

TESIS DOCTORAL

ALTERACIONES CELULARES ASOCIADAS AL EXCESO DE  
DOSIS GÉNICA O AL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS  
GRANURALES DEL HIPOCAMPO EN UN MODELO DE  
SÍNDROME DE DOWN

PhD THESIS

CELLULAR ALTERATIONS ASSOCIATED WITH EXCESS GENE  
DOSE OR OXIDATIVE STRESS IN HIPPOCAMPAL GRANULE  
CELLS OF A DOWN SYNDROME MOUSE MODEL

AUTOR / AUTORA

ALBA PUENTE BEDIA

DIRECTOR / A / ES / AS

CARMEN MARTÍNEZ-CUÉ PESINI

NOEMÍ RUEDA REVILLA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Escuela de **Doctorado** de la Universidad de Cantabria

Santander 2022





UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

**ALTERACIONES CELULARES ASOCIADAS AL EXCESO DE DOSIS  
GÉNICA O DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS GRANULARES DEL  
HIPOCAMPO DE UN MODELO DE SÍNDROME DE DOWN**

**Directoras:**

**Dra. Carmen Martínez-Cué Pesini**

**Dra. Noemí Rueda Revilla**

**Tesis Doctoral presentada por Alba Puente Bedia para optar al Grado de  
Doctor por la Universidad de Cantabria**

Santander, septiembre 2022



**Dña. Carmen Martínez-Cue Pesini**, Catedrática de Farmacología y **Dña. Noemí Rueda Revilla**, Profesora Titular de Fisiología, del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Cantabria

### CERTIFICAN

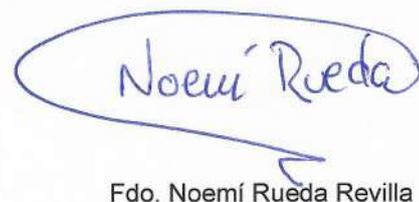
Que Dña. Alba Puente Bedia ha realizado bajo nuestra dirección el presente Trabajo de Tesis Doctoral titulado "Alteraciones celulares asociadas al exceso de dosis génica o de estrés oxidativo en las células granulares del hipocampo de un modelo de síndrome de Down".

Consideramos que dicho trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado al objeto de poder optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 18 de septiembre de 2022

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature is stylized and appears to read 'Carmen Martínez-Cué'.

Fdo. Carmen Martínez-Cué

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature clearly reads 'Noemí Rueda'.

Fdo. Noemí Rueda Revilla



## **Agradecimientos**

---



En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras de Tesis, Carmen Martínez-Cué y Noemí Rueda, haber confiado en mí porque sin eso nada habría sido posible. Gracias por ver en mí la capacidad de superar este periodo con éxito, por abrirme las puertas de vuestro laboratorio y hacerme sentir como en casa. Carmen, gracias por todo el apoyo prestado a lo largo de estos años y por la comprensión en la recta final. Y a Noemí, gracias de corazón por preocuparte de que este proyecto saliera adelante y por todo tu esfuerzo.

Quiero agradecer de manera especial a María Teresa Berciano y Miguel Lafarga, los padrinos de este trabajo, haberme prestado su ayuda incondicional porque ha sido imprescindible en este trabajo. Maite, gracias por ser ejemplo de constancia y dedicación y por todas las horas y risas que hemos compartido y que me guardo con mucho cariño. Miguel, gracias por mostrarme tu pasión por la ciencia, por el aprendizaje y las sesiones de microscopio electrónico que pensé que jamás entendería. A Olga Tapia, por buscar siempre un remedio cuando algo no salía bien y por todos los ratos divertidos que hemos compartido en el laboratorio. A Oriol, por ser mi primer maestro, por enseñarme a sobrevivir en el labo y por los kilómetros de carrera por el pasillo.

A las evaluadoras de este trabajo, Fuen y Mónica, por las indispensables observaciones y sugerencias para mejorar.

