ts16 y normales, provenientes de corteza cerebral, hipocampo, médula espinal y ganglio de la raíz dorsal. En las líneas derivadas de ratón Ts16, todas las cuales retienen función neuronal (Allen y cols, 2000,2002; Cárdenas y cols, 1999, 2002a y b) se han observado alteraciones en la amplitud y la cinética de las señales del calcio inducidas por neurotransmisores como glutamato, NMDA, AMPA, nicotina y GABA, todas comparables a aquellas observadas en los estudios similares realizados en cultivos primarios (Schuchman y cols, 1998; Cárdenas y cols, 2002). Además, las mismas disfunciones colinérgicas previamente descritas en neuronas

centrales cultivadas del modelo Ts16 (Fiedler y cols, 1994) se reproducen en las líneas celulares trisómicas derivadas de territorios similares (Allen y cols, 2000, 2002; Cárdenas y cols, 2002a y b).

Estos resultados indican que dichas líneas trisómicas preservan rasgos, y en particular las disfunciones, del fenotipo original. Además, estudios de Western-blot y RT-PCR han documentado la sobreexpresión de genes relacionados con el SD en las líneas celulares trisómicas (Opazo y cols, 2006, Rojas y cols, 2008), una situación que se refleja en la trisomía 21 humana (Epstein, 1986a y b). Es por esto que en este proyecto se propone trabajar con líneas neuronales trisómicas de corteza cerebral de fetos de ratones Ts16, llamada CTb, y líneas control derivadas de un ratón normal de la misma camada, llamada CNh (figura 3).



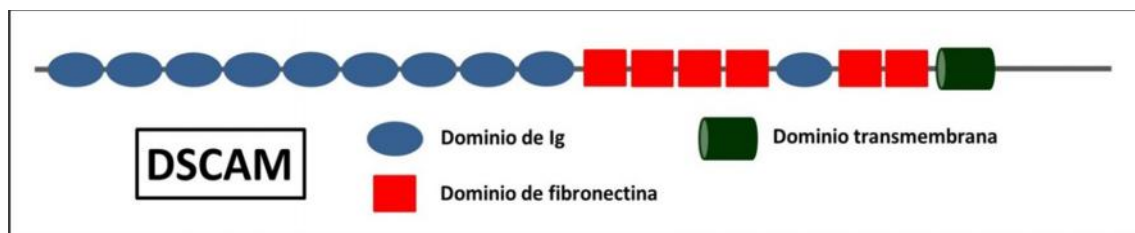
**Figura3. A.** Fenotipo de las camadas normales balanceadas y trisómica 16 generadas a partir de translocaciones Robertsonianas y las líneas celulares generadas de estas condiciones según tejido de origen. **B.** Representación esquemática de las porciones que comparten los cromosomas humanos (Mmu10-17-21) con el 16 murino (Hattori y cols, 2000).

Por lo descrito anteriormente, es probable que en el SD y en los modelos animales correspondientes, la causa de las múltiples disfunciones neuronales reside en una sobreexpresión de genes tanto de la región crítica del SD como también de otras regiones del cromosoma y de su interacción con otros genes de su genoma, y como esta patología ha sido categorizada como una enfermedad del desarrollo, al igual que una que compromete la función neuronal (Saud y cols., 2006), esto ha llevado en nuestro laboratorio a la

búsqueda y estudio de genes relacionados con la trisomía que regulen el desarrollo, en particular del sistema nervioso. A este respecto, un gen que tiene grandes implicancias en el desarrollo, función neuronal y que se encuentra en la región crítica del SD, es *dscam*, que codifica para la molécula de adhesión celular del Síndrome de Down (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule, DSCAM).

### 1.5.- Rol de DSCAM en la función neuronal

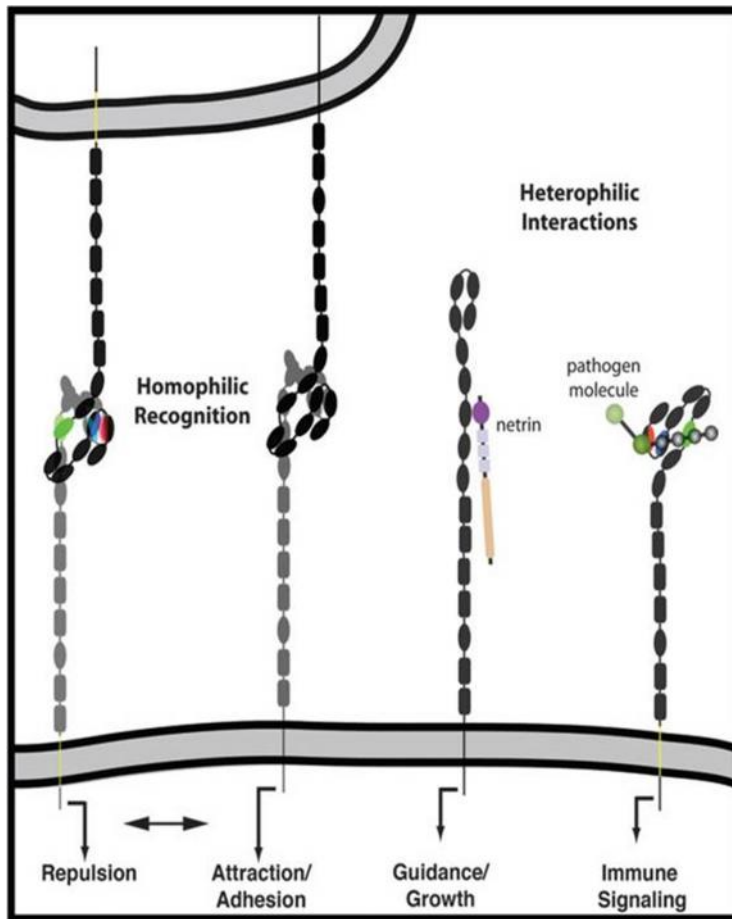
DSCAM es una proteína transmembrana del tipo I que actúa como receptor de superficie celular y que presenta alta homología a proteínas de la superfamilia de la Inmunoglobulinas (Ig), de multidominios extracelulares que van desde su amino terminal, con nueve dominios de Ig, cuatro de fibronectina III (FNIII), otro de Ig y dos adicionales de FNIII, estructura que ha sido conservada con más del 20% de identidad en su secuencia aminoacídica entre varias especies, asumiendo por estudios genéticos, tener un gen homólogo ancestral común (figura 4) (Schmucker, 2007).



**Figura 4.** Descripción esquemática de la proteína de DSCAM, con sus diferentes dominios tipo-C2 Ig, fibronectina tipo III y transmembrana.

Se ha reportado que DSCAM se expresa principalmente en el cerebro, donde su particular patrón de expresión sugiere que juega un importante rol en la formación de circuitos neuronales, actuando como una molécula de adhesión, donde interviene en varios estadios del desarrollo neuronal (Jia y cols., 2011). Tales efectos van desde funciones en el desarrollo temprano (migración, regeneración y diferenciación) hasta el establecimiento y maduración de sinapsis (Hattori y cols., 2008) y formación de nuevas redes neuronales (Chen y cols., 2006; Millard y Zipursky, 2008).

Estudios recientes de *knockout* de este gen en ratones muestran que DSCAM tiene un rol crítico en la sincronización del centro respiratorio, en forma dependiente de dosis génica. Por otra parte, estudios en *Drosophila* han demostrado el rol fundamental de DSCAM en la extensión y guía axonal, principalmente por mecanismos de repulsión homofílicas. Este mismo reconocimiento homofílico se da en mamíferos dependiendo del contexto biológico, como el establecimiento del blanco sináptico de neuritas, donde tiene un rol preponderante en la señal de atracción/adhesión más que repulsión (Schmucker y Chen, 2009). Además, DSCAM es capaz de reconocer proteínas de la matriz extracelular como Netrina, llevando al establecimiento y mantención de la red neuronal y correcta guía axonal (Lai y cols, 2011; Rajasekharan y Kennedy, 2009; Liu y cols, 2009) (figura 5).



**Figura 5.** Interacciones hetero y homofílicas de DSCAM para iniciar la señalización de múltiples funciones neuronales (Schmucker, 2009).

Considerando los múltiples blancos de DSCAM en mecanismos neuronales críticos, los que van desde eventos tempranos del desarrollo hasta la completa diferenciación, existen antecedentes que sugieren fuertemente que su sobreexpresión puede jugar un rol relevante en el desarrollo del SNC en pacientes con SD, tal como en su consiguiente demencia relacionada al Alzheimer en la adultez (Rapoport, 1988; Jia y cols., 2011).



Esta proteína permanece altamente expresada en neuronas de cerebro con SD independiente de la edad del paciente, mientras que en cerebros normales esta expresión tiende a disminuir (Saito y cols., 2000). Saito y cols. (2000) reportaron además que en cerebros de pacientes mayores con EA, DSCAM se localiza en estructuras asociadas con placas seniles. El efecto de este vínculo no es claro, pudiendo ser un mecanismo compensatorio contra la degeneración asociada a la enfermedad, lo que se ha visto además ratificado en modelos murinos de EA, con una mayor expresión de DSCAM en ratones transgénicos para APP. Sin embargo, también es posible que DSCAM pueda representar un factor de progresión de estos últimos procesos (Jia y cols., 2011; Head y cols., 2007).

Existen estudios que han demostrado la sobreexpresión de DSCAM en pacientes con SD, con un incremento del 20% de expresión en fetos con SD comparados a controles euploides (Bahn y cols., 2002). A nivel morfológico, la sobreexpresión de esta proteína en neuronas hipocampales de modelos murinos se asocia a una disminución de la complejidad dendrítica en cuanto su arborización, evaluado por el número y largo de sus neuritas, los cuales se ven fuertemente reducidos, afectando claramente con ello el adecuado establecimiento de una red neuronal (Alves-Sampaio y cols., 2010).

En *Drosophila*, se ha demostrado también que DSCAM activa un grupo de quinasas relacionadas directamente en procesos fisiológicos neuronales

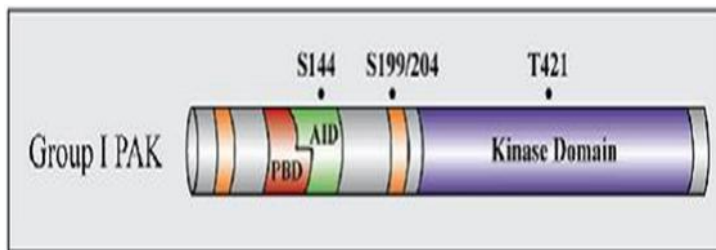
(polaridad y migración neuronal, extensión de neuritas), denominadas quinasas PAK (del inglés, p21-activated kinases), a través del adaptador Dock, homólogo a Nck (Schmucker y cols., 2000), mientras que en mamíferos, aún se desconoce si esta interacción es directa o a través de algún otra molécula adaptadora.

### **1.6.- Señalización PAK en la fisiología neuronal**

Las quinasas PAK son proteínas serina/treonina quinasas, que juegan un rol central en los mecanismos de señalización celular y plasticidad neuronal, siendo la principal quinasa efectora de las pequeñas Rho GTPasas. Se caracterizan por la presencia de un dominio conservado quinasa carboxilo terminal y una región amino terminal no catalítica que contiene un dominio de unión a p21 (PBD) (figura 6), por el cual se une a las GTPasas de la familia Rac1 y Cdc42 (Kreis y Barnier, 2009).

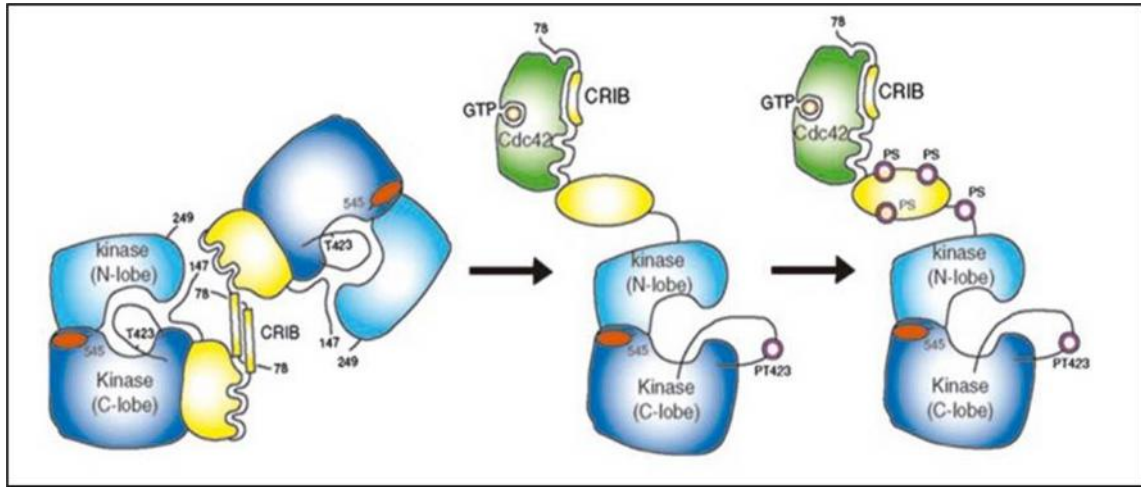
Debido a su alta identidad en la secuencia aminoacídica, propiedades estructurales y bioquímicas, tres de estas quinasas, PAK1, PAK2 y PAK3, conforman el grupo I de estas enzimas. De ellas, PAK1 y PAK3 están fuertemente expresadas en el cerebro (Arias-Romero y Chernoff, 2008), con un rol clave en la ontogénesis cerebral, diferenciación neuronal y plasticidad sináptica, mediante reordenamiento del citoesqueleto a través de diversas vías, como por ejemplo la fosforilación directa de la quinasa LIMK1, la cual a su vez

regula a Cofilina, proteína encargada de la despolimerización de los filamentos de actina (F-actina) (Pontrello y Ethell, 2009; Shi y cols., 2009). Consecuentemente, una desregulación de la vía PAK conduce a alteraciones en el desarrollo neuronal como patologías neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, o discapacidad cognitiva (Kreis y Barnier, 2009).



**Figura 6.** Estructura general de la proteína PAK del grupo I, con un dominio quinasa en su mitad carboxilo y su dominio regulatorio en su parte amino, donde se denota con círculos negros los sitios específicos de fosforilación. (Kreis y Barnier, 2009).

La activación de estas quinasas es variada, pudiendo ser por la unión de GTPasas, que van a desestabilizar los dímeros formados por estas enzimas, cambiando su estado conformacional y exponiendo su sitio catalítico (figura 7). Otros mecanismos de activación incluyen autofosforilaciones, asociación con receptores específicos de membrana, diversos tipos de lípidos, u otras quinasas o fosfatasas, gatillando finalmente vías de señalización intracelular que regulan la reorganización del citoesqueleto y la expresión de genes específicos a través de las MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Bokoch, 2003).



**Figura 7.** Diagrama esquemático de la autorregulación y activación de PAK1 por Cdc42. PAK1 en estado inactivo forma dímeros, por su interacción entre el segmento autoregulatorio de uno con el dominio quinasa del otro. Cdc42 o Rac se unen a la secuencia CRIB de la región autorregulatoria, disociando con ello el dímero y desbloqueando los dominios quinasa. Fosforilación del loop de activación, activa completamente a la enzima. Otras fosforilaciones en la región regulatoria prevendrían la reversibilidad de estos pasos, incluso si las GTPasas se disociaran (Bokoch, 2003).

Se ha visto también que la inhibición de las quinasas PAK del grupo I determina alteraciones en la plasticidad sináptica y anomalías en las espinas dendríticas, ya sea en su número, como en su maduración (Hayashi y cols., 2004; Ma y cols, 2008). A su vez, mutaciones de PAK3 conducen a cuadros de discapacidad cognitiva no sindrómica (Allen y cols., 1998).

Por otra parte, diversos grupos de investigación han reportado el rol esencial que cumple DSCAM, junto con PAK, en la formación de la guía axonal en el sistema nervioso central, durante la generación del axón en *Drosophila* o la arborización neural en modelos murinos (Schmucker D. y cols, 2000).

## 1.7.- Regulación de PAK por DSCAM

DSCAM, como se mencionó anteriormente, interacciona con PAK a través de adaptadores moleculares, provocando la activación de estas enzimas y sus efectores río abajo en la vía de señalización. Estos datos sugirieron fuertemente que las quinasas PAK podían estar reguladas por DSCAM, la que por su parte, está más expresada en cerebros de pacientes con SD, pudiendo llevar a una sobreactivación de estas quinasas en este cuadro patológico, provocando reordenamientos del citoesqueleto mediante cambios de polimerización en los filamentos de actina (Allen y cols, 2009).

De lo anterior, surgió una pregunta crucial, cual es saber si la actividad de las quinasas PAK se encontraba efectivamente desregulada en nuestro modelo de la trisomía debido a una mayor expresión de DSCAM, llevándola consecuentemente a una hiperactivación que alteraría las vías de señalización que regulan procesos morfológicos neuronales. Este mecanismo que no ha sido esclarecido en la condición patológica del SD, y ello podría hipotéticamente reflejarse en una menor capacidad de extender procesos, ya sea en número como en longitud.

Por lo tanto, es importante el esclarecer si la sobreexpresión de DSCAM, en este modelo en particular de SD, juega un rol en la formación, desarrollo y extensión de procesos celulares, en particular por su asociación con PAK.

Así, en este trabajo se evaluó el rol que cumple DSCAM en la línea trisómica CTb y la línea control CNh, incluida su vía transduccional DSCAM-PAK, como LIMK1 y Cofilina, que regulan el reordenamiento del citoesqueleto, podría contribuir en la identificación de nuevos blancos terapéuticos a nivel celular para la patología del SD.

## **2.- Hipótesis y Objetivos**

### **2.1.- Hipótesis**

El aumento en la expresión de la proteína DSCAM en la línea celular CTb, en comparación con la línea normal CNh, produce una mayor activación de PAK y sus efectores río abajo en la vía de señalización, lo que se traduce en una disminución del número y longitud de neuritas

### **2.2.- Objetivo General**

Determinar los niveles de expresión del gen *dscam* y su acción sobre la activación de PAK, en cuanto a parámetros morfológicos que regula esta última, en la línea neuronal CTb, utilizando como control a la línea CNh

### **2.3.- Objetivos Específicos**

1.- Cuantificar los niveles de expresión de DSCAM en las células CTb, utilizando la línea CNh como control, en condiciones basales de proliferación y diferenciación celular.

2.- Estudiar parámetros morfológicos, como el número y longitud de neuritas, en las líneas CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular.

3.- Determinar el nivel de expresión de las proteínas PAK del grupo I y su activación, mediante el estado de fosforilación, en condiciones basales de proliferación y diferenciación, en las líneas celulares CTb y CNh.

4.- Determinar la activación de blancos moleculares río abajo de la vía PAK, mediante el estado de fosforilación de LIMK1 y Cofilina en las líneas celulares CTb y CNh.



## **3.- Materiales y Métodos**

### **3.1.- Modelo Celular**

Se utilizaron líneas celulares neuronales derivadas de ratones normales y trisómicos (Ts16). Las células fueron extraídas de la corteza cerebral normal (CNh) y trisómica (CTb). Las células fueron cultivadas usando el medio de cultivo celular DMEM/F12 (GIBCO®), suplementado con 15 mM de HEPES, 1 g/lit de bicarbonato, Gentamicina 40 mg/lit y Ketoconazol 5 mg/lit, 10% de suero bovino adulto y 2,5% de suero fetal bovino. Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora a 37°C, con 100% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> atmosférico. El recambio de medio fue cada 48 horas.

### **3.2.- Diferenciación Celular**

Para la diferenciación morfológica tipo neuronal, ambas líneas celulares fueron cultivadas usando el medio Neurobasal/B-27 (GIBCO®), Ketoconazol 5 mg/lit, suplementado con Forskolina 10 µM y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) 100 ng/ml (Prospec-Tany). Donde el criterio morfológico de diferenciación fue adoptado como aquella célula que presentase al menos dos procesos tipo neuritas y que estos sobrepasen el largo del radio del soma desde la superficie celular, hasta las 72 horas bajo estas condiciones de cultivo. Adicionalmente, para ciertos ensayos morfológicos y de señalización

celular se utilizó el ligando específico de DSCAM, Netrina 1, con el cual se estimularon las líneas celulares desde el cambio de medio con Neurobasal/B-27, utilizando el péptido murino de Netrina 1 (500 ng/ml, ab91607, Abcam).