No me olvido de mis compañeras del laboratorio. A Eva, la mamá del grupo, por saber siempre qué decir. Gracias por las tertulias, las lágrimas de risa y, sobre todo, por cariotipar a los ratones. A Susana, por acompañarme en los primeros pasos con los ratones y compartir conmigo los inicios en el laboratorio. A Vero, la jefa y pitonisa del grupo de sabias, gracias por estar siempre dispuesta a ayudar, por los mil favores, las reuniones secretas super divertidas y por ser mi amiga.

También quiero agradecer a Maruja Hurlé y su equipo por toda la ayuda recibida en esta etapa. A Raquel y Nieves por sus consejos y los buenos momentos compartidos. A Andrea, porque ha llegado tarde, pero ha vivido el final de tesis en primera fila. A AnaB, por ser compañera de batallas dentro y fuera del laboratorio. Y a María, mi otro gran descubrimiento, por ser tan diferente y cómplice a la vez, por entender y acertar y por ser un apoyo fundamental durante estos años.

Gracias al Departamento de Anatomía y Biología Celular por recibirme siempre con una sonrisa. A Juanan, por prestarme su apoyo y los recursos para la realización de este trabajo. A Sonia por ayudarme con esos cerebros imposibles mientras nos poníamos un poco al día. A Nacho por estar siempre dispuesto a ayudarme a hacer una buena qPCR. A Raquel por su ayuda con la microscopía electrónica. A Cris Sánchez (*Cris Hurlé 1*) por los encuentros de última hora

y sus protocolos impecables. A Cris Duarte (*Cris Hurlé 2*) por las visitas inesperadas y ofrecer siempre su ayuda.

A Luis Alberto, por su apoyo en las gestiones y sus enseñanzas sobre el cuidado de las plantas. A Paula, por su simpatía y los encuentros en el pasillo que se convertían en tertulias.

Quiero agradecer al grupo de investigación de Don Cleveland por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y disfrutar de una estancia predoctoral inolvidable. Gracias a todas las personas que me ayudaron con mi proyecto y que compartieron conmigo aventuras californianas: Axel, Carlos, Roy, Julia, Shan, DH, Jone, Michael, Zevik... Y, especialmente, a Sonia por ser la mejor jefa de estancia y anfitriona. Gracias por tu generosidad.

Gracias también a todos los que están fuera del laboratorio, pero que han sido fundamentales en estos años. Me siento tremendamente afortunada del equipo que tengo esperándome a la salida del laboratorio y, aunque de otra manera, han tenido un papel fundamental en esta Tesis.

A mi familia por estar siempre ahí y por regalarme unas palabras de ánimo. A mi prima Elsa, por ser especial para mí, por la conexión y los vídeos que me alegran los días.

A mi grupo de amigos de Cuquinas y Cuquines por ser un apoyo siempre, por intentar entenderme y estar siempre dispuestos a "matar a las ratas" si había algún planazo en peligro. Por ser la mejor piña del mundo. Ya lo sabéis, pero estoy muy orgullosa de esta pequeña familia que hemos formado.

A Rafa por llegar a mi vida justo a tiempo. Gracias por haber hecho el último año más fácil y bonito. Gracias por la infinita comprensión, por darme la calma en los momentos de tormenta y el empujoncito cuando faltaban las fuerzas. Por ver en mí una guerrera y darme confianza. Por darme el mejor final. Por el regalo.

Y, por último, a mis padres, la parte más difícil, porque no podré nunca agradecerlos todo lo que hacéis por mí. Gracias por creer en mí y ofrecerme vuestra ayuda para llegar hasta aquí. Por preocuparos y cuidarme. Por devolverme a casa cuando lo necesito y darme refugio. Por acompañarme con una sonrisa pase lo que pase. Por los momentos y las risas en familia. Gracias por quererme tanto porque yo también os quiero mucho. Mamá, papá, gracias por ser el ejemplo de lo que ahora quiero ser.