### **3.3.- Ensayo de Proliferación y Viabilidad Celular**

Se evaluaron los porcentajes de proliferación y viabilidad celular en condiciones de crecimiento en medio normal (DMEM/F12) y diferenciación (Neurobasal/B-27) para ambas líneas celulares. Para el primer ensayo de proliferación se utilizó el marcador Ki-67 (FITC Mouse Anti-Human Ki-67 Set, Cat. 556026), siguiendo las indicaciones del fabricante (BD Pharmingen), en el cual las células fijadas con etanol 75%, se incubaron por 30 minutos con el anticuerpo conjugado con FITC (Mouse IgG1, Isotype Control), para ser cuantificado mediante Citometría de flujo (FACS). El ensayo de viabilidad se llevó a cabo con el marcador eFluor® 780 (Fixable Viability Dye eFluor® 780, Cat. N° 650865) según protocolo del fabricante (Affymetrix eBioscience), las líneas celulares se incubaron por 30 minutos con el FVD eFluor® 780, el cual se cuantificó mediante Citometría de flujo (FACS).

### **3.4.- Análisis por Microscopía**

Para el análisis morfométrico, número y longitud de neuritas, se utilizó microscopía de campo claro (Modelo: MI-535, Lieder). La cuantificación del número y largo de neuritas, se realizó en diferentes campos por placa o

condición, con una distribución en H o Z, con un mínimo de siete de estos campos, adquiridos mediante una cámara INFINITY X-32C (Lumenera) los cuales se analizaron bajo una matriz o plantilla de anillos concéntricos (análisis de Sholl), de distancia conservada entre ellos (5  $\mu\text{m}$ ) con respecto a la distancia del radio del soma neuronal como referencia para el primer anillo medido desde la superficie celular, creando pseudoimágenes para mejorar el contraste y así medir el radio del soma y largo de cada proceso, utilizando el programa NeuronJ (ImageJ plugin).

### **3.5.- Inmunoblot**

Para realizar los inmunoblots, se removió el medio a las células CNh y CTb, para luego lavarlas con PBS. Posteriormente, las células se lisaron en un tampón RIPA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, NP-40 1% v/v, desoxicolato de sodio 1% p/v, SDS 0,1% v/v, pH final 7,4) en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (Cat. N° 05892791001, Roche®) y fosfatasas (Cat. N° 04906837001, Roche®), para luego ser homogenizadas con un sonicador de vástago (Microson) a 14 Watts por 10 segundos. La concentración de proteínas fue determinada con el método de Bradford, siguiendo las especificaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories). A un volumen determinado de proteínas se le agregó tampón de carga, conteniendo este último SDS 20% y  $\beta$ -mercaptoetanol, para luego ser denaturadas por calor (5 minutos a 100 °C). Posteriormente, una cantidad de 20  $\mu\text{g}$  proteína total para

cada muestra se cargó y corrió en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de porcentaje variable según el tamaño de la proteína a identificar, utilizando la solución de tampones para la porción concentradora (5%) y separadora (10%). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa o PVDF y luego teñidas con una solución de rojo Ponceau S al 1%. La membrana se lavó con una solución de TBS-Tween-20 al 0,1% (5M NaCl, 1M Tris/HCl pH 7,5 y 0,1% Tween-20) y bloqueada toda la noche con leche descremada al 5% o BSA 4% en TBS-Tween-20 al 0,1%, para luego ser incubada con los anticuerpos primarios (DSCAM ab85362, PAK1 ab40852, PAK2 ab76293, PAK3 ab40808, pPAK1-S204 ab79503, LIMK1 ab117623, pLIMK1-T508 ab38508, Cofilina ab42824, pCofilina-S3 ab12866 y Tubulina ab11308, Abcam) y secundarios (ab6802 y ab6820, Abcam) diluidos en TBS-Tween-20 al 0,1% por 2 y 1 hora, respectivamente, lavándose la membrana con TBS-Tween-20 al 0,1% por 30 minutos entre y después de la incubación con los anticuerpos. Finalmente, la membrana se reveló con el reactivo quimioluminiscente ECL de Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). El análisis densitométrico de las bandas inmunoreactivas se realizó con el software UN-SCAN-IT gel 6.1.

### **3.6.- Citometría de Flujo**

Para determinar la expresión de proteínas específicas en la superficie celular, se utilizaron  $1 \times 10^5$  células, las cuales fueron recuperadas con una

solución de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 25 mM en PBS. Las células se lavaron dos veces con una solución de PBS y luego se incubaron por 30 minutos con PBS-BSA 2%, con el propósito de bloquear los sitios de unión inespecífica. Luego, se lavaron con PBS y se incubaron por una hora con el anticuerpo primario (DSCAM ab85362, Abcam), diluido en PBS-BSA 2%, posteriormente se lavaron dos veces con PBS, para luego ser incubadas por media hora con el anticuerpo secundario (ab96919, Abcam). Finalizada la incubación, las células se lavaron nuevamente dos veces con PBS, para ser fijadas en p-formaldehído al 2% diluido en PBS. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Canto A (BD Bioscience) y se analizaron usando el programa WinMD versión 2.9. Los análisis se realizaron con al menos 10.000 eventos a partir de la población total y todos los datos fueron corregidos por los controles de autofluorescencia y por la unión inespecífica de cada anticuerpo.

### **3.7.- Extracción de RNA**

Las células fueron lisadas directamente en la placa, añadiendo 1 ml de TRIsure (BIO-38032, BIOLINE) por 10 cm<sup>2</sup> de área, asegurando una suficiente ruptura celular, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se aisló el RNA por separación de fases utilizando cloroformo, precipitando con isopropanol, para lavar posteriormente con etanol 75% y resuspender en agua tratada con DEPC. Finalizado el proceso, se determinó la concentración y

pureza del RNA mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm. La calidad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **3.8.- PCR en tiempo real**

A partir de 1 µg de RNA obtenido en el proceso anterior, se realizó la transcripción inversa utilizando un kit de acuerdo a las indicaciones establecidas por el fabricante (Cat. N°. 18080-051, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). A partir del DNA complementario (cDNA) obtenido se realizó la reacción de qPCR, utilizando como agente fluorescente el kit FAST SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), en conjunto con partidores específicos para el gen de *dscam*: FW 5'-CAGCGTCAGCCCATCACAAGA-3', RV 5'-GATGGTGAACCTTGGCATGCCT-3', y como gen control el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*): FW 5'-AACTCCCACTCTTCCACCTT-3', RV 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3' (Integrated DNA Technologies). Utilizando un termociclador en tiempo real (Modelo Mx3000P, Stratagene), analizando los resultados mediante el programa MxPro v2.0.

### **3.9.- Transfección Transitoria**

Las transfecciones se realizaron con el reactivo Lipofectamina® 2000 (Invitrogen) según especifica el fabricante, con el fin de llevar a cabo el *Knockdown* del transcrito de *dscam* de la línea celular CTb. En primer lugar, se realizó una mezcla que incluyó: Opti-MEM® (Reduced Serum Medium, Gibco),

el siRNA-DSCAM (sc-77183) o siRNA-Control (sc-37007) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y Lipofectamina® 2000, incubados por 40 minutos, para luego agregar la mezcla a las placas con Opti-MEM® por 5 horas, y después cambiar el medio por DMEM/F12. Posteriormente se verificó la cantidad proteica específica a diferentes tiempos mediante Inmunoblot y Citometría de flujo.

### **3.10.- Inmunofluorescencia**

Las células fueron sembradas en placas con cubreobjetos tratados previamente con HISTOGRIP (Invitrogen), las que fueron mantenidas en diferentes condiciones, medio normal o de diferenciación. Al término del tratamiento fueron lavadas con PBS, fijadas con p-formaldehído al 4% por 5 minutos a temperatura ambiente, bloqueadas y permeabilizadas por 16 horas a 4°C en una solución: BSA 1%, Triton-X100 0,025% y NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, disueltos en PBS. Luego se incubaron por otras 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo, que reconocen marcadores neuronales como NeuN (ab104225), MAP2 (ab32454), DCX (ab11800) y Tuj1 (ab18207), un marcador glial GFAP (ab7260) y el receptor DSCAM (ab85362, Abcam). Posteriormente los cubreobjetos se lavaron con PBS, y luego se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos por 45 minutos a temperatura ambiente en la solución de bloqueo. Finalizada la incubación, se lavaron 3 veces con PBS, donde en el segundo lavado se

incubó por 5 minutos con el marcador nuclear Hoechst (1 mg/ml), depositándose sobre portaobjetos utilizando un medio de montaje fluorescente (Cat. S3023, Dako) previo al análisis en un microscopio de fluorescencia (Modelo: BX-UCB, Olympus).

### **3.11.- Análisis Densitométrico**

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los Western blots se realizó utilizando el programa de digitalización de geles UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific Inc., Orem, Utah, USA).

### **3.12.- Análisis Estadístico**

Los datos en este trabajo se representan como el promedio  $\pm$  error estándar medido (SEM). La significancia estadística entre los grupos de datos fue determinada mediante análisis de varianza ANOVA, seguido de un test post-hoc (Tukey o Mann-Whitney) para valores de  $p$  0,05. El análisis de la relación entre variables se realizó mediante el programa GraphPad Prism 6 (Software, Inc., California, USA).



## **4.- Resultados**

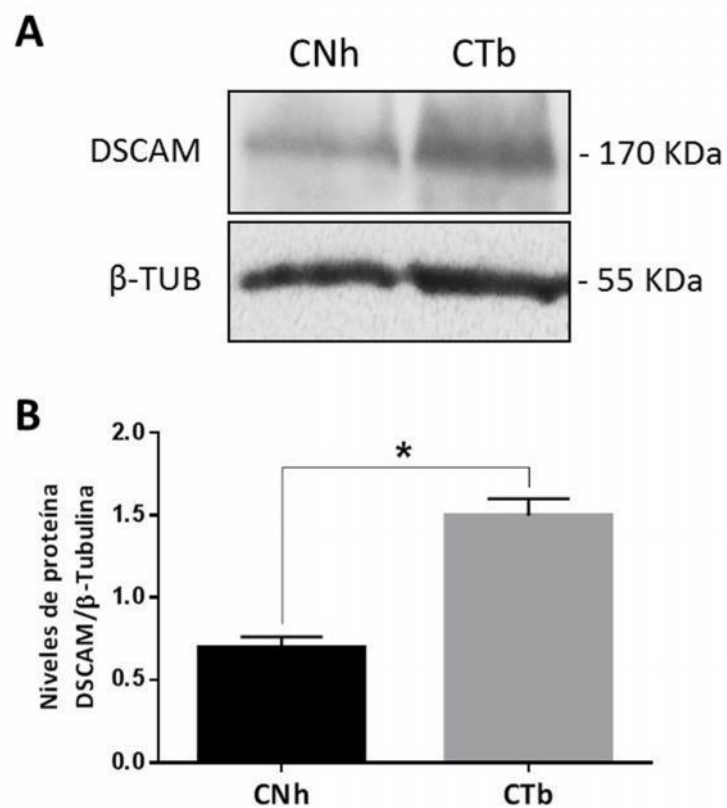
### **4.1.- Cuantificación de los niveles de expresión de DSCAM en la línea celular CTb, utilizando la línea CNh como control, en condiciones basales de proliferación y diferenciación celular**

#### **4.1.1.- Análisis de los niveles basales de expresión de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh**

Se realizó la cuantificación relativa de los niveles basales de la proteína de DSCAM en condiciones normales de proliferación, verificando con ello de manera preliminar si en nuestro modelo celular de la patología del SD existía una mayor abundancia con respecto a su control, validando de esta manera el primer enunciado de la hipótesis propuesta, que propone a la sobreexpresión de DSCAM como la causante o a la que se le atribuye en mayor medida la desregulación de PAK y su vía transduccional relacionada al reordenamiento del citoesqueleto, principalmente con las dinámicas de actina.

Para ello se utilizaron las líneas celulares CTb (trisómica) y CNh (normal) en condiciones de cultivo estándar de proliferación de nuestro laboratorio, ya descritas en Materiales y Métodos (DMEM/F12 suplementado con 10% de suero bovino adulto y 2,5% de suero fetal bovino), llegando a una confluencia en la placa de cultivo de alrededor de un 70% para ambas líneas, en las cuales se observó la presencia de la proteína en el lisado celular mediante Western

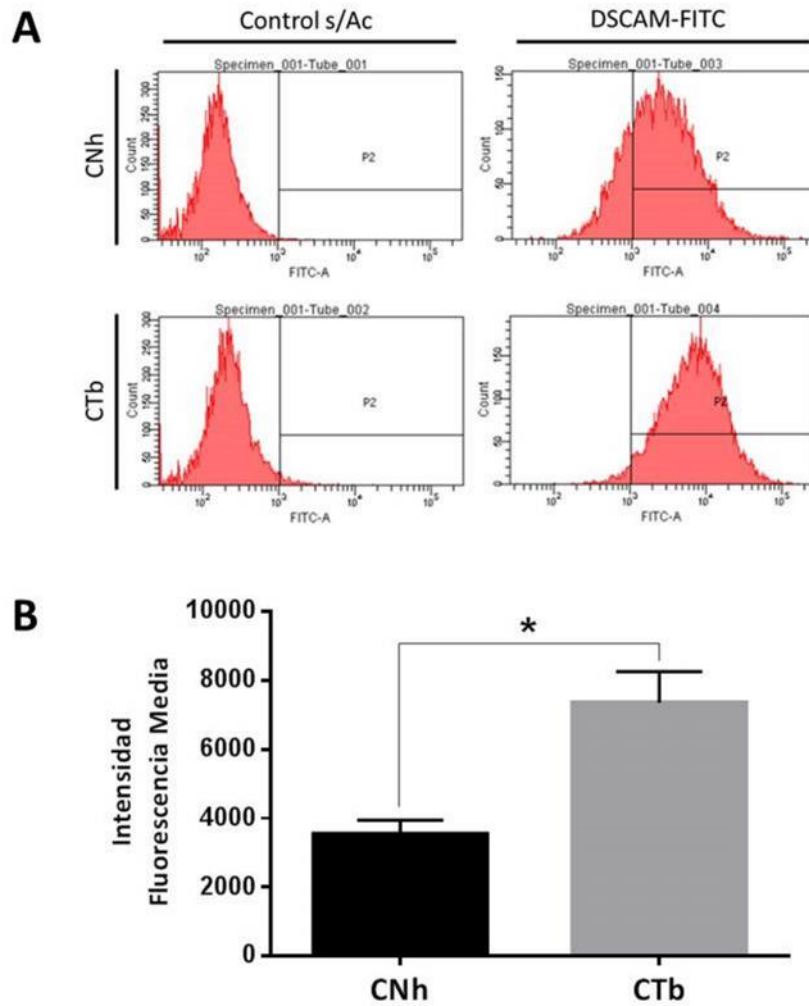
blot. La figura 8 muestra la existencia de una mayor abundancia de DSCAM, cuantificada en el doble, en la línea CTb en relación a la línea control CNh (figura 8).



**Figura 8. Niveles de proteína de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh. A)** Western blot representativo de la abundancia de la proteína DSCAM, en condiciones basales de proliferación celular, normalizada a  $\beta$ -Tubulina. **B)** Gráfico de la cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los píxeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Mann Whitney test, (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

De manera paralela y bajo las mismas condiciones de cultivo celular descritas en el ensayo anterior, se cuantificó los niveles de la proteína de DSCAM en ambas líneas celulares, pero en esta ocasión a nivel de superficie celular, dado su rol fisiológico de receptor de transmembrana descrito a este nivel subcelular, donde reconoce ligandos específicos que gatillan vías transduccionales involucradas en la correcta guía axonal, adhesión, repulsión y arborización dendrítica (Ly y cols, 2008; Zhu y cols, 2013).

Para este ensayo experimental se utilizó Citometría de Flujo, en el que las muestras celulares se obtuvieron inicialmente por la incubación con EDTA sin tripsina, con el fin de desprenderlas de la superficie de la placa de cultivo y no perder proteína de membrana que pudiese ser pesquisada por el equipo. Este estudio arrojó como señal positiva, la intensidad de fluorescencia media por parte del anticuerpo específico contra DSCAM para ambas líneas celulares sin permeabilizarlas. De manera similar al resultado por Western blot en los lisados totales, se apreció una mayor presencia de DSCAM a nivel de superficie celular en la línea trisómica CTb, con respecto a la línea normal CNh (figura 9), confirmando junto al primer ensayo que bajo condiciones normales de proliferación, tenemos en nuestro modelo celular del SD un incremento significativo de la proteína de DSCAM con respecto a la condición normal.

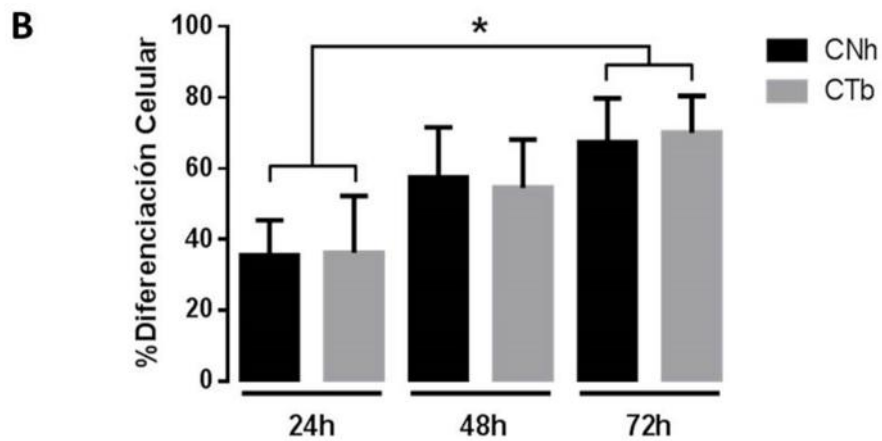
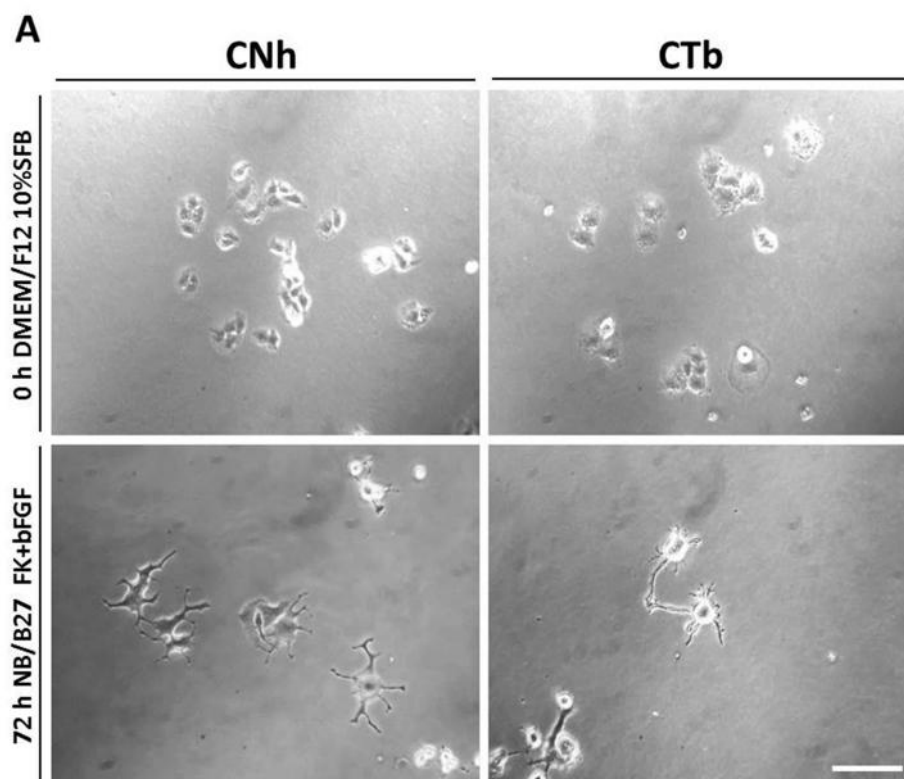


**Figura 9. Cuantificación de la proteína de DSCAM a nivel de superficie celular en las líneas CTb y CNh. A)** Histogramas representativos de los niveles de la proteína DSCAM, en la membrana celular, mediante Citometría de Flujo. Control sin anticuerpo primario (s/Ac). **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media. Resultado obtenido de 4 experimentos independientes (10.000 eventos por condición), donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0.05, Mann-Whitney test, (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

#### 4.1.2.- Diferenciación de las líneas celulares CTb y CNh

Para inducir la diferenciación en estos modelos celulares, desde un fenotipo fusiforme tipo fibrolastoide hacia uno neuronal, y con ello poder realizar los estudios morfométricos propuestos en nuestra hipótesis, se cultivaron ambas líneas en medio NeuroBasal suplementado con B27, adicionando bFGF 100 ng/ml y Forskolina (FK) 10  $\mu$ M (adaptado de Jang y cols, 2010). El criterio con que definimos finalmente como célula diferenciada para nuestros modelos en particular, **fue aquella que presentase al menos dos procesos tipo neurita y que estos sobrepasen la distancia correspondiente al promedio del radio del soma.**

En base a esto se cuantificó en una primera instancia el porcentaje de células diferenciadas cada 24 horas después del cambio de medio, observándose un mayor porcentaje de diferenciación a las 72 horas (alrededor del 70% en ambas líneas celulares), el cual fue estadísticamente significativo respecto a las 24 horas con el medio NeuroBasal-B27 (bFGF y FK). Posterior a este tiempo, junto con realizar el cambio del medio diferenciador y el seguimiento de los cultivos una semana, no se produjeron cambios significativos en cuanto a la morfología celular. Por lo tanto, **se determinó este marco temporal, 72 horas, como patrón para llevar a cabo de aquí en adelante todos los ensayos de diferenciación** (figura 10).