Gracias a estos años que me he hecho ser más fuerte y valiente. Por todas las experiencias que me han enseñado a ser mejor profesional y persona. Gracias por regalarme personas maravillosas que recordaré para siempre.

## Índice

---



<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>1. RESUMEN / SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. El síndrome de Down</b> .....	<b>11</b>
2.1.1. Origen de la trisomía 21 .....	11
2.1.2. El cromosoma humano 21 .....	11
2.1.3. Características fenotípicas del SD .....	13
2.1.3.1. Discapacidad cognitiva en el SD.....	13
2.1.4.1. Alteraciones en el hipocampo de individuos SD .....	14
2.1.4. Alteraciones del neurodesarrollo en el SD.....	16
2.1.5. Procesos neuropatológicos implicados en el envejecimiento acelerado y en desarrollo de neuropatología tipo EA en el cerebro con SD .....	18
2.1.5.1. Incremento del estrés oxidativo cerebral .....	19
<b>2.2. Modelos murinos para el estudio del síndrome de Down</b> .....	<b>22</b>
2.2.1. El modelo murino Ts65Dn (TS).....	23
2.2.4.1. Alteraciones cognitivo-conductuales del ratón TS .....	24
2.2.4.2. Alteraciones neurobiológicas del ratón Ts65Dn.....	25
2.2.4.3. Neurodegeneración en el ratón TS .....	26
<b>2.3. Componentes celulares afectados por el exceso de dosis génica o por el estrés oxidativo en las CG del hipocampo del ratón TS</b> .....	<b>28</b>
2.3.1 Biología del núcleo celular en el SD .....	29
3.3.1.1. Territorio cromosómico .....	30
2.3.1.2. Territorio intercromosómico.....	32
2.3.1.2.1. El nucleolo y la síntesis de ribosomas .....	32
2.3.1.2.2. El cuerpo nuclear de Cajal .....	34
2.3.2. Alteraciones celulares asociadas al exceso de estrés oxidativo en el SD .....	35
2.3.2.1. Disfunción mitocondrial en el SD .....	36
2.3.2.2. Daño en el DNA y mecanismos de reparación en el SD .....	37
2.3.2.3. Alteraciones en la proteostasis celular en el SD.....	38
2.3.2.3.1. El sistema ubiquitín-proteasoma (UPS) .....	39
2.3.2.3.2. El sistema autofágico-lisosomal .....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>

<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1. Animales de experimentación</b> .....	<b>51</b>
4.1.1. Obtención del modelo animal.....	51
4.1.2. Cariotipado de los animales.....	51
4.1.3. Obtención y procesamiento del tejido biológico.....	53
<b>4.2. Técnicas de Biología Celular</b> .....	<b>53</b>
4.2.1. Perfusión de los animales.....	53
4.2.2. Obtención de disociados neuronales.....	54
4.2.3. Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	55
4.2.3.1. Análisis de imágenes de Inmunofluorescencia.....	56
4.2.4. Ensayo de actividad transcripcional con 5'-fluorouridina.....	57
4.2.5. Tinción de plata para la detección de Ag-NORs.....	58
4.2.6. Detección de lípidos.....	58
<b>4.3. Técnicas de Microscopía Electrónica</b> .....	<b>59</b>
4.3.1. Inclusión en Araldita.....	59
4.3.2. Inmunocitoquímica ultraestructural.....	60
<b>4.4. Técnicas de Biología Molecular</b> .....	<b>62</b>
4.4.1. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	62
4.4.1.1. Extracción del RNA total.....	62
4.4.1.2. Retrotranscripción.....	62
4.4.1.3. Diseño de oligonucleótidos.....	63
4.4.1.4. PCR cuantitativa a tiempo real.....	64
4.4.1.5. Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa.....	64
4.4.2. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot (WB).....	65
4.4.2.1. Preparación de los lisados hipocampales.....	65
4.4.2.2. Electroforesis de proteínas.....	66
4.4.2.3. Electrotransferencia de proteínas.....	66
4.4.2.4. Inmunoblotting.....	67
4.4.3. Ensayo de actividad quimotripsina del proteasoma.....	68
<b>4.5. Análisis estadístico de los resultados</b> .....	<b>68</b>