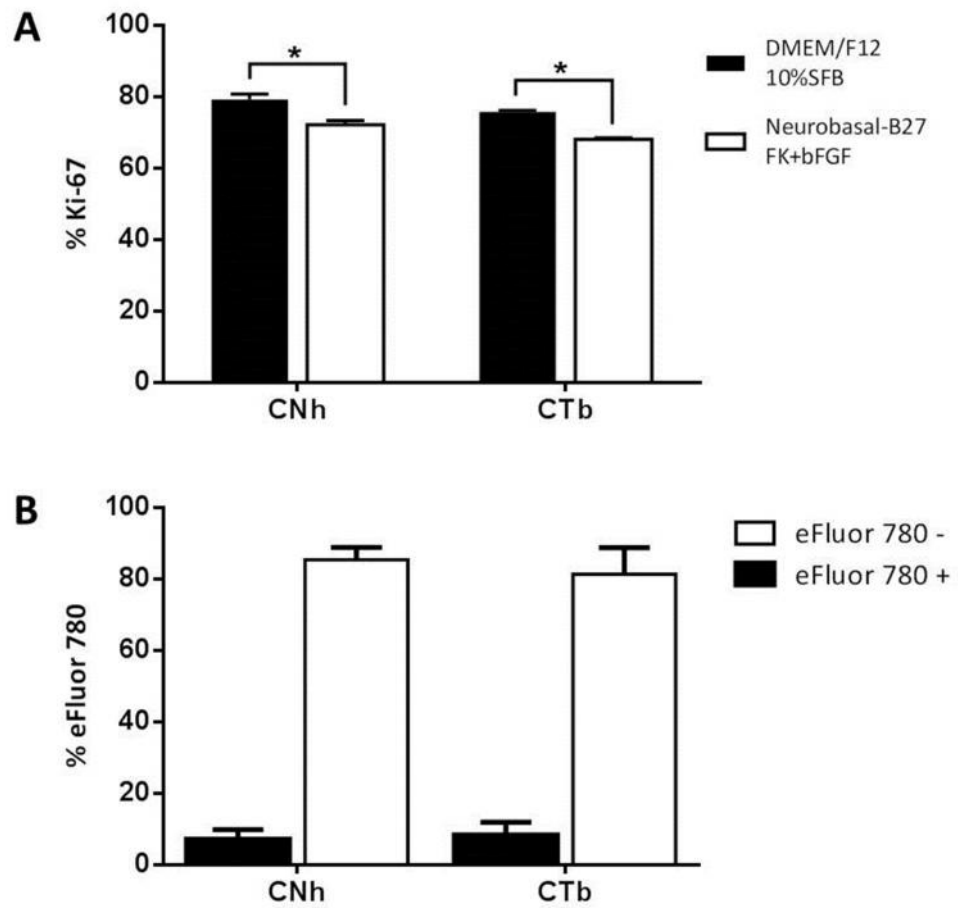


**Figura 10. Diferenciación de las líneas celulares CNh y CTb. A)** Imagen de microscopía con contraste de fase de ambas líneas celulares al tiempo inicial y final de la diferenciación, con los respectivos medios de cultivo (barra de escala, 50 micras). **B)** Porcentaje de diferenciación celular en los tiempos definidos de incubación. Resultado de 5 placas por línea celular para cada condición, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ , Tukey's test.

#### **4.1.3.- Estudio de proliferación y muerte celular bajo condiciones de diferenciación en las líneas CTb y CNh**

Con el objetivo de determinar si las condiciones de diferenciación por una parte lograban mantener a estas líneas celulares en un estado más cercano a  $G_0$ , y por lo tanto fuera del ciclo celular, y por otra no afectaban su viabilidad, se realizaron ensayos, de cuantificación del porcentaje de Ki-67 (marcador de proliferación celular) mediante Citometría de Flujo en ambas líneas a tiempo inicial  $t_0$  (DMEM/F12-10%SFB) y final  $t_{72h}$  (NeuroBasal-B27). Como muestra la figura 11, se aprecia una disminución significativa para ambos modelos celulares del marcador a las 72 horas con el medio diferenciador, confirmando con este ensayo que nuestras condiciones de cultivo arrestaron a ambas líneas en un estado más diferenciado.

Por otra parte, con la sonda fluorescente eFluor 780 (indicador de muerte celular), bajo estas mismas condiciones de diferenciación, se cuantificó el porcentaje de células positivas o muertas a las 72 horas del cambio de medio, observando que los porcentajes para ambas líneas fue inferior al 10% (CNh: 7,1% y CTb: 8,2%) y sobre un 80% de células vivas con las que se trabajó en todos los ensayos posteriores de diferenciación a un fenotipo neuronal y cuyos valores se encuentran dentro de lo descrito y aceptado en la literatura bajo estas condiciones experimentales (figura 11).



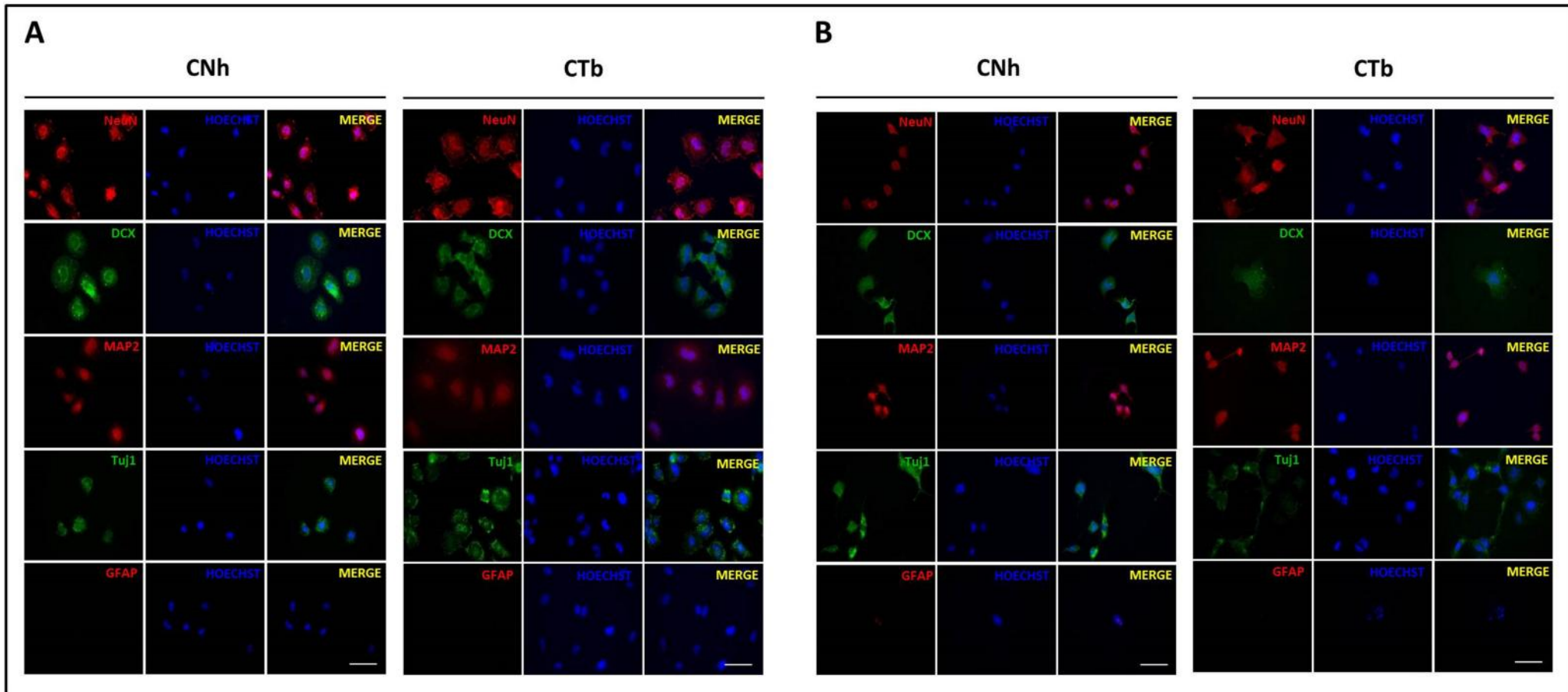
**Figura 11. Marcadores de proliferación y muerte celular. A)** Porcentaje del marcador de proliferación celular, Ki-67, en ambas líneas celulares y condiciones de cultivo. **B)** Porcentaje de células vivas y muertas mediante eFluor 780 +/- a las 72 horas de diferenciación celular. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0.05, Mann-Whitney test.



#### **4.1.4.- Caracterización neuronal de las líneas celulares CTb y CNh**

En el marco del primer objetivo, se llevó a cabo la caracterización neuronal de ambas líneas celulares para corroborar su linaje de origen (previo a su inmortalización), tanto en las condiciones basales de proliferación como de diferenciación celular estandarizadas anteriormente. Para ello, se realizó una inmunotipificación de marcadores neuronales específicos como NeuN (Marcador Neuronal Nuclear), DCX (Doblecortina), MAP2 (Proteína Asociada a Microtúbulos 2), TUJ1 (Tubulina  $\beta$ -III) y el control negativo GFAP (Proteína Fibrilar Acídica Glial), sumando con esto más antecedentes a los trabajos realizados en estos mismos modelos celulares en ensayos funcionales, (Acuña y cols, 2012; Allen y cols, 2000), en los cuales se observaron alteraciones en corrientes de Calcio y función colinérgica en la línea CTb con respecto a la línea control CNh.

Para este objetivo se adquirieron imágenes mediante microscopía de fluorescencia, las que arrojaron como señal positiva para ambas líneas celulares en los diferentes tiempos, patrones de expresión característicos de cada uno de los marcadores neuronales descritos inicialmente y la respectiva señal negativa para GFAP. Confirmando el origen neuronal de corteza cerebral de ratón trisómico (Ts16) para CTb y ratón normal para CNh (figura 12).

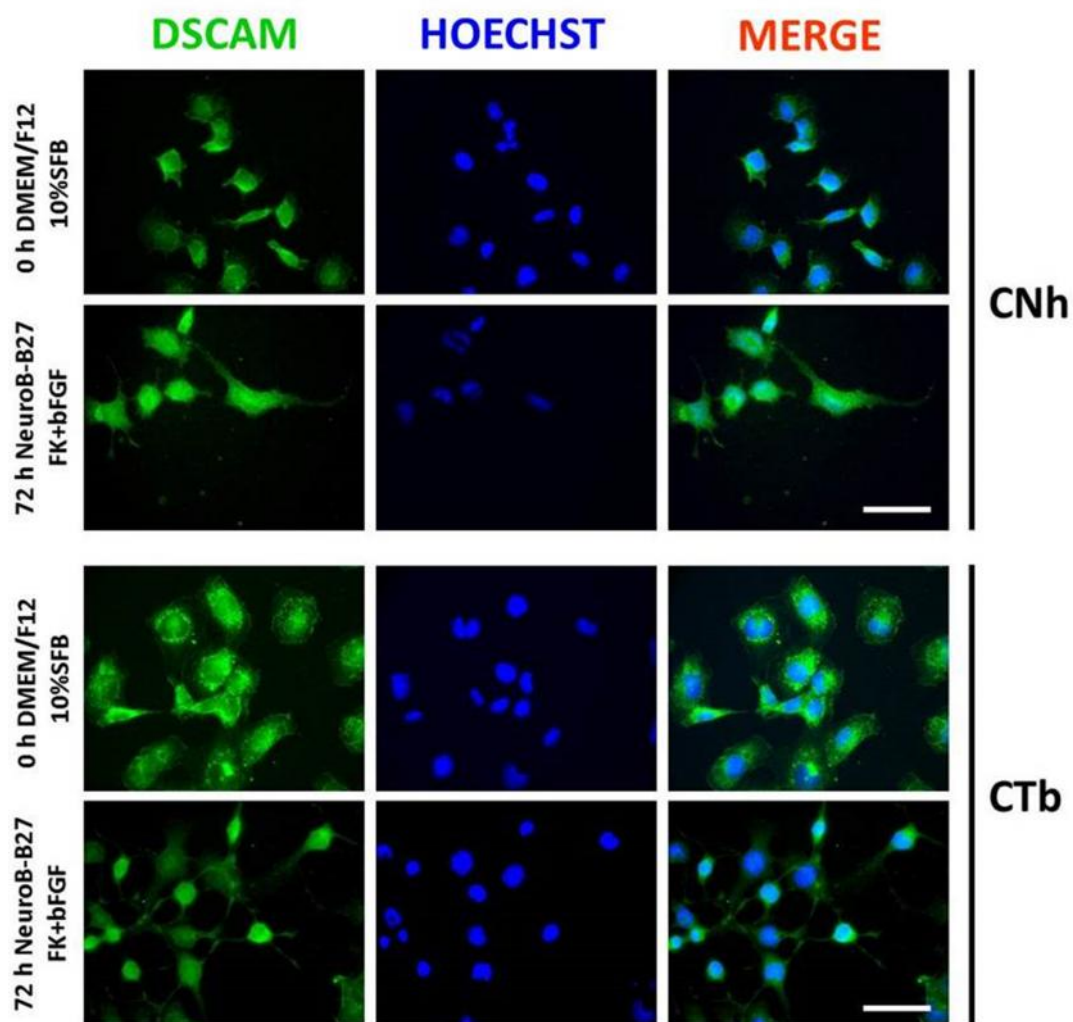


**Figura 12. Análisis de marcadores neuronales específicos en las líneas celulares CNh y CTb. A)** Ambas líneas celulares en condiciones basales de proliferación (DMEM/F12 10%SFB). **B)** Diferenciación de las dos líneas celulares en presencia de Neurobasal-B27, bFGF (100 ng / ml), Forskolina (10 mM), durante 72 horas. La Inmunocitoquímica reveló la expresión de todos los marcadores neuronales en ambas líneas celulares y condiciones, a excepción del control negativo para GFAP (barra de escala, 50 micras).

#### **4.1.5.- Expresión de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones basales de proliferación y diferenciación celular**

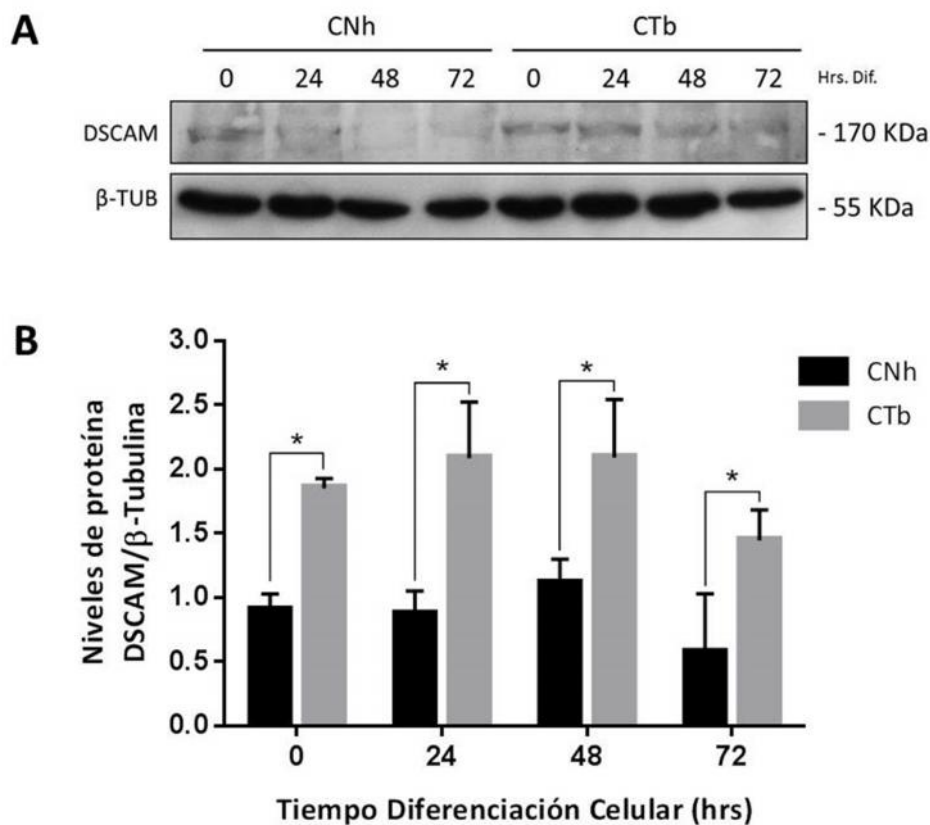
Para confirmar la presencia de DSCAM en ambas condiciones de cultivo celular, tanto basales ( $t_0$ ) como a las 72 horas con el medio NeuroBasal-B27 (bFGF y FK), y con ello analizar un posible efecto de este último medio sobre la expresión de la proteína de DSCAM, se llevaron a cabo diversos ensayos experimentales para identificar tanto la proteína de DSCAM como su transcrito, para poder afirmar finalmente de manera certera que existe una sobreexpresión de este receptor en la línea trisómica CTb con respecto a la control CNh, avalando además junto con otros estudios realizados por diversos grupos de investigación en estas mismas líneas celulares, que estos modelos reflejan de mejor manera el contexto global de la trisomía *in vitro* del SD, en el estudio de los circuitos reguladores génicos involucrados en procesos vitales para el desarrollo neuronal, los que pueden ser analizados gen por gen en cuanto a su función específica.

En este sentido realizamos un ensayo de inmunocitoquímica en células permeabilizadas con el anticuerpo específico para DSCAM, las que fueron analizadas mediante microscopía de fluorescencia, en las cuales se confirmó la presencia de DSCAM en las dos líneas celulares, señal que perdura hasta las 72 horas de diferenciación, no sufriendo cambios aparentes en su patrón de expresión en ambas líneas celulares (figura 13).



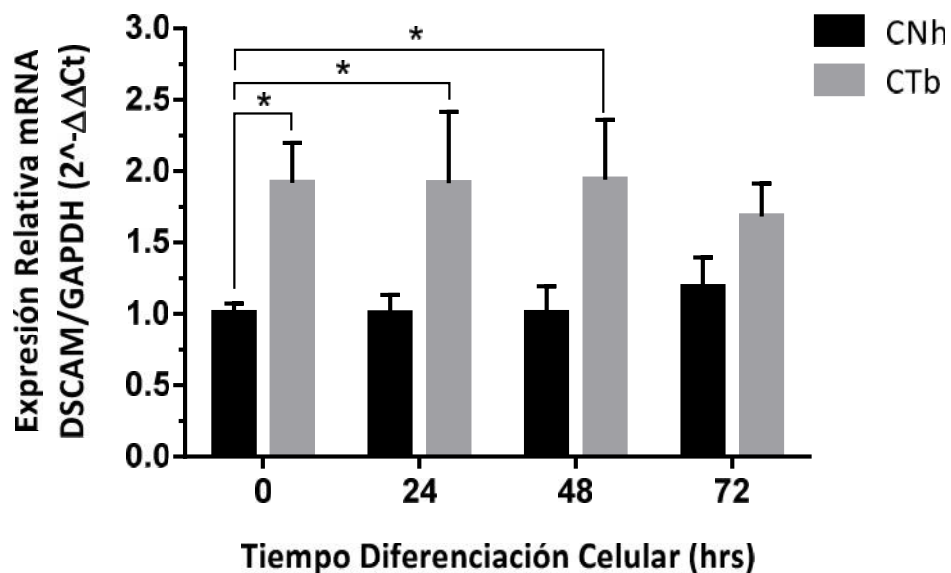
**Figura 13. Análisis de DSCAM mediante IF en las líneas celulares CNh y CTb.** Ambas líneas fueron diferenciadas en presencia de Neurobasal-B27, bFGF (100 ng / ml), Forskolina (10 mM), durante 72 horas. La Inmunocitoquímica reveló la presencia de DSCAM en ambas líneas celulares y condiciones (barra de escala, 50 micras).

En esta misma dirección experimental, se evaluó cada 24 horas la abundancia de DSCAM mediante Western blot, hasta las 72 horas de diferenciación, comenzando en la condición basal de proliferación ( $t_0$ ), en la cual ya se había observado y ahora se confirma, una mayor abundancia de DSCAM en la línea celular CTb, con respecto a CNh. Este aumento significativo en la línea celular trisómica se mantuvo en todos los tiempos hasta las 72 horas, con respecto a la línea control CNh (figura 14).



**Figura 14. Niveles de proteínas de DSCAM en condiciones de diferenciación celular en las líneas CTb y CNh. A)** Western Blot representativo de los niveles de proteína de DSCAM, en las diferentes condiciones de cultivo, normalizada a  $\beta$ -Tubulina. **B)** Cuantificación relativa por análisis densitométrico de píxeles por área. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Mann-Whitney test.

Al analizar la expresión de DSCAM en base a los resultados anteriores, se cuantificó de manera relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Livak y Schmittgen, 2001), el transcrito del gen de *dscam* mediante PCR a tiempo real (qPCR), para correlacionar la cantidad de mRNA con la abundancia de la proteína, bajo las mismas condiciones de diferenciación celular. Si bien se determinó una mayor expresión del mRNA-DSCAM en todos los tiempos en comparación a su condición control, esta solo fue estadísticamente significativa hasta las 48 horas (figura 15).



**Figura 15. Expresión del mRNA de DSCAM en condiciones de diferenciación celular en las líneas CTb y CNh.** Cuantificación relativa del transcrito de DSCAM en ambas líneas celulares y diferentes tiempos de diferenciación. Resultado obtenido de 6 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Tukey's test.

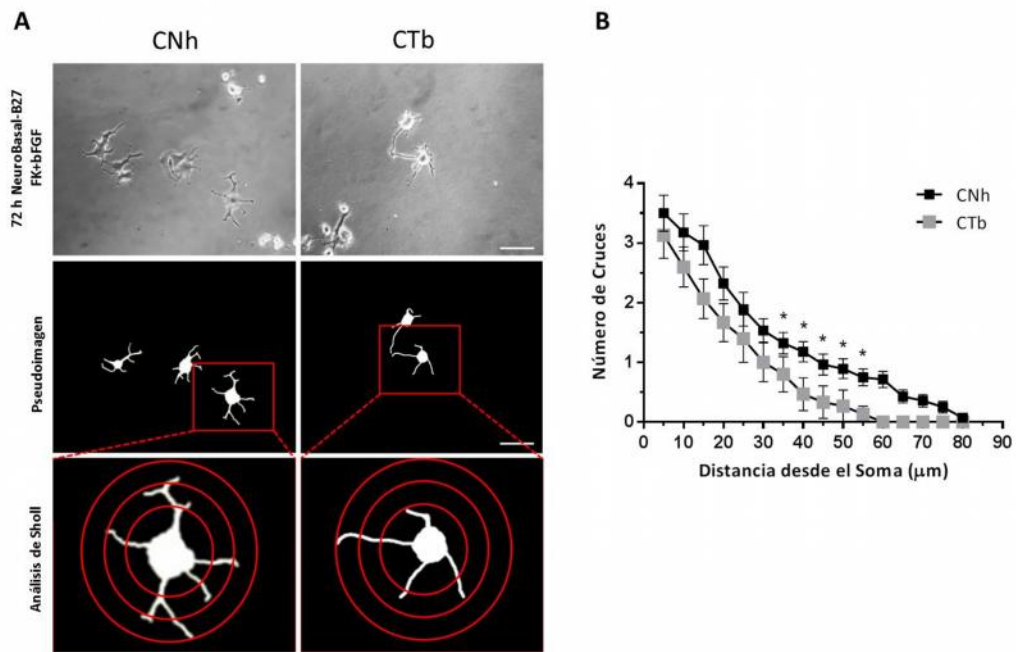
*En resumen, en este primer objetivo se pudo determinar la sobreexpresión de DSCAM en la línea celular CTb con respecto a su línea control CNh, tanto en condiciones de proliferación como de diferenciación celular. Además se establecieron las condiciones de cultivo para diferenciar estas líneas hacia un fenotipo neuronal, caracterizadas por marcadores neuronales específicos.*

## **4.2.- Análisis de parámetros morfológicos, número y longitud de neuritas, en las líneas CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular**

### **4.2.1.- Cuantificación del número de neuritas en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular**

En este objetivo en particular se evaluó la morfometría celular en las líneas celulares CTb y CNh, mediante la cuantificación del número y longitud de los procesos o neuritas, lo que da cuenta de su complejidad neuronal, a las 72 horas de diferenciación con el medio NeuroBasal-B27 (bFGF y FK). Para evaluar estos parámetros, se utilizó el análisis de Sholl, que consiste básicamente en el trazado radial de anillos concéntricos con similar distancia entre ellos respecto al soma celular (Sholl DA., 1953). Como primera aproximación al estudio morfológico en estas líneas celulares, se cuantificó el número de cruces con respecto a la distancia desde el soma, observando que la línea trisómica CTb arrojó un menor número de cruces con respecto a la línea control CNh, siendo de manera estadísticamente significativa esta diferencia a partir de los 35  $\mu\text{m}$  de distancia con respecto al soma, lo que estaría dando cuenta de manera inicial, de una menor complejidad neuronal al momento de inducir su diferenciación a un fenotipo neuronal (figura 16).

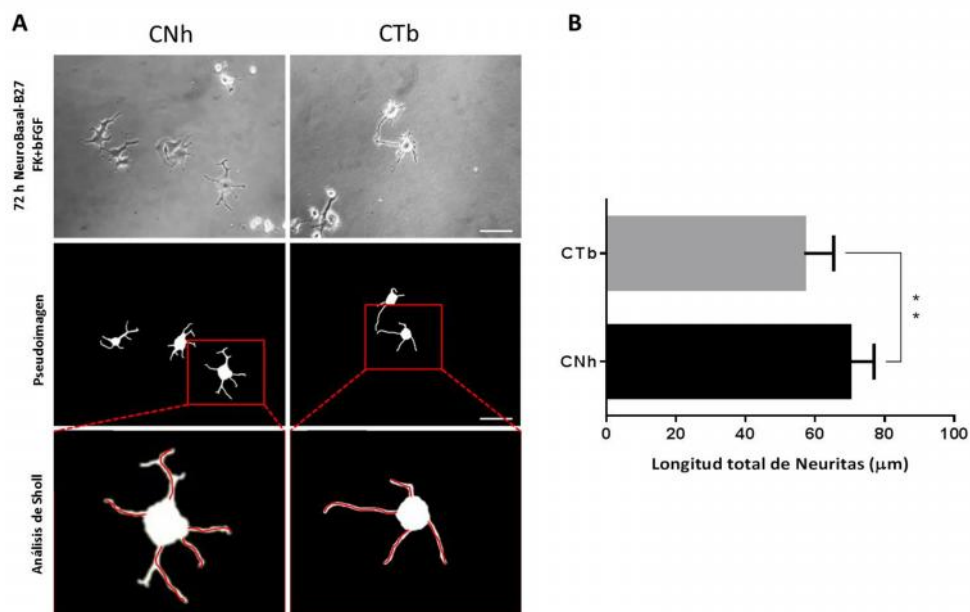




**Figura 16. Estudio morfológico del número de procesos en las líneas CTb y CNh. A)** Imágenes de microscopía de contraste de fase (10X) de ambas líneas celulares a las 72 horas de diferenciación con NeuroBasal-B27 (bFGF y FK) y el diseño de sus pseudoimágenes (barra de escala, 50 micras). **B)** Análisis de Sholl (ImageJ) para las dos líneas celulares. Resultado obtenido de un N: 65 células CNh; N: 55 células CTb, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Tukey's test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

#### 4.2.2.- Cuantificación del largo total de neuritas en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular

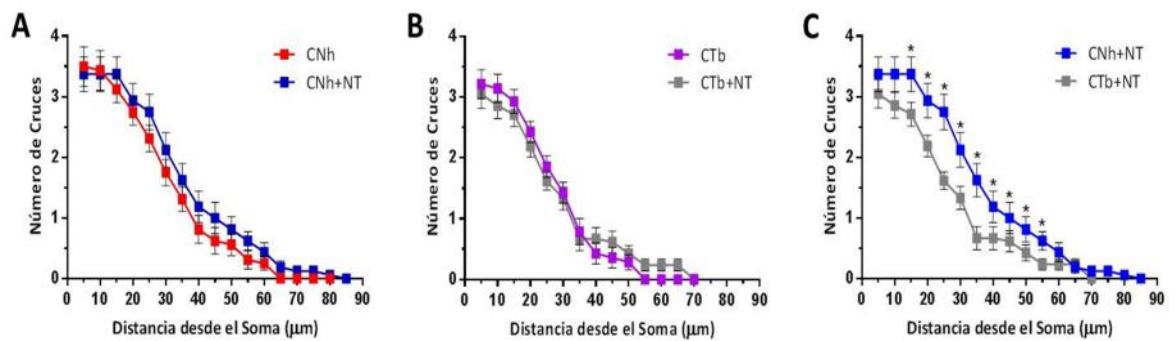
Continuando con el primer ensayo morfológico en estos modelos celulares y bajo las mismas condiciones de diferenciación, se cuantificó el promedio del largo total de neuritas primarias, determinando que la línea trisómica CTb posee un promedio significativamente menor al de su control CNh. Al relacionar este hallazgo con los del punto 4.2.1 anterior, en conjunto ello sugiere una deficiente y disminuida complejidad neuronal en cuanto a la extensión de procesos en la línea trisómica (figura 17).



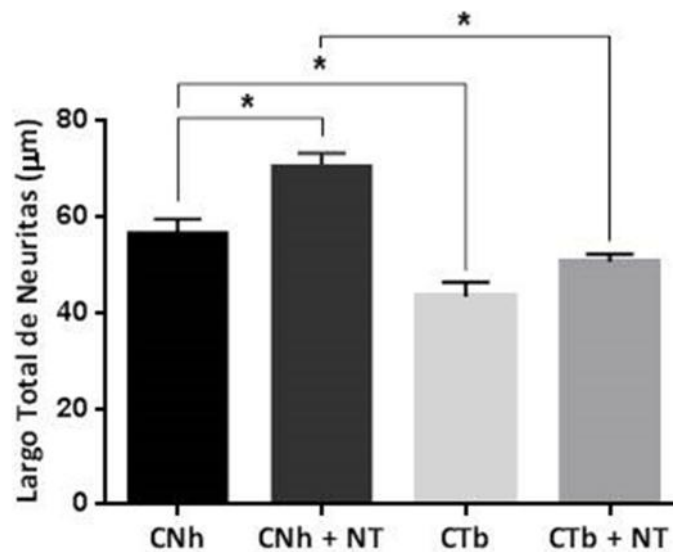
**Figura 17. Estudio morfológico del largo total de los procesos en las líneas CTb y CNh. A)** Imágenes de microscopía de contraste de fase (10X) de ambas líneas celulares a las 72 horas de diferenciación con NeuroBasal-B27 (bFGF y FK) y sus pseudoimágenes (barra de escala, 50 micras). **B)** Análisis del promedio del largo total de neuritas primarias para las dos líneas celulares, realizado con NeuronJ (ImageJ plugin). Resultado obtenido de N: 176 procesos por línea celular, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*\*p 0,01, Mann Whitney test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

#### **4.2.3.- Estudio de parámetros morfológicos, número y longitud de neuritas, en las líneas CTb y CNh, al estimular con Netrina**

Se evaluó la capacidad de respuesta de las líneas celulares frente al ligando de DSCAM, Netrina 1, proteína de la matriz extracelular vinculada a Laminina, que actúa como señal de orientación quimiotrópica en la correcta migración y guía axonal (Huang y cols, 2015; Lai y cols, 2011). Se analizó el número y largo de los procesos, posterior a la estimulación con Netrina 1, la cual es la quimioquina soluble que reconoce DSCAM del medio extracelular. Se cuantificó el número de cruces de los procesos celulares por la distancia desde el soma. No se observaron cambios significativos al incubar ambas líneas celulares con el medio más Netrina 1 durante las 72 horas (figura 18 A-B). No obstante, al comparar la respuesta entre las líneas frente a Netrina 1, al igual que tras diferenciación solo con NeuroBasal-B27, la respuesta fue de un menor número de cruces de la línea trisómica, siendo esta diferencia significativa a partir de los 15  $\mu\text{m}$  desde el soma celular (figura 18 C). Paralelamente, se cuantificó el largo total de las neuritas bajo el mismo estímulo con Netrina 1, donde la respuesta de la línea CTb si bien esbozó un incremento con esta proteína, este no fue estadísticamente significativo con respecto a su misma línea mantenida solo con NeuroBasal-B27. Ello difiere de la respuesta en la línea control CNh, donde Netrina 1 indujo un aumento significativo del largo total de los procesos (figura 19).



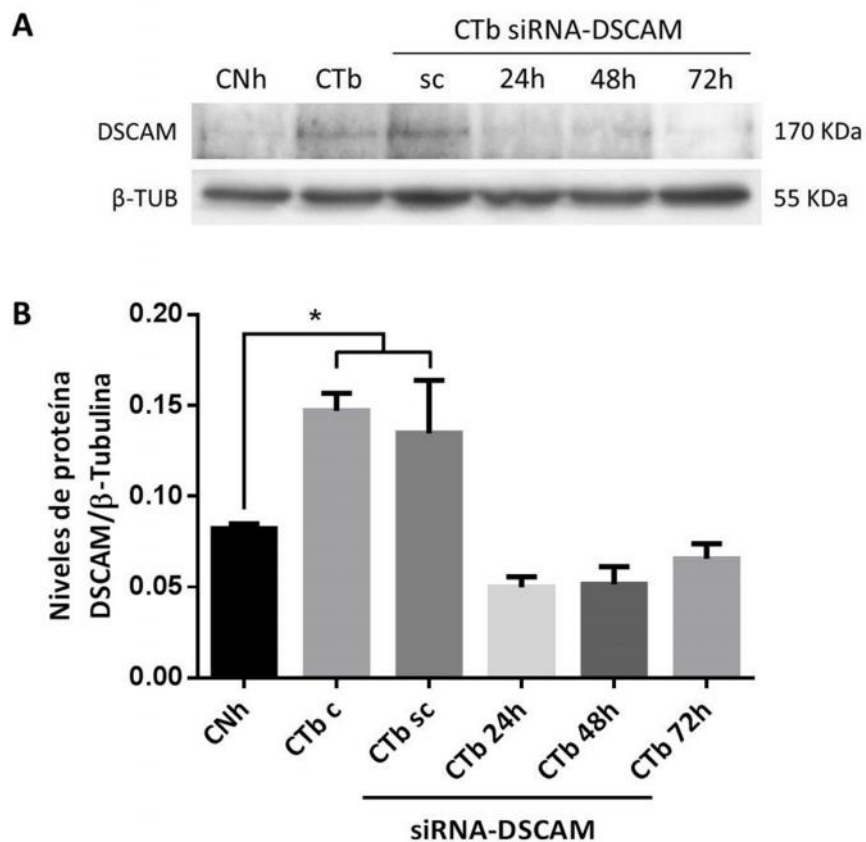
**Figura 18. Estudio morfológico del número de procesos en las líneas CTb y CNh estimuladas con Netrina 1.** **A)** Análisis de Sholl de la línea CNh al estimular con Netrina 1. **B)** Análisis de Sholl de la línea CTb al estimular con Netrina 1. **C)** Análisis de Sholl de las líneas CTb y CNh, al estimular con Netrina 1. Resultado obtenido de N: 25 células por cada línea, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Tukey's test.



**Figura 19. Estudio morfológico del largo total de neuritas en las líneas CTb y CNh estimuladas con Netrina 1.** Largo total de neuritas a las 72 horas de diferenciación, estimuladas con Netrina 1 (NT), realizado con NeuronJ (ImageJ plugin). Resultado obtenido de un N: 80 procesos por línea celular, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Tukey's test.

#### **4.2.4.- Estandarización del *Knockdown* de DSCAM en la línea celular CTb, normalizado a la línea control CNh**

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de DSCAM sobre el aspecto morfométrico en la línea trisómica CTb. Se redujeron de los niveles de DSCAM de la línea CTb a niveles basales de CNh mediante el *knockdown* de DSCAM, con oligonucleótidos interferentes específicos contra esta proteína (siRNA-DSCAM). Experimentalmente se probaron diferentes concentraciones de acción de estos interferentes dentro de un tiempo de evaluación cada 24 horas mediante Western blot, según lo citado en la literatura y sugerencias de los fabricantes, con el fin de encontrar una ventana temporal donde poder evaluar todos los parámetros mencionados anteriormente. Se observó que a las 24 horas post-transfección de la línea CTb hubo una disminución de los niveles de DSCAM y que estos fueron similares a los de la línea CNh, perdurando en el tiempo hasta las 72 horas en que fueron evaluados (figura 20).

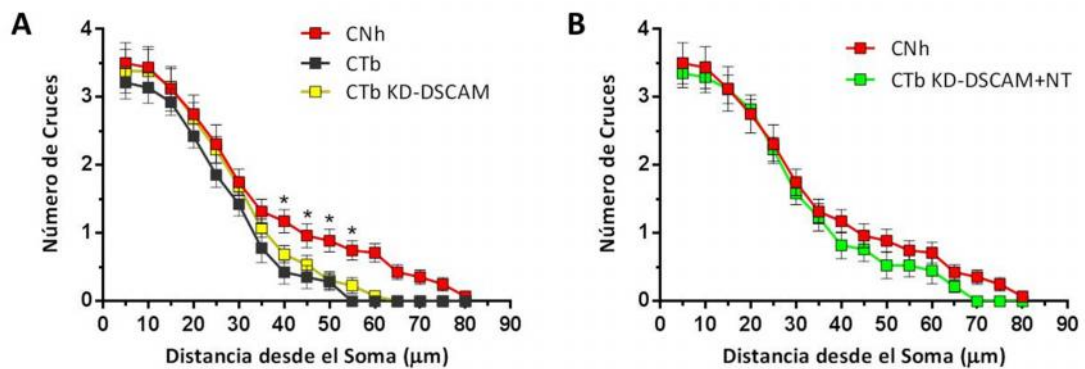


**Figura 20. Knockdown de DSCAM en la línea celular CTb. A)** Western Blot representativo de los niveles proteicos de DSCAM en la línea CTb hasta las 72 horas, previo knockdown con siRNA específicos para DSCAM y su control de especificidad con el Scrambled (sc). **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los píxeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Tukey's test.

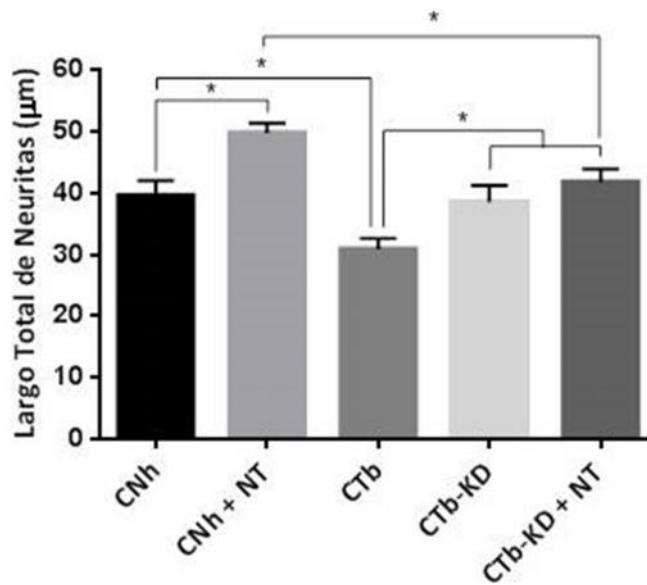
Bajo estas condiciones y observando que a las 24 horas los niveles de DSCAM son similares entre ambas líneas, los experimentos que involucren el *knockdown* para DSCAM se realizaron a partir de este mismo tiempo.