<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>69</b>
<b>5.1. Alteraciones nucleares en las células granulares del hipocampo del ratón Ts65Dn debidas al exceso de dosis génica</b> .....	<b>71</b>
5.1.1. Reducción del tamaño nuclear e incremento de heterocromatinización en las células granulares del hipocampo del ratón TS .....	71
5.1.2. La alteración en el patrón de cromatina de las CG del ratón TS induce un descenso en la transcripción global.....	74
5.1.3 La reorganización cromosómica en el ratón TS se asocia con una reducción en el patrón de fusión nucleolar .....	77
5.1.4 La reorganización nuclear presente en las CG del ratón TS produce una reducción del número de cuerpos nucleares de Cajal y la redistribución de la coilina .....	81
<b>5.2. Alteraciones celulares asociadas al exceso de estrés oxidativo en las CG del hipocampo del ratón Ts65Dn</b> .....	<b>84</b>
5.2.1. El incremento de estrés oxidativo en el hipocampo del ratón TS se asocia con una respuesta antioxidante alterada, altos niveles de peroxidación lipídica y alteraciones mitocondriales en las CG .....	84
5.2.2. El estrés oxidativo presente en las CG del hipocampo del ratón TS induce daño en el DNA .....	88
5.2.3. El estrés oxidativo se asocia con alteraciones en la proteostasis en las CG del ratón TS .....	91
5.2.3.1. Disfunción <i>del proteasoma</i> .....	91
5.2.3.2. Disfunción del sistema lisosomal .....	94
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>99</b>
<b>6.1. Alteraciones en la arquitectura nuclear de las CG del ratón TS causadas por el exceso de dosis génica</b> .....	<b>102</b>
6.1.1. Reducción del tamaño nuclear e incremento de la heterocromatinización en las CG del ratón TS .....	103
6.1.2. Descenso de la transcripción global en las CG del hipocampo del ratón TS .....	103
6.1.3. Alteraciones en el número de nucleolos y en el patrón de fusión nucleolar en las CG del ratón TS .....	105
6.1.4. Alteraciones en el número de cuerpos nucleares de Cajal y redistribución de la coilina en las CG del ratón TS.....	107

<b>6.2. Alteraciones celulares asociadas al incremento de estrés oxidativo en las CG hipocampales del ratón TS.....</b>	<b>108</b>
6.2.1. El incremento de estrés oxidativo en el hipocampo del ratón TS se asocia con una respuesta antioxidante alterada, altos niveles de peroxidación lipídica y alteraciones mitocondriales en las CG .....	109
6.2.2. El estrés oxidativo presente en las CG del hipocampo del ratón TS induce daño en el DNA .....	111
6.2.3. El estrés oxidativo presente en las CG del ratón TS se asocia con alteraciones en los sistemas de degradación intracelular: disfunción del proteasoma.....	114
6.2.4. El estrés oxidativo presente en las CG del ratón TS se asocia con alteraciones en los sistemas de degradación intracelular: disfunción del sistema lisosomal .....	116
<b>7. CONCLUSIONS .....</b>	<b>119</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>123</b>
<b>9. ARTÍCULOS.....</b>	<b>163</b>