#### **4.2.5.- Análisis de parámetros morfológicos, número y longitud de neuritas, con el *knockdown* de DSCAM en la línea celular CTb, utilizando la línea control CNh**

Con el establecimiento de las condiciones del *knockdown* para DSCAM en la línea trisómica CTb, se llevó a cabo el análisis del largo y número de los procesos con los niveles normalizados de DSCAM en CTb con respecto a CNh. La cuantificación del número de cruces con la normalización de DSCAM en la línea CTb (CTb KD-DSCAM), que esta no revirtió el menor número de cruces a partir de los 40  $\mu\text{m}$  con respecto al control CNh, teniendo un comportamiento similar a la condición sin el KD-DSCAM (figura 21 A). Solo cuando al cultivo CTb KD-DSCAM le añadimos al medio de cultivo el agonista específico Netrina 1, este logra tener un fenotipo similar al de la línea CNh (figura 21 B). Por otra parte, con respecto al estudio del largo total de las neuritas, esta misma condición CTb KD-DSCAM, se observó un incremento significativo respecto a su condición basal CTb, lo mismo para CTb KD-DSCAM más Netrina 1. En ambas situaciones experimentales, las células trisómicas alcanzaron parámetros de largo de dendritas comparables a aquellas de la línea CNh basalmente (figura 22), pero distante de la respuesta que exhibió la condición normal CNh cuando la enfrentamos al ligando de DSCAM, Netrina 1 (figura 19).



**Figura 21. Estudio morfológico del número de procesos en la línea celular CTb con el *Knockdown* para DSCAM. A)** Análisis de Sholl con el knockdown-DSCAM en la línea CTb, comparada a la línea control CNh. **B)** Análisis de Sholl con el knockdown-DSCAM en la línea CTb al estimular con Netrina, comparada a la línea control CNh. Resultado obtenido de un N: 25 células por cada línea, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Tukey's test.



**Figura 22. Estudio morfológico del largo total de neuritas con el *Knockdown* para DSCAM en la línea celular CTb comparada a la línea control CNh.** Largo total de los procesos a las 72 horas de diferenciación, con el knockdown para DSCAM en la línea celular CTb, comparada a la línea control CNh, realizado con NeuronJ (ImageJ plugin). Resultado obtenido de un N: 80 procesos por línea celular, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Tukey's test.

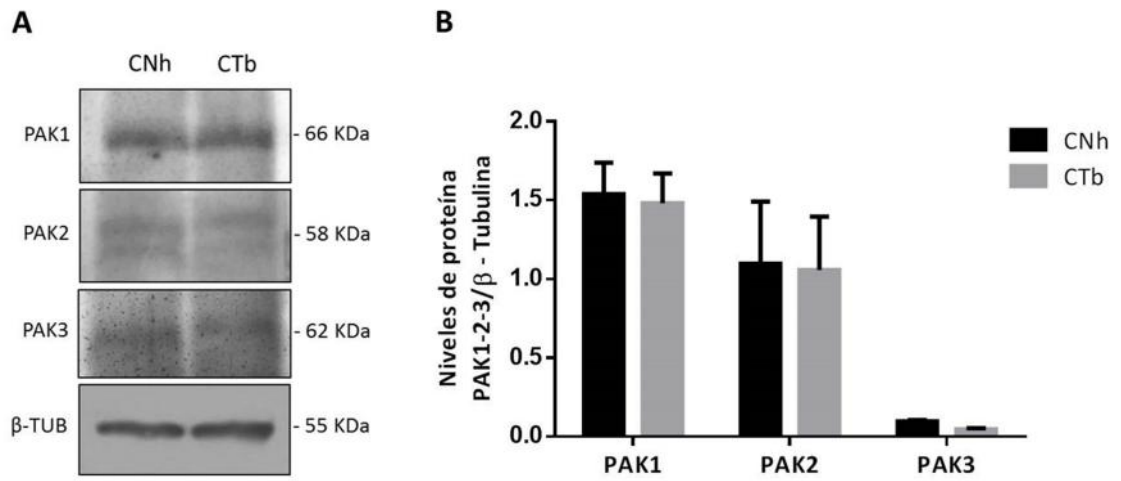


*En resumen, en este objetivo se pudo observar una menor complejidad neuronal en la línea celular CTb con respecto a su línea control CNh, en cuanto al número de cruces como al largo total de sus neuritas. También, se establecieron las condiciones del knockdown para DSCAM en la línea trisómica, el cual revirtió de manera parcial el fenotipo neuronal de la línea patológica, con respecto al promedio del largo total de los procesos.*

### **4.3.- Cuantificación de la expresión de las proteínas PAK del grupo I, en las líneas celulares CTb y CNh**

#### **4.3.1.- Análisis de los niveles de las proteínas PAK del grupo I en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones basales de proliferación**

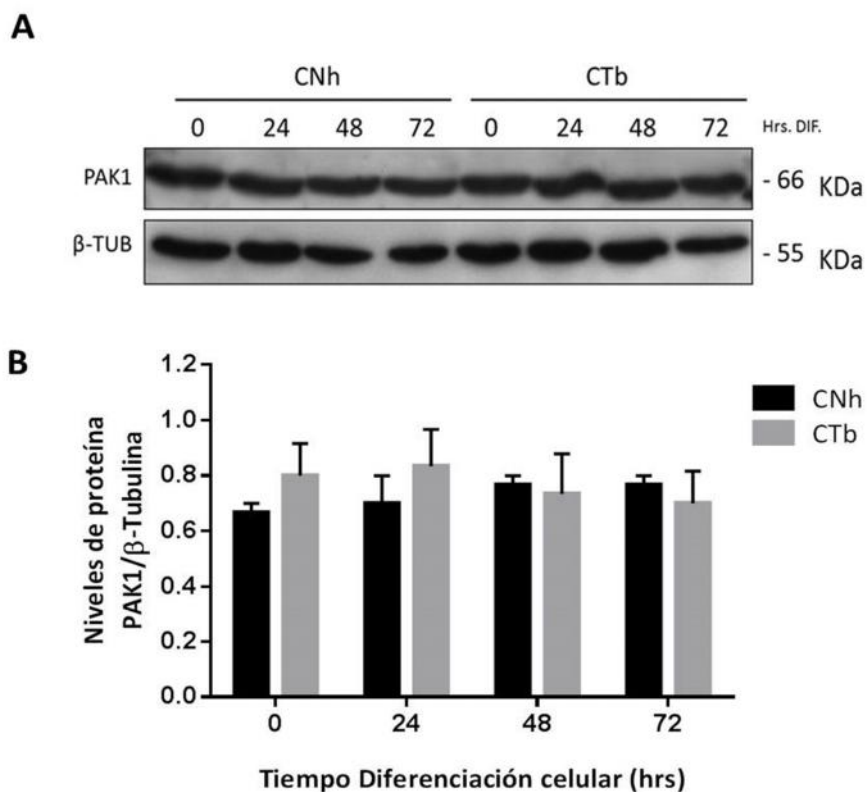
En este objetivo quisimos determinar inicialmente los niveles de expresión de las tres quinasas del grupo I de PAK en condiciones basales de proliferación en nuestros modelos celulares, con el fin de determinar cual de estas enzimas se encuentra en mayor abundancia y si existían diferencias entre las dos líneas celulares. Experimentalmente se determinaron los niveles de proteína mediante Western blot, observando que no existen diferencias en la expresión de cada quinasa entre las líneas celulares CTb y CNh, pero con una mayor abundancia de PAK1 en estos dos modelos celulares (figura 23).



**Figura 23. Niveles de proteína basales del grupo I de PAK en las líneas celulares CTb y CNh.** **A)** Western Blot representativo de las diferentes quinasas del grupo I de PAK. **B)** Cuantificación relativa en términos de la densidad de píxeles por área normalizada por la expresión de la proteína  $\beta$ -Tubulina. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p < 0,05, Tukey's test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

#### **4.3.2.- Cuantificación de los niveles proteicos de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular**

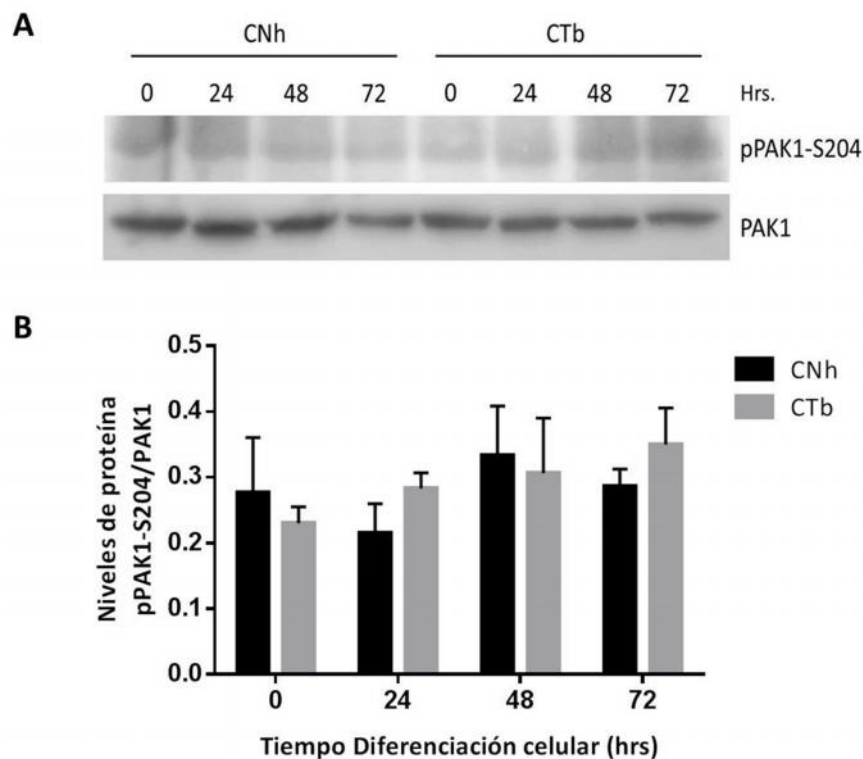
Con el resultado obtenido del análisis de expresión del grupo I de PAK en condiciones basales de cultivo, verificamos la mayor abundancia de la quinasa PAK1 en nuestros modelos. Esta ha sido reportada como una enzima responsable de un gran número de procesos a nivel neuronal, como en polaridad neuronal, guía axonal, extensión de neuritas (Hayashi y cols, 2004; Schmucker y cols, 2000). De las otras quinasas, PAK2 es más ubicua en el resto del organismo; y PAK3 si bien es una enzima con importantes roles a nivel neuronal y que está vinculada a disfunción cognitiva no sindrómicas, esta no se encuentra mayormente expresada en nuestros modelos celulares. Es por ello que escogimos en este trabajo a PAK1 como el principal blanco efector de DSCAM, y tal como lo hemos venido realizando secuencialmente, evaluamos su nivel de expresión cada 24 horas mediante Western blot, en las condiciones de diferenciación con NeuroBasal-B27 (bFGF y FK), no encontrando cambios significativos entre las dos líneas celulares dentro del transcurso de este tiempo hasta las 72 horas de diferenciación (figura 24).



**Figura 24. Niveles de proteína de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh. A)** Western Blot representativo de la abundancia de PAK1 en los diferentes tiempos de diferenciación, en ambas líneas celulares. **B)** Cuantificación relativa en términos de la densidad de píxeles por área normalizada por la expresión de la proteína  $\beta$ -Tubulina. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, Tukey's test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

### 4.3.3.- Análisis del estado de activación de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh, en condiciones de diferenciación celular

El siguiente paso que realizamos fue evaluar el estado de activación de PAK1 mediante Western blot, a través de su grado de fosforilación en el residuo Serina-204. Y al igual que el resultado anterior, en las mismas condiciones de diferenciación, no encontramos cambios en sus niveles de proteínas fosforiladas entre las dos líneas celulares (figura 25).



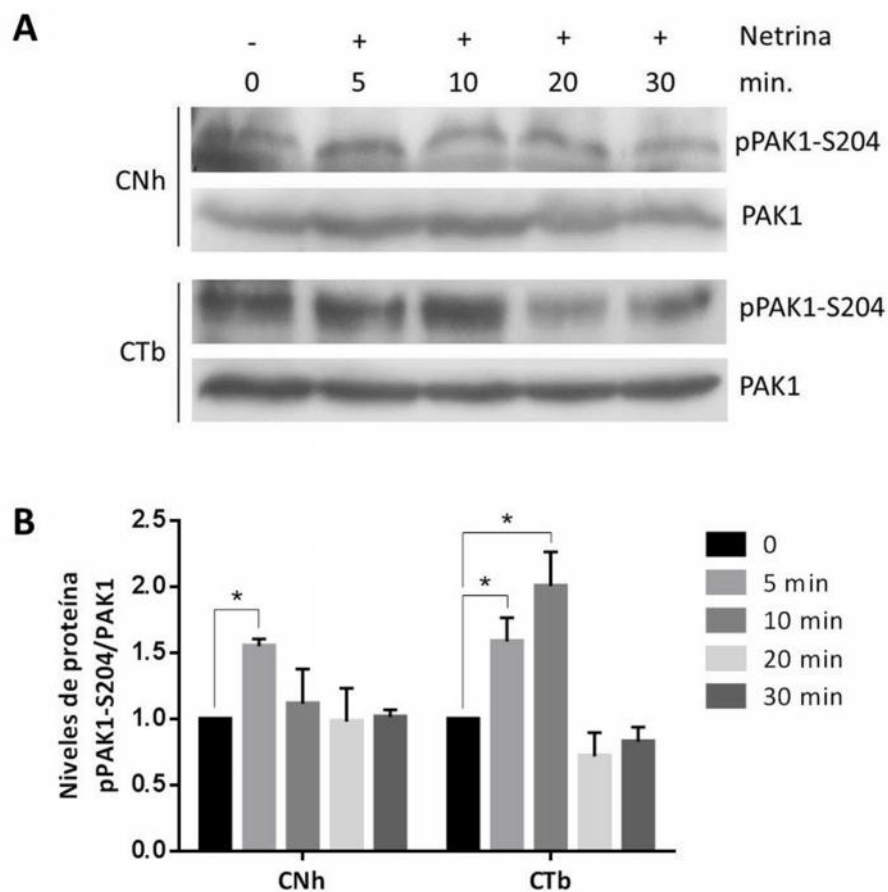
**Figura 25. Estado de activación de PAK1 en las líneas CTb y CNh.** **A)** Western Blot representativo de los niveles de pPAK1-S204 en las líneas CTb y CNh, hasta las 72 horas de diferenciación. **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los píxeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, Tukey's test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

#### **4.3.4.- Análisis del estado de activación de PAK1 en las líneas celulares CTb y CNh, al estimular con Netrina**

Con el resultado del ensayo anterior, en el cual no observamos cambios en el estado de activación de PAK1 cada 24 horas en el proceso de diferenciación, decidimos explorar la sensibilidad de la vía con la estimulación de DSCAM mediante Netrina 1, ya que en la naturaleza estos estados de activación transduccionales son más bien fásicos, variando en función de ventanas acotadas de tiempo, más que un curso tónico. Tales ensayos con el ligando de DSCAM en la literatura dan cuenta de las variaciones de la actividad de efectores río abajo del receptor hasta los 30 minutos post estímulo (Qu y cols, 2013; Zhu y cols, 2013). En este marco temporal, decidimos evaluar el grado de activación que tendría PAK1 en el residuo específico de autofosforilación en Serina-204 (Chong y cols, 2001).

En el diseño experimental, fijamos los siguientes tiempos de evaluación del grado de fosforilación de PAK1, el que partió del tiempo inicial  $t_0$  (condición normal de proliferación) para después pasar a los 5 minutos con el medio diferenciador más el ligando y así con los siguientes tiempos, 10, 20 y 30 minutos, los que fueron cuantificados relativamente mediante el análisis densitométrico de las bandas del Western blot respectivo. Observamos que en la condición trisómica el nivel de fosforilación se incrementó significativamente alrededor del 50% con respecto a su tiempo inicial, perdurando hasta los 10

minutos post estimulación. Esto contrastó claramente con la situación observada en la línea control CNh, donde el aumento de pPAK1-S204 se observa principalmente a los 5 minutos de activación, para retornar prontamente a los niveles basales de fosforilación a los 10 minutos (figura 26).

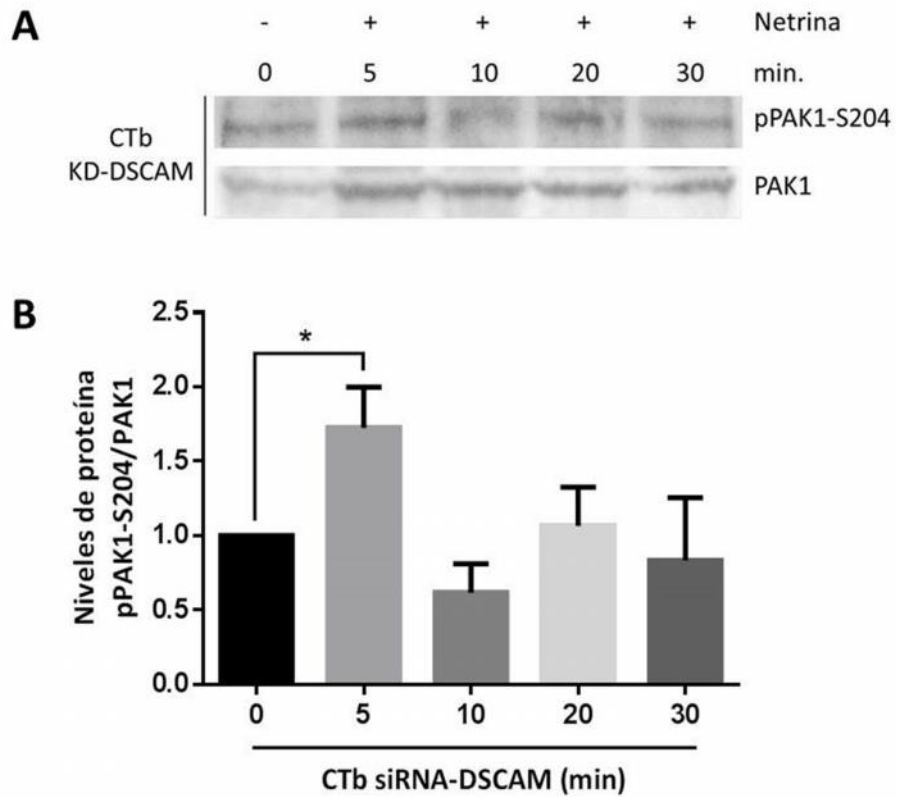


**Figura 26. Estado de activación de PAK1 en las líneas CTb y CNh al estimular con Netrina 1.** **A)** Western Blot representativo de los niveles de pPAK1-S204 en las líneas CTb y CNh, al estimular con Netrina 1 en los tiempos definidos experimentalmente (0, 5, 10, 20 y 30 minutos). **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los pixeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Mann Whitney test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).



#### **4.3.5.- Cuantificación del estado de activación de PAK1, con el *knockdown* de DSCAM en la línea celular CTb, al estimular con Netrina**

Para determinar si el tiempo prolongado de activación de PAK1 al estimular con Netrina 1 en la línea celular CTb se debía a la sobreexpresión del receptor DSCAM, se llevó a cabo el ensayo con el *knockdown* para esta proteína previamente descrito, en el cual a las 24 horas post-transfección y con los niveles proteicos normalizados a los de CNh, se procedió al cambio de medio condicionado NeuroBasal-B27 (bFGF y FK) con su ligando respectivo. Nuestros resultados indican un cambio sustancial en cuanto al estado de fosforilación en la línea trisómica mediante Western blot, la cual se comportó de manera similar a su línea control, con un incremento estadísticamente significativo de pPAK1-S204 a los 5 minutos alrededor del 50%, lo que vuelve a su nivel basal a los 10 minutos de estimulación (figura 27). Esta respuesta es esencialmente similar a aquella observada en el experimento anterior en la línea celular CNh, donde la activación de PAK1 es evidente hasta los 5 minutos de haber sido enfrentada a Netrina 1.



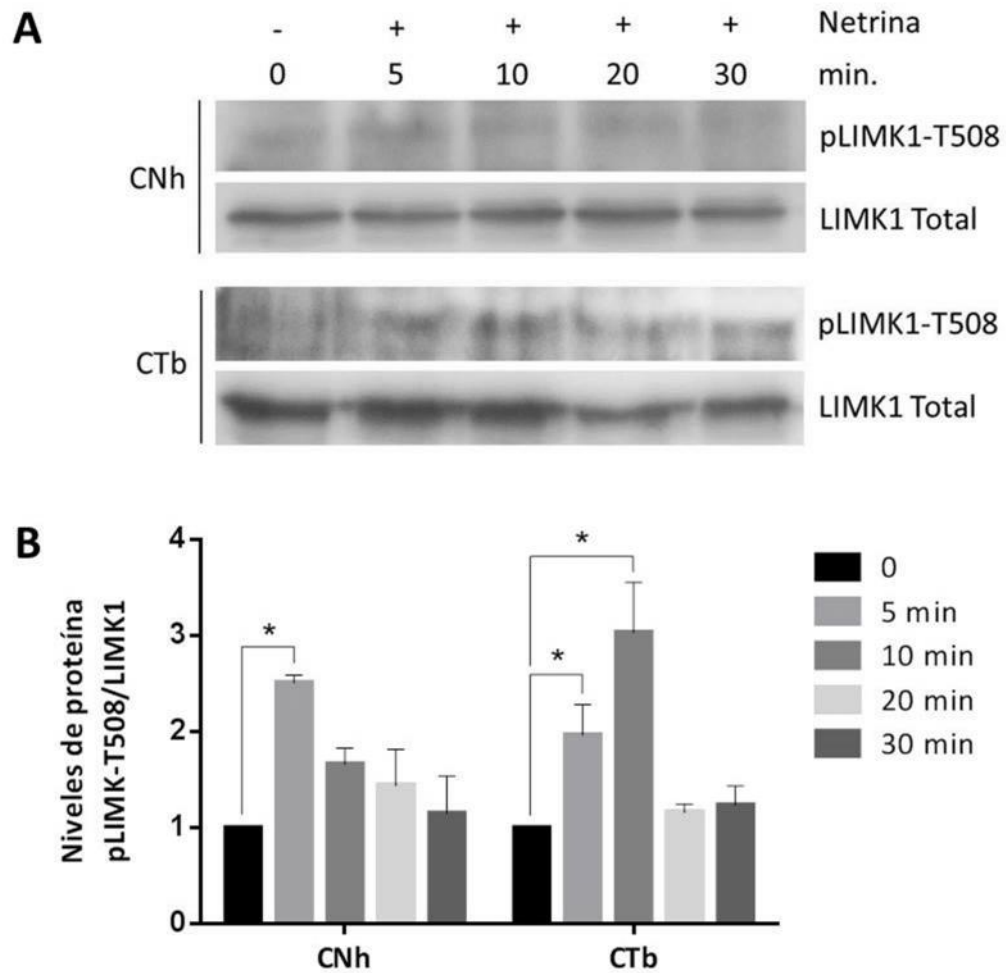
**Figura 27. Estado de activación de PAK1 en la línea CTb con siRNA-DSCAM. A)** Western Blot representativo de los niveles de pPAK1-S204 en la línea CTb, al estimular con Netrina 1 (0, 5, 10, 20 y 30 minutos), previo knockdown de DSCAM. **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los píxeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Mann Whitney test.

*En resumen, en este objetivo se pudo determinar la mayor abundancia de PAK1 en ambas líneas celulares en condiciones de proliferación celular respecto a las otras quinasas del grupo I de PAK. No experimentando cambios tanto en su expresión como activación en condiciones de diferenciación. Solo al incubar con el agonista de DSCAM, PAK1 aumenta y sostiene su estado fosforilado por el doble tiempo en la línea CTb respecto a la línea control CNh. Todo esto fue revertido cuando realizamos el ensayo con el knockdown para DSCAM en la línea trisómica CTb, niveles que fueron homólogos a la línea normal CNh.*

#### **4.4.- Estudio de la activación de blancos moleculares río abajo de la vía PAK, mediante el estado de fosforilación de LIMK y Cofilina en las líneas celulares CTb y CNh**

##### **4.4.1.- Cuantificación del estado de activación de LIMK1 en las líneas celulares CTb y CNh, al estimular con Netrina**

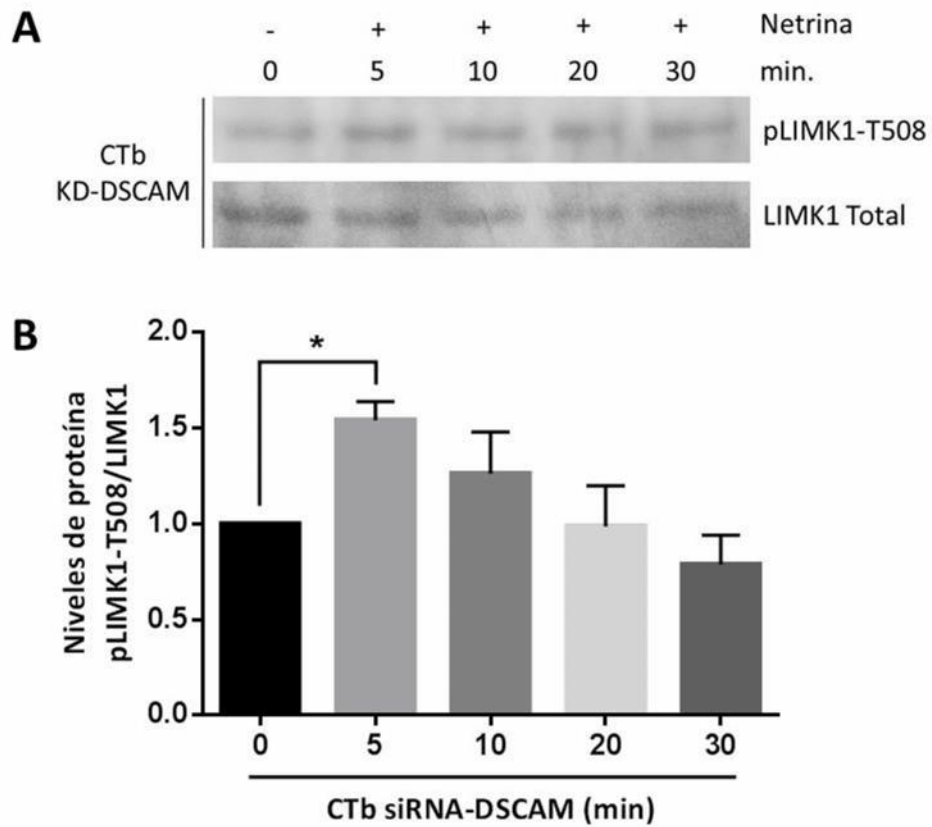
En este último objetivo del trabajo quisimos investigar efectores directos de la vía transduccional de PAK que guardaran relación con la regulación del citoesqueleto en cuanto a la formación y extensión de procesos celulares. Uno de estos blancos moleculares es la LIM quinasa 1 (LIMK1) que actúa como regulador de la despolimerización de los filamentos de actina (F-actina) y que es activada por la fosforilación en su residuo aminoacídico Treonina-508 por parte de PAK1 (Bokoch G, 2003). En base a esto nos interesó saber cuál era su nivel de activación, una vez activada la vía de DSCAM a través de Netrina 1, tal como lo realizamos con PAK1 en los diferentes tiempos de análisis (0, 5, 10, 20 y 30 minutos). Nuestros resultados revelan una situación análoga a aquella vista con pPAK1-S204, vale decir, la línea trisómica exhibe un máximo de fosforilación de LIMK1 entre los 5 y 10 minutos de estimulación para luego retornar a los valores basales ya a los 20 minutos, a diferencia de la línea control donde este incremento sólo es significativo a los 5 minutos después de la estimulación con Netrina 1 (figura 28).



**Figura 28. Estado de activación de LIMK1 en las líneas CTb y CNh al estimular con Netrina 1.** **A)** Western Blot representativo de los niveles de pLIMK1-T508 en las líneas CTb y CNh, al estimular con Netrina 1 en los tiempos definidos experimentalmente (0, 5, 10, 20 y 30 minutos). **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los píxeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Mann Whitney test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

#### **4.4.2.- Cuantificación del estado de activación de LIMK1, con el *knockdown* de DSCAM en la línea celular CTb, al estimular con Netrina**

Por lo visto en los resultados anteriores donde se observó una hiperactivación de algunos componentes de la vía de DSCAM, nos interesó en este punto en particular, determinar si el prolongado tiempo de activación de LIMK1 al estimular con Netrina 1 en la línea celular CTb se debía también a la sobreexpresión del receptor DSCAM. Para ello se llevó a cabo el ensayo con el *knockdown* para esta proteína previamente descrito, en el cual a las 24 horas post-transfección y con los niveles proteicos normalizados a los de CNh, se procedió al cambio de medio condicionado NeuroBasal-B27 (bFGF y FK) con su ligando respectivo. Encontramos que el grado de fosforilación en la línea trisómica mediante Western blot, tiene un comportamiento similar a aquel de la línea control, con un incremento estadísticamente significativo de pLIMK1-T508 a los 5 minutos cercano al 50%, para luego volver a su nivel basal a los 10 minutos de estimulación (figura 29).

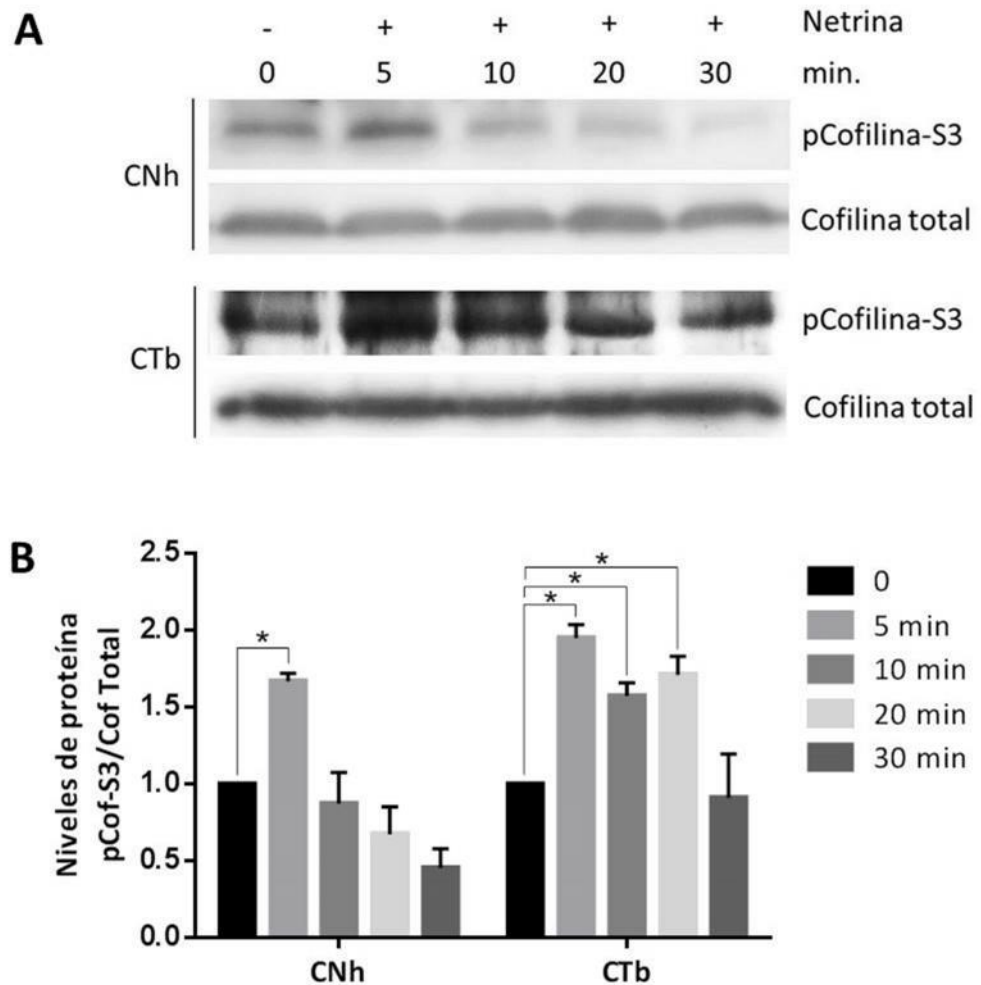


**Figura 29. Estado de activación de LIMK1 en la línea CTb con siRNA-DSCAM. A)** Western Blot representativo de los niveles de pLIMK1-T508 en la línea CTb, al estimular con Netrina 1 (0, 5, 10, 20 y 30 minutos), previo knockdown de DSCAM. **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los píxeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Mann Whitney test.

#### **4.4.3.- Cuantificación del estado de activación de Cofilina en las líneas celulares CTb y CNh, al estimular con Netrina**

Continuando con el análisis de la vía de señalización río abajo de PAK1, un blanco directo de LIMK1 es Cofilina, proteína que actúa despolimerizando los filamentos de actina cuando esta no se encuentra fosforilada. Cuando LIMK1 cataliza la unión de un grupo fosfato en el residuo específico Serina-3 de esta proteína, esta queda inhibida y con ello la capacidad de provocar el corte de los filamentos de actina y la generación de los monómeros de actina (G-actina) los cuales son el sustrato para promover la extensión de la F-actina (Pontrello y Ethell, 2009). En este experimento, quisimos determinar su grado de fosforilación, una vez que gatillábamos la vía de DSCAM a través de Netrina 1, tal como lo realizamos en su minuto con PAK1 y LIMK1 en los diferentes tiempos de análisis (0, 5, 10, 20 y 30 minutos). Observamos que en la línea trisómica existía un máximo de fosforilación desde los 5 hasta los 20 minutos de estimulación, para luego retornar a los valores basales recién a los 30 minutos, a diferencia de la línea control donde este incremento solo es significativo a los 5 minutos después de la estimulación con Netrina 1 (figura 30).

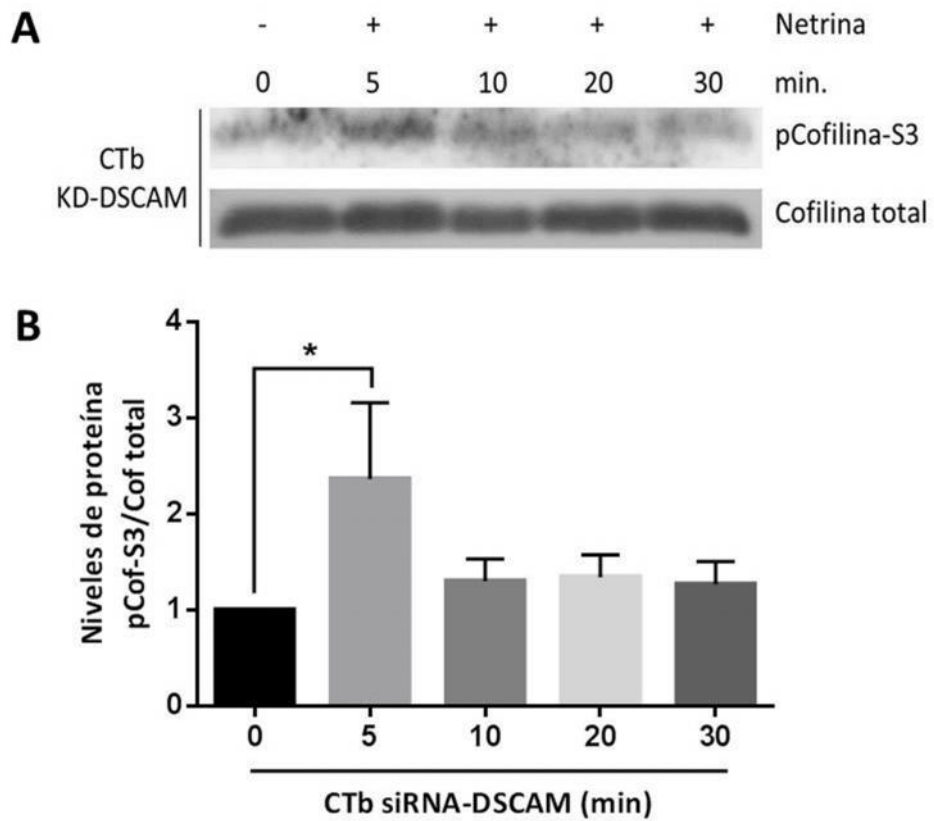




**Figura 30. Estado de activación de Cofilina en las líneas CTb y CNh al estimular con Netrina 1.** **A)** Western Blot representativo de los niveles de pCofilina-S3 en las líneas CTb y CNh, al estimular con Netrina 1 en los tiempos definidos experimentalmente (0, 5, 10, 20 y 30 minutos). **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los pixeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \*p 0,05, Mann Whitney test (Pérez-Núñez R y cols, 2016).

#### **4.4.4.- Cuantificación del estado de activación de Cofilina, con el *knockdown* de DSCAM en la línea celular CTb, al estimular con Netrina**

Con el fin de determinar si el extenso tiempo de activación de Cofilina al estimular con Netrina 1 en la línea celular CTb se debía a la sobreexpresión del receptor DSCAM, nuevamente se llevó a cabo el ensayo tras llevar a cabo el *knockdown* para esta proteína previamente descrito, en el cual a las 24 horas post-transfección y con los niveles proteicos normalizados a los de CNh, se procedió al cambio de medio condicionado NeuroBasal-B27 (bFGF y FK) con su ligando respectivo. Observamos un cambio significativo en el grado de fosforilación en la línea trisómica mediante Western blot, la cual revirtió su prolongado tiempo de activación a niveles comparables con aquellos de la línea control, con un incremento estadísticamente significativo de pCofilina-S3 solo a los 5 minutos, el que vuelve a su nivel basal a los 10 minutos de estimulación (figura 31).



**Figura 31. Estado de activación de Cofilina en la línea CTb con siRNA-DSCAM. A)** Western Blot representativo de los niveles de pCofilina-S3 en la línea CTb, al estimular con Netrina 1 (0, 5, 10, 20 y 30 minutos), previo *knockdown* de DSCAM. **B)** Cuantificación relativa de proteína, realizada mediante análisis densitométrico de los píxeles por área de cada banda. Resultado obtenido de 3 experimentos independientes, donde las barras indican promedio  $\pm$  SEM, \* $p$  0,05, Mann Whitney test.

*En resumen, en este último objetivo se determinó que existe una mayor activación temporal de LIMK1 y Cofilina en la línea trisómica CTb respecto a la línea control CNh, cuando estimulamos con Netrina 1. Esta situación se revierte cuando repetimos el ensayo en condiciones de knockdown para DSCAM en la línea trisómica CTb, donde los niveles de activación fueron similares a aquellos de la línea normal CNh para ambas moléculas.*

## 5.- Discusión

Como se ha mencionado anteriormente, la patología del SD constituye una enfermedad del desarrollo que altera la correcta función a nivel celular (Saud y cols, 2006). Es por ello que este trabajo se focalizó en el estudio celular de la patología con modelos *in vitro*, los cuales nos entregaron indicios fundamentales para su mejor comprensión. De partida, aún no está clara la relación entre el SD y las anomalías estructurales específicas a nivel neuronal (Purpura 1974; Marin-Padilla 1972, 1976; Takashima y cols., 1981; Wisniewski y cols., 1985; Schapiro y cols., 1987, 1989; Schmidt-Sidor y cols., 1990), donde se atribuyen principalmente, y al menos inicialmente, una alteración funcional más que estructural (Takashima y cols., 1981; Schmidt-Sidor y cols., 1990) en el tejido nervioso, lo que también hemos confirmado en nuestro laboratorio con reportes que indican la presencia de defectos funcionales específicos a nivel celular de neuronas trisómicas. En efecto, el estudio electrofisiológico en cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal de pacientes con SD y modelos murinos Ts16, han mostrado que la duración del potencial de acción es mucho más reducido en las células trisómicas comparadas a las neuronas normales (Nieminen y cols., 1988; Caviedes y cols., 1990). Además, se ha reportado una reducida amplitud de corrientes de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje en neuronas del ganglio de la raíz dorsal de Ts16, situación opuesta a la reportada en la línea celular CTb, atribuyendo cada respuesta específica al

territorio que se estudie de manera independiente (Caviedes y cols., 2006; Acuña y cols., 2012). Así mismo, en el SD también se compromete el metabolismo de neurotransmisores a nivel cerebral, expresado en una significativa reducción de noradrenalina en el hipotálamo y la actividad de la colinoacetil transferasa (ChAT) en todo el cerebro (Yates y cols., 1983). Al respecto, en nuestro laboratorio también se han reportado similares disfunciones colinérgicas en neuronas de Ts16 (Fiedler y cols., 1994; Nelson y cols., 1997) y en la línea celular CTb (Allen y cols., 2000; Opazo y cols., 2006). De esta evidencia surge la inquietud de buscar y estudiar genes relacionados al SD que regulen el desarrollo del SNC, específicamente los que afectan la función y estructura neuronal. Últimamente, la perturbación de los circuitos reguladores génicos (CRGs) ha sido implicada en la fisiopatología del SD (Arron y cols., 2006). Estos CRGs llevan a cabo tareas críticas en el desarrollo neuronal, respondiendo a señales del medio y circuitos internos de la célula. Tales canales de comunicación química pueden estar fuertemente afectados por condiciones propias del SD, donde el incremento de la dosis génica podría desregularlos e incluso tener efectos cooperativos entre sí en su desestabilización. Al respecto, un ejemplo notable de lo anterior es la convergencia reportada de dos productos génicos relacionados al SD, como son el Regulador de Calcineurina-1 (RSCR1/Rcan1) y la quinasa regulada por fosforilación de tirosina de especificidad dual 1A (Dyrk1A), en la función del factor transcripcional NFATc4 (Factor Nuclear de Células T Activadas

citoplasmático 4), molécula clave en la función y desarrollo neuronal (Gwack y cols., 2006; Arron y cols., 2006; Epstein, 2006). Esto ha llevado a la búsqueda de puntos de convergencia en tales vías que pueden ser desestabilizadas por más de un producto génico sobreexpresado relacionado al SD, pudiendo en este sentido identificarse atractivos blancos terapéuticos en dichas vías, incluso más allá de los productos génicos sobreexpresados.