## **Abreviaturas**

---







**5'-FU:** 5'-fluorouridina

**APP:** Proteína precursora amiloide

**ATP:** Adenosín trifosfato

**CA:** Cuerno de Amón

**CAT:** catalasa

**CB:** Cuerpo nuclear de Cajal (*Cajal Body*)

**CG:** Células granulares

**DDR:** Respuesta al daño en el DNA (*DNA damage response*)

**DSB:** Roturas en el DNA de doble cadena (*Double-strand breaks*)

**DSCR:** Region crítica del síndrome de Down (*Down Syndrome Critical Region*)

**EA:** Enfermedad de Alzheimer

**GPx:** Glutation peroxidasa

**HSA21:** Cromosoma 21 humano

**IP:** Ioduro de propidio

**iPSC:** células madre pluripotentes inducción

**Mmu16:** Cromosoma 16 murino

**mRNA:** RNA mensajero

**mtDNA:** DNA mitocondrial

**NOR:** Regiones organizadoras de antígenos

**PFA:** Paraformaldehído

**RE:** Retículo endoplásmico

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**rRNA:** RNA ribosomal

**SD:** Síndrome de Down

**SMN:** *Survival of motor neuron protein*

**SNC:** Sistema nervioso central

**snoRNP:** Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (*small nucleolar ribonucleoproteins*)

**snRNP:** Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (*small nuclear ribonucleoproteins*)

**SOD1:** Superóxido dismutasa 1

**TS:** Ts65Dn

**UPS:** Sistema ubiquitín-proteasoma

**WB:** *Western blot*

## **1. Resumen / Summary**

---



El síndrome de Down (SD) es la causa genética más común de discapacidad intelectual y se produce por la triplicación total o parcial del cromosoma humano 21 (HSA21). Con el fin de estudiar las bases celulares y moleculares de los déficits cognitivos del SD, en este trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado el modelo murino Ts65Dn (TS), que contiene una triplicación parcial del cromosoma murino 16 (Mmu16) y reproduce numerosos fenotipos similares a los encontrados en el SD, como las alteraciones en la memoria y el aprendizaje dependiente de hipocampo. En el SD y en el ratón TS, las células granulares (CG) del hipocampo, que tienen un papel fundamental en la formación de nuevas memorias, muestran diversas anomalías morfológicas, electrofisiológicas y funcionales. En esta Tesis Doctoral se han evaluado diversas alteraciones celulares producidas por un exceso de dosis génica o asociadas al incremento de estrés oxidativo en esta población neuronal del ratón TS. En el primer estudio se evaluó el efecto del exceso de dosis génica sobre la arquitectura nuclear de las CG del ratón TS. Nuestros resultados muestran que las CG del ratón TS presentan una reducción en el tamaño del núcleo celular, alteraciones en el perfil epigenético, un incremento de heterocromatinización y una disminución en la actividad transcripcional global. Además, las CG del ratón TS presentaban alteraciones en el patrón de fusión nucleolar y en el ensamblaje de los cuerpos nucleares de Cajal. En el segundo estudio se analizaron alteraciones asociadas al exceso de estrés oxidativo en distintos componentes celulares de las CG del ratón TS. Los resultados demostraron que el aumento de estrés oxidativo en el hipocampo de estos animales está asociado a alteraciones en componentes del sistema antioxidante, un aumento de la peroxidación lipídica y alteraciones en la estructura mitocondrial de las CG. Además, las CG del ratón TS también mostraron un aumento del daño en el DNA y alteraciones en los sistemas de degradación intracelular como el proteasoma y el sistema lisosomal, asociadas al estrés oxidativo. En conjunto, las alteraciones celulares encontradas en este trabajo pueden contribuir a las anomalías neuromorfológicas y funcionales de esta población neuronal en edades tempranas y, en edades más tardías, favorecer el envejecimiento acelerado, la neuropatología de tipo Alzheimer y la neurodegeneración implicadas en la disfunción cognitiva característica del ratón TS y los individuos SD.