Uno de estos genes es *dscam* (del inglés Down Syndrome Cell Adhesion Molecule), el cual tiene importantes funciones en la generación neuronal, sinaptogénesis, crecimiento axonal y arborización dendrítica (Fuerst y cols., 2008; Montesinos, 2014). Una de las vías CRG importantes regulada por DSCAM es la vía PAK, la que juega un rol importante en el crecimiento de neuritas, además de su remodelación (Liu y cols., 2009; Kreis y Barnier, 2009). Por todas estas razones señaladas anteriormente, decidimos estudiar experimentalmente la participación de DSCAM en cuanto a su expresión y regulación sobre PAK como un blanco modulador de estos CRGs en un modelo celular del SD.

### **5.1.- Expresión de DSCAM en las líneas celulares CTb y CNh en condiciones basales y de diferenciación celular**

Nuestro primer objetivo específico consistió en evaluar los niveles de expresión de la proteína de DSCAM en el modelo celular trisómico CTb y compararlo a su control CNh, con el fin de determinar que la copia extra del

cromosoma 16 murino que posee lleva a la sobreexpresión del gen. Siendo esta la etapa limitante dentro de la hipótesis propuesta en este trabajo, porque no necesariamente el tener una copia extra de un cromosoma lleva a su total expresión génica. Ello se debe a la compleja regulación transcripcional que cada gen posee en particular y su relación con otros del mismo u otro cromosoma, además de factores epigenéticos que podrían estar influenciando en todo este escenario.

Además de las condiciones estándar de cultivo celular, estandarizamos las correspondientes a las de diferenciación para poder llevar a cabo los futuros estudios morfológicos y que estas fuesen replicadas para los diferentes ensayos de activación transduccional, que era lo medular en este trabajo. Nuestras condiciones de diferenciación no tuvieron ningún efecto nocivo sobre las líneas celulares en cuanto a la sobrevivencia de las mismas. Además, con la caracterización de ambas líneas celulares, corroboramos el origen neuronal previo a su immortalización (corteza cerebral), ya que estas mismas condiciones de immortalización celular pudiesen haber alterado el patrón de expresión génica, llevando a las células a perder las características del tejido original, o también las condiciones experimentales de nuestra diferenciación pudiesen haber provocado algún efecto en el patrón de expresión de los marcadores neuronales utilizados, como disminuir su señal o modificar su distribución subcelular.



Finalmente la sobreexpresión de DSCAM fue corroborada en la línea trisómica CTb en comparación a su línea control CNh, tanto a nivel proteico como transcripcional, en ambas condiciones de cultivo celular, tanto basales ( $t_0$ ) como a las 72 horas con el medio NeuroBasal-B27 (bFGF y FK). Solo el ensayo de qPCR a las 72 horas no arrojó una diferencia estadísticamente significativa entre las dos líneas celulares, resultado que pudo deberse a la sensibilidad de la técnica y el tipo de cuantificación que se utilizó, siendo esta de manera relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) con respecto a CNh  $t_0$  como condición calibradora, pero que de igual manera continua con la misma tendencia anterior. Sin embargo, debe destacarse que DSCAM ejerce su función como receptor de transmembrana, y su ubicación en esta localización celular está verificada su sobreexpresión en la línea trisómica por diferentes ensayos experimentales.

Este primer acercamiento, cual es la verificación de la expresión de DSCAM en nuestros modelos celulares, fue de gran relevancia por lo propuesto en la hipótesis. Ello permitió continuar evaluando como la sobreexpresión de esta molécula de adhesión celular en la línea trisómica, ejerce su acción sobre diferentes aspectos estructurales a través de vías transduccionales río abajo de este receptor, que regulan directamente el reordenamiento del citoesqueleto, y con ello entregarnos indicios de una deficiencia a nivel estructural en esta patología, a la que ya se le atribuyen variadas anomalías funcionales en diferentes modelos murinos del SD.

## **5.2.- Análisis de parámetros morfológicos neuronales en las líneas celulares CTb y CNh**

Una vez conocido que en nuestra línea celular CTb expresaba mayores niveles de DSCAM que la línea control CNh, evaluamos el cambio morfológico celular hacia un fenotipo más neuronal al cultivar estas líneas celulares con el medio NeuroBasal-B27 (bFGF y FK), donde la línea CTb mostró un menor desarrollo o complejidad neuronal en cuanto al número de neuritas y la extensión de estas que la línea CNh, similar a lo observado por Alves-Sampaio y cols (2010) en el contexto de una sobreexpresión de DSCAM, dando cuenta con esto que la línea trisómica posee una desregulación de las vías encargadas del reordenamiento del citoesqueleto, lo que se traduce finalmente en una deficiencia estructural en esta patología pero que hasta este momento no era atribuible a la sobreexpresión de DSCAM, sumado al desbalance funcional que se ha reportado en este mismo modelo del SD y al número de genes triplicados. Es por esto que evaluamos la respuesta celular al agregar al medio de cultivo NeuroBasal-B27 el ligando específico de DSCAM, Netrina 1 (Palmesino y cols, 2012) lo que reflejó por una parte la acción diferencial de Netrina sobre nuestros modelos celulares en cuanto a la extensión de procesos como molécula quimioattractante y no así en el número de estos. Y por otra parte, que la línea trisómica no generó ningún tipo de respuesta frente al ligando específico de DSCAM, partiendo de la base del primer resultado de este objetivo, de una menor complejidad neuronal con respecto a su línea control.

En base a lo anterior evaluamos el grado de relación que tenía la sobreexpresión de DSCAM sobre el aspecto morfométrico en la línea trisómica CTb, disminuyendo los niveles de DSCAM en esta línea mediante el *knockdown* de DSCAM (KD-DSCAM), lo que no logró revertir en cuanto al número de procesos en la línea CTb comparado a la línea CNh, pudiéndose atribuir al efecto cooperativo que ejerza con alguna otra molécula de membrana celular o intracelular que también tenga injerencia con la generación de nuevos procesos, o simplemente la célula trisómica por la cantidad de sobredosis génica y en particular de vías involucradas en este aspecto no puede promover más procesos. Solo cuando añadimos Netrina a la condición CTb con el KD-DSCAM esta logra alcanzar niveles similares a la condición normal CNh basal, pero distante de lo observado en esta misma línea control cuando estimulamos con este ligando. En efecto, la reversión del fenotipo trisómico encontrado en las células CTb fue solo parcial, pudiendo ser ello un efecto acumulativo propio del modelo celular, que al tener un cromosoma extra se suman todos los efectos de los diferentes genes sobreexpresados, y por otra parte el papel que pudiesen estar teniendo otras proteínas o moléculas relacionadas con el desarrollo y reorganización del citoesqueleto en cuanto a la estabilización, ramificación, corte o polimerización de los filamentos de actina (Yu y cols, 2008), esenciales en cuanto a la extensión de procesos y que estén siendo reguladas directa o indirectamente por genes del cromosoma extra.

### **5.3.- Análisis de los niveles de expresión y activación de PAK en las líneas celulares CTb y CNh**

Como se ha mencionado anteriormente, dentro de las vías transduccionales relacionadas con la regulación y remodelamiento del citoesqueleto, está la vía comandada por las quinasas PAKs y que se ha reportado como molécula blanco de DSCAM (Schmucker y cols., 2000). Con una mayor abundancia de PAK1 en ambas líneas celulares y siendo la más estudiada en cuanto a su rol en procesos del desarrollo, mantención y diferenciación neuronal (Kreis y Barnier, 2009), a diferencia de PAK2, que es más ubicua en otros tejidos y PAK3 que posee una baja expresión en nuestros modelos celulares, decidimos por tanto trabajar con PAK1 en los estudios de activación de la vía, mediante su grado de fosforilación en el residuo de Serina 204, sitio de autofosforilación específico para PAK1. Confirmamos inicialmente que tanto la expresión como activación de la quinasa, no presentaba diferencias entre las dos líneas celulares. Ello es entendible pues el gen de *pak1* está ubicado en el cromosoma 7 en ratón, por lo tanto no deberían esperarse diferencias en cuanto a su expresión entre los dos modelos celulares. A su vez, las condiciones de la diferenciación no afectaron la regulación de esta, lo que nos clarificó el escenario de la vía comandada por DSCAM sobre PAK, pensando en un posible blanco terapéutico en el cual convergen otras señales transduccionales gatilladas por diferentes estímulos.

Como es sabido, los estados de activación transduccional, estos son más fásicos que tónicos en la naturaleza, ya que son procesos sumamente regulados por quinasas y fosfatasas que operan con un margen bastante estrecho por cada vía de señalización que se activa o inhibe, acotamos consecuentemente la ventana temporal de pesquisa de su estado fosforilado hasta los 30 minutos, como se ha reportado en la literatura para estas mismas moléculas. Usando Netrina como gatillante de DSCAM a través de su afecto activador (Zhu y cols., 2013; Purohit y cols., 2012), determinamos que la vía en la línea trisómica estaba más activa que en la línea control, permaneciendo activada por un tiempo más prolongado. Este efecto fue revertido mediante KD, indicándonos que los niveles de fosforilación de PAK1 están relacionados directamente con la sobreexpresión de DSCAM en la línea trisómica al estimular a este receptor con su agonista específico, reclutando con esto mayor cantidad de PAK1 a nivel de la membrana celular donde es normalmente activada. Por tanto, en el marco de la patología del SD, PAK1 se mantendría activada por más tiempo que en la condición control, afectando una vía transduccional clave en variados procesos celulares que regulan el correcto desarrollo y mantención de la red neuronal. Estos resultados confirman lo observado en otros modelos celulares, en cuanto a la activación de esta quinasa vía DSCAM, y que entregan interesantes pistas del rol de este receptor en el SD, desconociendo aún si esta activación es directa o se realiza a través de una molécula adaptadora como ocurre en *Drosophila* (Schmucker y cols, 2000).

#### **5.4.- Estudio de la activación de blancos moleculares río abajo de la vía PAK, mediante el estado de fosforilación de LIMK1 y Cofilina en las líneas celulares CTb y CNh**

Como último punto a evaluar dentro de la regulación de la vía PAK, nos centramos en sus blancos río abajo, como son LIMK1 y Cofilina. Tras la estimulación con Netrina, LIMK1 exhibió un patrón de activación similar a la observada con PAK1, donde volvimos a ver una mayor activación y mantención en el tiempo en la línea CTb. Esta respuesta se revirtió en su totalidad con el KD-DSCAM. Este mismo comportamiento se observó al analizar la activación de Cofilina efector directo de LIMK1. Cofilina, a su vez, es la encargada directa de la regulación de F-actina, en cuanto a su corte (depolimerización) con el fin de obtener los monómeros suficientes como sustrato para la elongación de estos filamentos.

Con lo reportado hasta el momento, acerca de estas importantes dianas moleculares que regulan el citoesqueleto y en las que se comprobó que en la condición trisómica existe un incremento significativo en su estado de fosforilación. Al final de la vía, estimamos que la mayor fosforilación de Cofilina, resulta en su inhibición, reduciendo su efecto sobre la actina y generando posiblemente una acumulación de la forma F- sobre G-, algo que hemos reportado recientemente (Pérez-Núñez y cols, 2016; Arber y cols., 1998). Como modulador de la fosforilación de Cofilina, se ha visto que una sobreactivación de

LIMK1 en neuronas hipocampales de rata, resulta en un colapso del cono de crecimiento, retracción axonal y una reducción significativa en el número de ramificaciones colaterales (Rosso y cols., 2004). Además, se han reportado dramáticos aumentos de la fosforilación de Cofilina, la cual queda inactivada por tiempos más prolongados, llevando a una acumulación de F-actina, alterando las dinámicas de actina y con ello interrumpiendo el crecimiento de neuritas y la integridad axonal (Cook y cols., 2014).

Estos antecedentes se complementan a los resultados observados en nuestro laboratorio, donde reiteramos un incremento de la razón F/G actina en la línea CTb con respecto a CNh en condiciones basales de proliferación (Pérez-Núñez R y cols, 2016). Curiosamente, un mecanismo de este tipo podría ser la base de otras enfermedades neuronales que dan lugar a un deterioro en la extensión de procesos y que se relacionarían con lo observado en nuestros ensayos morfológicos. De hecho, en modelos de neuronas de esclerosis lateral amiotrófica familiar, la desregulación de la relación F/G actina, especialmente en las zonas de alta dinámica de actina como el cono de crecimiento, dan como resultado una reducción significativa en su tamaño, así como una morfología alterada de este (Wu et al. 2012). También en la atrofia muscular espinal (AME), la hiperfosforilación de Cofilina se ha relacionado con el aumento de la razón F/G actina, lo que lleva a una disminución en la extensión de procesos neuronales (Nölle y cols., 2011), mencionando además que una acumulación

anormal de F-actina constituye un sustrato para una degeneración neuronal vinculada a la enfermedad de Alzheimer (Fulga y cols., 2007). De ahí que la hiperactividad de la vía PAK, en este caso debido a la sobreexpresión de DSCAM, podría inducir un desbalance en las dinámicas de actina en la condición trisómica, favoreciendo con ello la acumulación de la F-actina, impidiendo la capacidad de remodelación de estos filamentos para extender procesos en nuestro modelo celular trisómico. Ello se ve reflejado claramente en los ensayos morfométricos realizados en esta línea, donde se observó un menor desarrollo neuronal en todos los parámetros medidos con respecto a su línea control. Además, este modelo trisómico también se vería afectado por la regulación que poseen estas mismas moléculas en particular Cofilina, determinada por la acción de sus fosfatasas específicas como Slingshot (SSH) y Chronophin (CIN) (Pontrello y Ethell, 2009), las cuales podrían estar siendo inhibidas por RCAN1, el cual como se había mencionado anteriormente se encuentra en la región crítica del SD y es el regulador de Calcineurina, molécula que activa a SSH. Ello también podría contribuir al mayor tiempo que le toma a Cofilina volver a su estado basal de activación. Finalmente, se ha reportado que LIMK1 es activada por otra quinasa como es ROCK, la cual es regulada por la familia de las RhoGTPasas, las mismas que modulan la activación de PAK, incrementando el tiempo de fosforilación de LIMK1 y con ello la estabilización de los filamentos de actina que regulan estas moléculas.



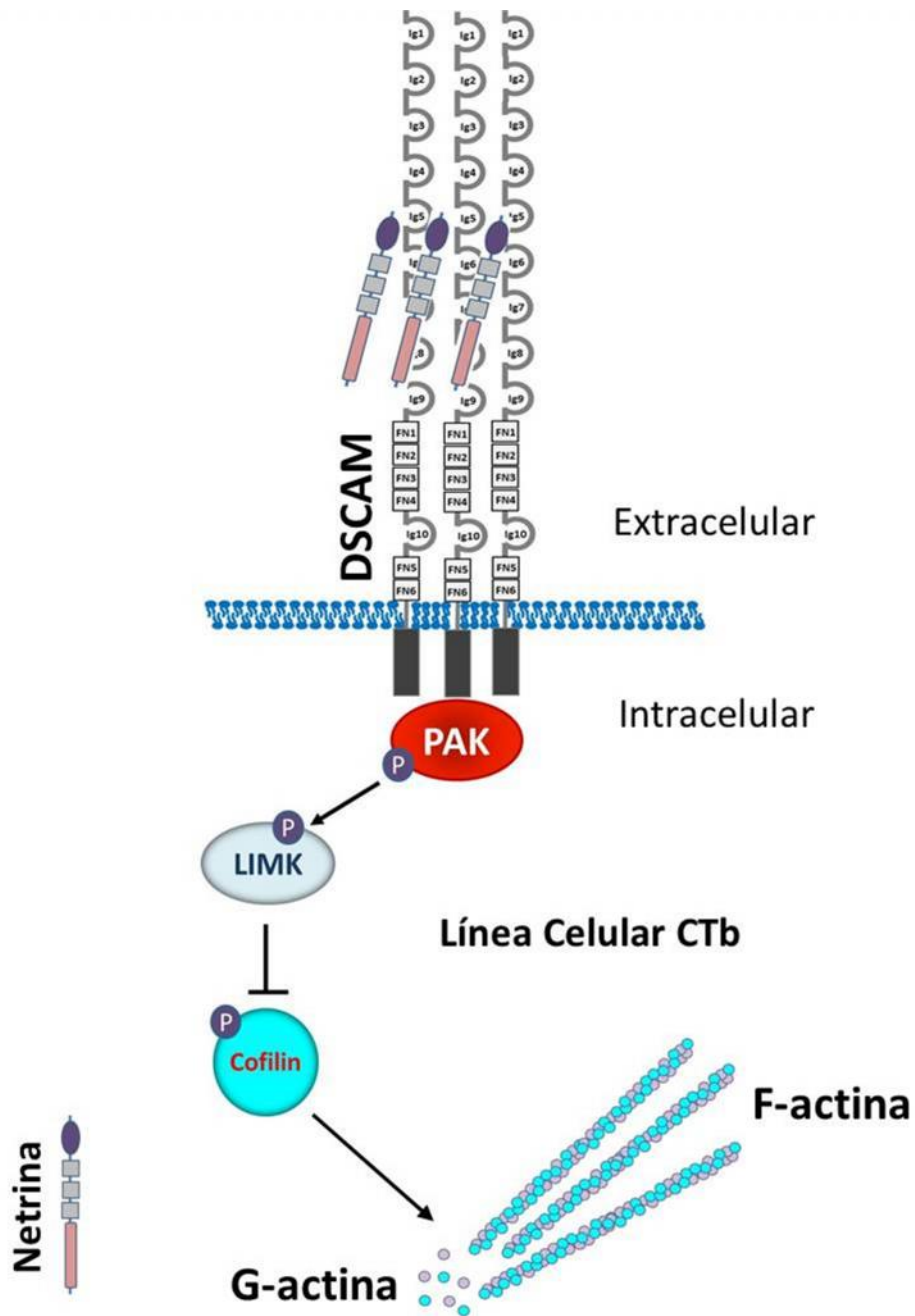
## 6.- Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, podemos confirmar la sobreexpresión de DSCAM en la línea celular CTb con respecto a su línea control CNh tanto en condiciones basales como de diferenciación celular. Morfológicamente, la línea celular trisómica posee una menor complejidad neuronal, tras la diferenciación *in vitro*, tanto en el número como el largo total de sus neuritas, en comparación a la línea celular normal. A su vez, la línea trisómica, midiendo los mismos parámetros morfométricos señalados, tampoco responde como su contraparte control frente a Netrina. Al normalizar los niveles de expresión de DSCAM en la línea CTb a la línea CNh mediante *knockdown*, estos aspectos morfológicos se revierten de manera parcial y solo en el largo total de los procesos se lograron valores similares a los exhibidos por la línea normal CNh.

Adicionalmente, demostramos la presencia de una mayor abundancia de la quinasa PAK1 del grupo I en nuestros modelos celulares, la cual no cambia su expresión durante el tiempo de diferenciación. Al estimular estas líneas celulares con Netrina, se determinó una mayor y más prolongada activación de esta quinasa con respecto a su control, efecto que fue revertido con el KD-DSCAM en la línea CTb, logrando niveles similares a los observados en la línea normal CNh.

Finalmente, la vía transduccional de PAK que involucra a LIMK1 y Cofilina, presenta una mayor activación al estimular con Netrina en la línea CTb con respecto a la línea control, perdurando por más tiempo en su estado de fosforilación. Una vez más, este efecto fue revertido de manera similar al anterior con el KD-DSCAM en la línea CTb, logrando niveles similares a los observados en la línea normal CNh.