## *Summary*

Down syndrome (DS) or trisomy of chromosome 21 (HSA21) is the most frequent genetic cause of intellectual disability. To study the mechanisms involved in neurobiological and cognitive alterations of DS, in this Doctoral Thesis, we used the Ts65Dn (TS) mouse model, which carries a triplication of a fragment of the murine chromosome 16 (Mmu16) and reproduces several DS phenotypes including deficits in hippocampal-dependent learning and memory. In DS and TS mice, hippocampal granule cells (GCs), which are essential for memory formation, show several morphological, electrophysiological, and functional alterations. In this Doctoral Thesis, cellular alterations produced by an excess of gene dose or associated with an increase in oxidative stress have been evaluated in this neuronal population of the TS mouse. In the first study, the effect of the extra copy of the Mmu16 fragment on the nuclear architecture of the hippocampal CGs of the TS mouse was evaluated. The results of this study show that the TS CGs present a reduction in the size of the cell nucleus, alterations in the epigenetic profile, an increase in heterochromatinization, and a decrease in global transcriptional activity. In addition, TS GCs presented alterations in the nucleolar fusion pattern and the assembly of the nuclear Cajal bodies. In the second study, oxidative stress-associated alterations in different cellular components of the CGs of the TS mouse were analyzed. The results demonstrated that the increase in oxidative stress in the hippocampus of TS mice is associated with alterations in different components of the antioxidant system, increased lipid peroxidation, and structural mitochondrial anomalies in the CGs. In addition, the GCs of TS mice also showed an increase in DNA damage and alterations of the intracellular degradative systems such as the proteasome and the lysosomal system, associated with oxidative stress. Collectively the cellular alterations found in this work may contribute to the neuromorphological and functional abnormalities of this neuronal population at early ages and, at later stages of the lifespan, they can also accelerate aging, neurodegeneration, and the development of Alzheimer's disease neuropathology implicated in the cognitive dysfunction of TS mice and DS individuals.

## **2. Introducción**

---



## 2.1. El síndrome de Down

El síndrome de Down (SD) es una aneuploidía autosómica causada por una triplicación total o parcial del cromosoma humano 21 (*Homo Sapiens Autosome 21*, HSA21). Es la aneuploidía humana más frecuente compatible con la vida, presentando una prevalencia de 1 de cada 1.000 nacimientos en Europa (European Commission Website, 2022) y la mayor causa de discapacidad intelectual congénita.

### 2.1.1. Origen de la trisomía 21

El origen de la trisomía del HSA21 puede deberse a 3 causas: la no disyunción meiótica, la translocación y la no disyunción mitótica. i) La no disyunción meiótica es la más común ocurriendo en, aproximadamente, un 95 % de los casos. Se debe a una división cromosómica aberrante durante la formación de los gametos, frecuentemente femeninos, en la que un par del cromosoma 21 no puede separarse correctamente dando lugar a un óvulo con una trisomía completa del HSA21, que originará un organismo con 47 cromosomas en todas las células (Hassold y Sherman, 2000). ii) La translocación es la segunda causa de SD (4 % de los casos) y se debe a un cambio robertsoniano en el que un HSA21 completo o un fragmento de éste, se une a otro cromosoma acrocéntrico, generalmente el 14, generando un individuo con 46 cromosomas en todas sus células en la que hay una triplicación total o parcial del HSA21 (Ranweiler, 2009). iii) La causa menos frecuente de SD es la no disyunción mitótica o mosaicismo (1 %) en la que en las primeras divisiones embrionarias y, a pesar de que el cigoto fuera fecundado por dos gametos haploides, se produce una no disyunción del HSA21. A partir de este momento, el individuo contará con algunos tipos celulares con 46 cromosomas y otros con 47, conteniendo una triplicación del HSA21 (Papavassiliou et al., 2015).

### 2.1.2. El cromosoma humano 21

El HSA21 es el cromosoma autosómico humano más pequeño y representa entre el 1 y el 1.5 % de nuestro genoma. Se estima que el HSA21 está compuesto por 48.13 Mb y contiene 696 genes de los cuales 235 codifican para proteínas, 325 son genes no codificantes y 153 pseudogenes (Dierssen, 2012; Letourneau y Antonarakis, 2012; Antonarakis et al., 2020).

Las personas con SD presentan una gran variabilidad de fenotipos debido a la desregulación génica que induce la triplicación, total o parcial, del HSA21. Sin embargo, no se dispone de mucha información sobre los mecanismos moleculares causantes de estas alteraciones. Actualmente, se barajan tres hipótesis que tratan de explicar cómo el exceso de dosis génica presente en el SD produce las manifestaciones clínicas típicas en estas personas.

- I. La hipótesis de la **amplificación de la inestabilidad en el desarrollo** propone que la sobreexpresión de los genes del HSA21 produce una alteración de la homeostasis en el desarrollo e inestabilidad genética, independientemente de la identidad de los genes triplicados. Es decir, el aumento en la actividad de los genes produce efectos inespecíficos que serán mayores cuantos más genes se encuentren en el segmento triplicado (Roizen y Patterson, 2003; Shapiro, 2001; Antonarakis et al., 2020).
- II. La **hipótesis de la dosis génica** postula que la triplicación del HSA21 produce características fenotípicas específicas en función de los genes concretos que se encuentren triplicados. En esta hipótesis se incluye el efecto de la triplicación de secuencias codificantes y no codificantes (microRNAs, secuencias reguladoras, etc.), así como de la interacción de estos genes con otros genes situados en otros cromosomas (Aït Yahya-Graison et al., 2007; Lyle et al., 2009; Antonarakis et al., 2020).
- III. La **hipótesis de la “inestabilidad genómica”** propone que los dos mecanismos citados anteriormente contribuyen a los fenotipos encontrados en el SD (Dierssen, 2012; Tosh et al., 2022). Esta hipótesis postula que las manifestaciones encontradas en el SD son debidas tanto al desequilibrio de genes del HSA21 y de otros genes que se encuentran en otros cromosomas, como a cambios epigenéticos y en la transcriptómica global (Dierssen, 2012; Tosh et al., 2022).

Sobre esta base, es de gran interés identificar los segmentos específicos del HSA21 que cuando se triplican, causan las diferentes manifestaciones clínicas. Para ello, se han realizado estudios comparativos de tejidos trisómicos y euploides mediante diferentes técnicas de caracterización citogenética y molecular, tanto en individuos con trisomías parciales como en modelos animales con trisomías parciales de diferentes regiones ortólogas al HSA21. En base a estos estudios se ha propuesto la existencia de una región genética mínima denominada Región Crítica en el Síndrome de Down (*DSCR, Down Syndrome Critical Region*) necesaria para la manifestación de los rasgos clínicos del SD (Rahmani et al., 1989). Sin embargo, existe un debate acerca de tal afirmación ya que se han descrito casos de personas con trisomías parciales del HSA21 que no incluyen la DSCR, pero que muestran algunos rasgos fenotípicos característicos del síndrome (Lana-Elola et al., 2011; Yamamoto et al., 2011). Por lo tanto, si bien es cierto que los genes codificados en la DSCR no son los únicos responsables de las alteraciones del SD, sí son considerados genes que pueden tener un papel esencial en las alteraciones del sistema nervioso central (SNC) de las personas con SD (Jiang et al., 2015; Olson et al., 2007; Pelleri et al., 2019).

### 2.1.3. Características fenotípicas del SD

Las manifestaciones fenotípicas de las personas con SD son muy complejas. Sin embargo, existen algunas características comunes a todos los individuos con SD que incluyen la discapacidad intelectual, la dismorfología facial y las alteraciones en el sistema motor (Roper y Reeves, 2006; Antonarakis et al., 2020; Klein y Haydar, 2022). Además, con el aumento de la esperanza de vida, se han descrito comorbilidades en el 100 % de los individuos con SD tales como el envejecimiento acelerado del cerebro y el desarrollo de una neuropatología idéntica a la encontrada en la enfermedad de Alzheimer (EA) (Fortea et al., 2020; Franceschi et al., 2019)

Adicionalmente, hay otras alteraciones clínicas que son más prevalentes en las personas SD que en la población general como anomalías congénitas cardiovasculares (hipertensión arterial, defectos auriculoventriculares), disfunción tiroidea (hipotiroidismo y enfermedad de Hashimoto), alteraciones morfológicas pulmonares y en las vías respiratorias que causan mayor predisposición a padecer infecciones respiratorias, trastornos hematológicos y oncológicos (alteraciones en la producción de la serie mieloide, déficits de hierro, leucemia), problemas auditivos y visuales y alteraciones del sueño (Baraona et al., 2013; Bull, 2020; Gamis y Smith, 2012).