Por lo tanto, en este trabajo identificamos un circuito regulador clave dentro de la patología del SD, graficado en el modelo final de la vía de señalización (figura 32), donde PAK juega un rol relevante como potencial blanco terapéutico específico, mediante el empleo de sus inhibidores (IPA-3 o FRAX486), los cuales podrían generar agentes farmacológicos que revertirían el desbalance transduccional reportado.



**Figura 32. Modelo propuesto de la sobreexpresión de DSCAM sobre la vía PAK en la línea celular CTb.** La sobreexpresión del receptor DSCAM en la línea trisómica CTb resultó en una mayor activación transduccional al estimular con el ligando específico de esta proteína (Netrina), incrementando el estado y tiempo de fosforilación de cada uno de los componentes de la vía y con ello provocando una discapacidad en el remodelamiento dinámico del citoesqueleto de actina en cuanto a la formación y extensión de neuritas.

## 7.- Proyecciones

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se da cuenta de la relevancia de DSCAM tanto en la parte morfológica como la transduccional al estar implicado en la regulación del citoesqueleto. Ello genera un abanico amplio de interrogantes que van en la misma dirección del presente trabajo en estos mismos modelos celulares.

Sería interesante determinar cómo se establece la comunicación entre DSCAM y PAK, ya que la información actual realizada en modelos celulares de *Drosophila* indica que se lleva a cabo es a través de moléculas adaptadoras, pero en mamíferos se desconoce hasta la fecha si esta interacción es directa o no. Además no existen estudios a este mismo nivel de interacción, con otras moléculas que podrían estar siendo activadas por DSCAM.

Uno de los proyectos que se está empezando a implementar en nuestro laboratorio y que será evaluado de la misma manera como se realizó en esta tesis, es de probar inhibidores farmacológicos contra PAK como blanco terapéutico, ya que posee variados roles en diferentes funciones vitales de la célula. Posteriormente, se puede continuar río abajo de PAK con moléculas que también están vinculadas al reordenamiento del citoesqueleto como JNK y p38 (Alberini, 2009; Bagrodia y cols, 1995), que han sido reportadas como blancos en la activación inducidas por Netrina.

## 8.- Referencias

- Acuña M, Pérez-Núñez R, Noriega J, Cárdenas A, Bacigalupo J, Delgado R, Arriagada C, Segura-Aguilar J, Caviedes R y Caviedes P (2012) Altered Voltage dependent Calcium currents in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 fetal mouse, an animal model of Down syndrome. *Neurotox Res* 22(1):59-68
- Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89(1):121-45
- Allen D, Cárdenas A, Arriagada C, Bennett L, García C, Rapoport S, Caviedes R y Caviedes P (2002) A dorsal root ganglia cell line derived from trisomy 16 fetal mice, a model for Down Syndrome. *Neuroreport* 13:491-496
- Allen D, Martín J, Arriagada C, Cárdenas AM, Rapoport S, Caviedes R y Caviedes P (2000) Impaired cholinergic function in cell lines derived from the cerebral cortex of normal and trisomy 16 mice. *Eur J Neurosci* 12(9):3259-3264
- Allen D, Jaffer Z, Park S, Burgin S, Hofmann C, Sells M, Chen S, Derr-Yellin E, Michels E, McDaniel A, Bessler W, Ingram D, Atkinson S, Travers J, Chernoff J y Wade C (2009) p21-activated kinase regulates mast cell degranulation via effects on calcium mobilization and cytoskeletal dynamics. *Blood* 113:2695-2705
- Allen K, Gleeson J, Bagrodia S, Partington M, MacMillan J, Cerione R, Mulley J y Walsh C (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* 20:25-30
- Alves-Sampaio A, Troca-Marín J y Montesinos M (2010) NMDA-Mediated Regulation of DSCAM Dendritic Local Translation Is Lost in a Mouse Model of Down's Syndrome. *J Neurosci* 30:13537-13548

- Arber S, Barbayannis F, Hanser H, Schneider C, Stanyon C, Bernard O y Caroni P (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393(6687):805-9
- Arias-Romero L y Chernoff J (2008) A tale of two Paks. *Biol Cell* 100:97-108
- Arriagada C, Astorga C, Atwater I, Rojas E, Mears D, Caviedes R y Caviedes P (2007) Endosomal abnormalities related to amyloid precursor protein in cholesterol treated cerebral cortex neuronal cells derived from trisomy 16 mice, an animal model of Down syndrome. *Neurosci Lett* 423(2):172-177
- Arron J, Winslow M, Polleri A, Chang C, Wu H, Gao X, Neilson J, Chen L, Heit J, Kim S, Yamasaki N, Miyakawa T, Francke U, Graef I y Crabtree G (2006) NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 7093:595-600
- Ault B, Caviedes P y Rapoport S (1989) Neurophysiological abnormalities in cultured dorsal root ganglion neurons from the trisomy 16 mouse fetus, a model for Down Syndrome. *Brain Res* 485:165-170
- Bagrodia S, Dérijard B, Davis R y Cerione R (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 270(47):27995-27998.
- Bahn S, Mimmack M, Ryan M, Caldwell M, Jauniaux E, Starkey M, Svendsen CN y Emson P (2002) Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study. *Lancet* 359(9303):310-5
- Bianchi P, Ciani E, Guidi S, Trazzi S, Felice D, Grossi G, Fernandez M, Giuliani A, Calzá L y Bartesaghi R (2010) Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *J Neurosci* 30:8769-79
- Bokoch GM (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72:743-81

- Cárdenas A, Allen D, Arriagada C, Olivares A, Bennett L, Caviedes R, Dagnino-Subiabre A, Mendoza I, Segura-Aguilar J, Rapoport S y Caviedes P (2002a) Establishment and characterization of immortalized neuronal cell lines derived from the spinal cord of normal and trisomy 16 fetal mice, an animal model of Down Syndrome. *J Neurosci Res* 68:46-58
- Cárdenas A, Arriagada C, Allen D, Caviedes R, Cortes J, Martín J, Couve E, Rapoport S, Shimahara T y Caviedes P (2002b) Neuronal cell lines from the hippocampus of the normal and trisomy 16 mouse fetus (a model for down syndrome) exhibit neuronal markers, cholinergic function and functional neurotransmitter receptors. *Exp Neurol* 177:159-170
- Cárdenas A, Rodríguez M, Cortés M, Alvarez R, Wei W, Rapoport S, Shimahara T, Caviedes R y 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
- Caviedes P, Ault B y Rapoport S (1990) The role of altered sodium currents in the action potential abnormalities of cultured dorsal root ganglion neurons from trisomy 21 (Down syndrome) human fetuses. *Brain Res* 510:229-236
- Caviedes P, Caviedes R y Rapoport S (2006) Altered calcium currents in cultured sensory neurons of normal and trisomy 16 mouse fetuses, an animal model for human trisomy 21 (Down syndrome). *Biol Res* 39:471-481
- Chen B, Kondo M, Garnier A, Watson F, Puettmann-Holgado F, Lamar D y Schmucker D (2006) The molecular diversity of DSCAM is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell* 125:607-620
- Chong C, Tan L, Lim L y Manser E (2001) The Mechanism of PAK Activation. *J Biol Chem* 276(20):17347-17353
- Cook M, Bolkan B y Kretzschmar D (2014) Increased actin polymerization and stabilization interferes with neuronal function and survival in the AMPK mutant. *Loechrig PLoS One* 25;9(2):e89847

- Créau N (2012) Molecular and cellular alterations in Down syndrome: toward the identification of targets for therapeutics. *Neural Plast* 2012:171639
- Delabar J, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin J, Prieur M, Noel B y Sinet P (1993) Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1:114-124
- Dierssen M, Herault Y y Estivill X (2009) Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down Syndrome. *Physiol Rev* 89:887-920
- Epstein CJ (1986a) *The Neurobiology of Down syndrome*. Raven Press NY 1-15
- Epstein CJ (1986b) *The Consequence of Chromosomal Imbalance: Principles, Mechanisms, Models*. Cambridge Univ Press New York
- Epstein CJ (2006) Down's syndrome: critical genes in a critical region. *Nature* 441(7093):582-583
- Epstein CJ, Korenberg J, Anneren G, Antonarakis S, Ayme S, Courchesne E, Epstein L, Fowler A, Groner Y y Huret J (1991) Protocols to establish genotype-phenotype correlations in Down syndrome. *Am J Hum Genet* 49:207-235
- Fiedler J, Rapoport S, Epstein C, Caviedes R y 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
- Fodale F, Mafrica F, Caminiti V y Grasso G (2006) The cholinergic system in Down's syndrome. *J of Intel Disab* 10:261-274
- Fuerst P, Koizumi A, Masland R y Burgess R (2008) Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM. *Nature* 451(7177):470-4
- Fulga T, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb M, Spires T, Hyman B y Feany M (2007) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9(2):139-48



- Galdzicki Z, Coan E, Rapoport S y Stoll J (1998) Increased expression of voltage-activated calcium channels in cultured hippocampal neurons from mouse trisomy 16, a model for Down syndrome. *Brain Res Rev* 56(1-2):200-6
- Galdzicki Z, Siarey R, Pearce R, Stoll J y Rapoport S (2001) On the cause of mental retardation in Down syndrome: extrapolation from full and segmental trisomy 16 mouse models. *Brain Res Rev* 35:115-145
- Gwack Y, Sharma S, Nardone J, Tanasa B, Iuga A, Srikanth S, Okamura H, Bolton D, Feske S, Hogan P y Rao A (2006) A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441(7093):646-650
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor T y Watanabe H (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405(18):311-319
- Hattori D, Millard S, Wojtowicz W y Zipursky S (2008) Dscam-mediated cell recognition regulates neural circuit formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24(1):597-620
- Haxby J (1989) Neuropsychological evaluation of adults with Down's syndrome: patterns of selective impairment in non-demented old adults. *J Ment Defic Res* 33:193-210
- Hayashi M, Choi S, Rao B, Jung H, Lee H, Zhang D, Chattarji S, Kirkwood A y Tonegawa S (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* 42:773-787
- Haydar T y Reeves R (2012) Trisomy 21 and early brain development. *Trends Neurosci* 35(2):81-91
- Head E, Lott I, Patterson D, Doran E y Haier R (2007) Possible compensatory events in adult Down syndrome brain prior to the development of Alzheimer disease neuropathology: targets for nonpharmacological intervention. *J Alzheimers Dis* 11:61-76

- Hofmann C, Shepelev M y Chernoff J (2004) The genetic of Pak. *J Cell Sci* 117(19):4343-4354
- Huang H, Shao Q, Qu C, Yang T, Dwyer T y Liu G (2015) Coordinated interaction of Down syndrome cell adhesion molecule and deleted in colorectal cancer with dynamic TUBB3 mediates Netrin-1-induced axon branching. *Neuroscience* 293:109-22
- Jang S, Cho H, Cho Y, Park J y Jeong H (2010) Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol* 11:25,2121-11-25
- Jia Y, Jing L, Li J, Lu J, Han R, Wang S, Peng T y Jia Y (2011) Expression and significance of DSCAM in the cerebral cortex of APP transgenic mice. *Neuroscience Letters* 491:153-157
- Kreis P y Barnier JV (2009) PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* 21(3):384-393
- Lai K, Correia J y Kennedy T (2011) Netrins: versatile extracellular cues with diverse funtions. *Development* 138(11):2153-2169
- Liu G, Li W, Wang L, Kar A, Guan K, Rao Y y Wu J (2009) DSCAM functions as a netrin receptor in commissural axon pathfinding. *PNAS* 106(8):2951-2956
- Livak K y Schmittgen T (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods* 25:402-408
- Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M y Stein E (2008) DSCAM is a Netrin Receptor that Collaborates with DCC in Mediating Turning Responses to Netrin-1. *Cell* 133:1241-1254
- Ma Q, Yang F, Calon F, Ubeda O, Hansen J, Weisbart R, Beech W, Frautschy S y Cole G (2008) p21-activated kinase-aberrant activation and translocation in Alzheimer disease pathogenesis. *J Biol Chem* 283(20):14132-43

- Marin-Padilla M (1972) Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Res* 44:625-44:629
- Marin-Padilla M (1976) Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome: a Golgi study. *J Comp Neurol* 167:63-81
- Millard S y Zipursky S (2008) DSCAM-mediated repulsion controls tiling and selfavoidance. *Curr Opin Neurobiol* 18:84-89
- Montesinos ML (2014) Roles for DSCAM and DSCAML1 in central nervous system development and disease. *Adv Neurobiol* 8:249-70
- Nazer J y Cifuentes L (2011) Global epidemiological study of Down's syndrome. *Rev Chil Pediatr* 82(2):105-112
- Nelson P, Fitzgerald S, Rapoport S, Neale E, Galdzicki Z, Dunlap V, Bowers L y Agoston D (1997) Cerebral cortical astroglia from the trisomy 16 mouse, a model for down syndrome, produce neuronal cholinergic deficits in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(23):12644-8
- Nieminen K, Suárez-Isla B y Rapoport S (1988) Electrical properties of cultured dorsal root ganglion neurons from normal and trisomy 21 human fetal tissue. *Brain Res* 474:246-254
- Nölle A, Zeug A, van Bergeijk J, Tönges L, Gerhard R, Brinkmann H, Al Rayes S, Hensel N, Schill Y, Apkhazava D, Jablonka S, O'mer J, Srivastav R, Baasner A, Lingor P, Wirth B, Ponimaskin E, Niedenthal R, Grothe C y Claus P (2011) The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the rho-kinase pathway via profiling. *Hum Mol Genet* 20(24):4865-4878
- Olson L, Richtsmeier J, Leszl J y Reeves R (2004) A Chromosome 21 Critical Region Does Not Cause Specific Down Syndrome Phenotypes. *Science* 306(5696):687-690
- Opazo P, Saud K, de Saint Pierre M, Cárdenas A, Allen D, Segura-Aguilar J, Caviedes R y Caviedes P (2006) Knockdown of amyloid precursor protein normalizes cholinergic function in a cell line derived from the cerebral cortex

- of a trisomy 16 mouse, an animal model of Down syndrome. *J Neurosci Res* 84:1303-1310
- Oster-Granite ML (1986) The neurobiologic consequences of autosomal trisomy in mice and men. *Brain Res Bull* 16:767-771
  - Palmesino E, Haddick P, Tessier-Lavigne M y Kania A (2012) Genetic analysis of DSCAM's role as a Netrin-1 receptor in vertebrates. *J Neurosci* 32(2):411-416
  - Park J, Song W y Chung K (2009) Function and regulation of Dyrk1A: Towards understanding Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 66:3235-3240
  - Pérez-Núñez R, Barraza N, Gonzalez-Jamett A, Cárdenas AM, Barnier JV y Caviedes P (2016) Overexpressed Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) Deregulates P21-Activated Kinase (PAK) Activity in an In Vitro Neuronal Model of Down Syndrome: Consequences on Cell Process Formation and Extension. *Neurotox Res* 30(1):76-87
  - Pontrello C y Ethell I (2009) Accelerators, Brakes and Gears of Actin Dynamics in Dendritic Spines. *Open Neurosci J* 3:67-86
  - Pulsifer MB (1996) The neuropsychology of mental retardation. *J Int Neuropsychol Soc* 2:159-176
  - Purohit A, Li W, Qu Ch, Dwyer T, Shao Q, Guan K y Liu G (2012) Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) Associates with Uncoordinated-5C (UNC5C) in Netrin-1-mediated Growth Cone Collapse. *J Biol Chem* 287:27126-27138
  - Purpura DP (1974) Dendritic spine 'dysgenesis' and mental retardation. *Science* 186:1126-1128
  - Qu Ch, Li W, Shao Q, Dwyer T, Huang H, Yang T y Liu G (2013) c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) Is Required for Coordination of Netrin Signaling in Axon Guidance. *J Biol Chem* 288:1883-1895
  - Rachidi M y Lopes C (2008) Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: A consequence of dysregulation in critical

- chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Euro J of Paediatric Neuro* 12:168-182
- Rahmani Z, Blouin J, Creau-Goldberg N, Watkins P, Mattei J, Poissonnier M, Prieur M, Chettouh Z, Nicole A, Aurias A, Sinet P y Delabar J (1989) Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 86:5958-5962
  - Rajasekharan S y Kennedy T (2009) The netrin protein family. *Gen Biol* 10:239-247
  - Rapoport SI (1988) Brain evolution and Alzheimer's disease. *Rev Neurol* 144:79-90
  - Reeves R, Gearhart J y Littlefield J (1986) Genetic basis for a mouse model of Down syndrome. *Brain Res Bull* 16:803-814
  - Rojas G, Cárdenas AM, Fernández-Olivares P, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes R y Caviedes P (2008) Effect of APP knockdown on intracellular calcium increases in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 mouse, an animal model of Down syndrome. *Exp Neurol* 209:234-242
  - Rosso S, Bollati F, Bisbal M, Peretti D, Sumi T, Nakamura T, Quiroga S, Ferreira A y Cáceres A (2004) LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons. *Mol Biol Cell* 15(7):3433-4
  - Saito Y, Oka A, Mizuguchi M, Motonaga K, Mori Y, Becker L, Arima K, Miyauchi J y Takashima S (2000) The developmental and aging changes of Down's syndrome cell adhesion molecule expression in normal and Down's syndrome brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 100:654-664
  - Saud K, Arriagada C, Cárdenas A, Shimahara T, Allen D, Caviedes R y Caviedes P (2006) Neuronal dysfunction in Down syndrome: Contribution of neuronal models in cell culture. *J Physiol* 99:201-210

- Schapiro M, Creasey H, Schwartz M, Haxby J, White B, Moore A y Rapoport S (1987) Quantitative CT analysis of brain morphometry in adult Down's syndrome at different ages. *Neurology* 37:1424-1427
- Schapiro M, Luxenberg J, Kaye J, Haxby J, Friedland R y Rapoport S (1989) Serial quantitative CT analysis of brain morphometrics in adult Down's syndrome at different ages. *Neurology* 39:1349-1353
- Schmidt-Sidor B, Wisniewski K, Shepard T y Sersen E (1990) Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months. *Clin Neuropathol* 9:181-190
- Schmucker D (2007) Molecular diversity of Dscam: recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nat Rev Neurosci* 8:915-920
- Schmucker D y Chen B (2009) Dscam and DSCAM: complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes Dev* 23(2):147-5
- Schmucker D, Clemens J, Shu H, Worby C, Xiao J, Muda M, Dixon J y Zipursky S (2000) *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101:671-684
- Schuchmann S, Müller W y Heinemann U (1998) Altered Ca<sup>+2</sup> signaling and mitochondrial deficiencies in hippocampal neurons of trisomy 16 mice: A model of Down's syndrome. *J Neurosci* 18:7216-7231
- Shi Y, Pontrello C, DeFea K, Reichardt L y Ethell I (2009) Focal Adhesion Kinase Acts Downstream of EphB Receptors to Maintain Mature Dendritic Spines by Regulating Cofilin Activity. *J Neurosci* 29(25):8129-8142
- Sholl D (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87(4):387-406
- Takashima S, Becker L, Armstrong D y Chan F (1981) Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with Down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res* 225:1-21
- Weitzdoerfer R, Dierssen M, Fountoulakis M y Lubec G (2001) Fetal Life in Down's Syndrome Starts with Normal Neuronal Density but Impaired

Dendritic Spines and Synaptosomal Structure. *J of Neuro Transmission Supplem* 61:59-70

- Wisniewski K, Wisniewski H y Wen G (1985) Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 17:278-282
- Wu Ch, Fallini C, Ticozzi N, Keagle P, Sapp P, Piotrowska K, Lowe P, Koppers M, McKenna-Yasek D, Baron D, Kost J, Gonzalez-Perez P, Fox A, Adams J, Taroni F, Tiloca C, Leclerc A, Chafe S, Mangroo D, Moore M, Zitzewitz J, Xu Z, van den Berg L, Glass J, Siciliano G, Cirulli E, Goldstein D, Salachas F, Meininger V, Rossoll W, Ratti A, Gellera C, Bosco D, Bassell G, Silani V, Drory V, Brown R y Landers J (2012) Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488:499-503
- Yates C, Simpson J, Gordon A, Maloney A, Allison Y, Ritchie I y Urquart A (1983) Catecholamines and cholinergic enzymes in pre-senile and senile Alzheimer-type dementia and Down's syndrome. *Brain Res* 280:119-126
- Yu J, Chung K, Deo M, Thompson R y Turner D (2008) MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp Cell Res* 314:2618-2633
- Zhu K, Chen X, Liu J, Ye H, Zhu L y Wu J (2013) AMPK interacts with DSCAM and plays an important role in Netrin-1 induced neurite outgrowth. *Protein Cell* 4(2):155-161