#### 2.1.3.1. Discapacidad cognitiva en el SD

La discapacidad intelectual es la característica fenotípica más importante y común en la vida de una persona con este síndrome. Desde etapas tempranas del desarrollo, los individuos con SD presentan alteraciones en la memoria y el aprendizaje, en el lenguaje, problemas de atención y defectos cognitivos en el procesamiento auditivo y verbal (Jafri y Harman, 2020; Loveall y Barton-Hulsey, 2021).

Si bien es cierto que las capacidades cognitivas de cada individuo muestran una gran variabilidad, todos ellos presentan una discapacidad intelectual de grado ligero a moderado. El cociente intelectual en niños con SD varía entre 30 y 70 puntos, disminuyendo progresivamente a 45-75 en la adolescencia y alcanzando el rango de 30-45 en la etapa adulta (Contestabile et al., 2010; Goud et al., 2021).

Entre las funciones cognitivas más afectadas en las personas con SD se encuentra la **memoria explícita o declarativa** que es dependiente del hipocampo. Esto se debe a que los individuos con SD presentan una pobre codificación de información adquirida, estrategias de recuperación de información deterioradas, así como déficit de atención (Bartesaghi et al., 2011; Dierssen, 2012; Antonarakis et al., 2020). Sin embargo, la **memoria implícita o procedimental**,

que depende fundamentalmente del cerebelo, está más conservada en las personas con SD (Bussy et al., 2011; Vicari et al., 2000).

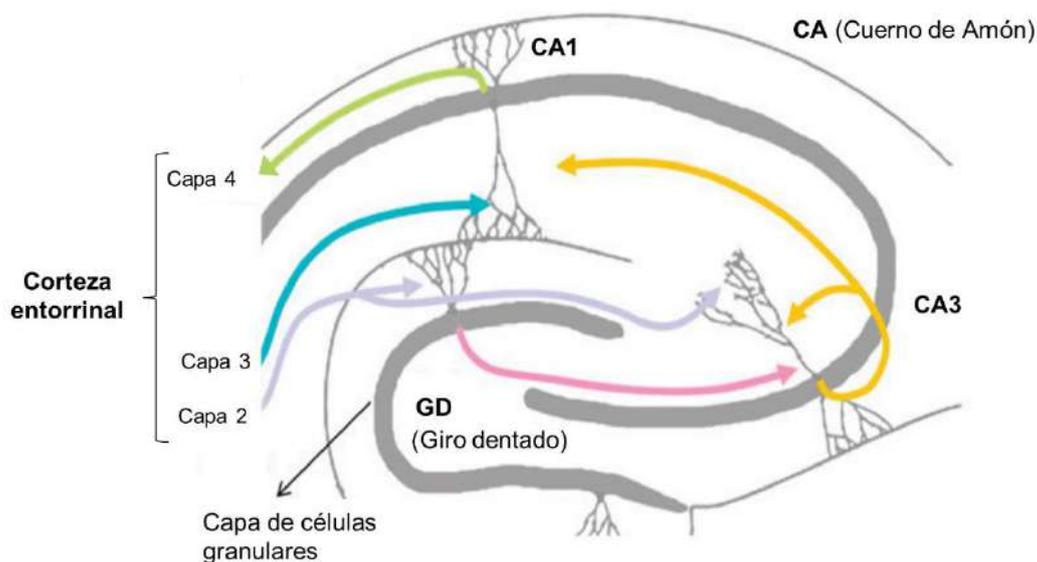
Las personas con SD también muestran alteraciones en diversas **funciones ejecutivas** como la memoria de trabajo, la flexibilidad cognitiva, la resolución de problemas, el control inhibitorio y la planificación de tareas (Edvardson et al., 2014; Campbell et al., 2013) que permiten controlar y autorregular la actividad cognitiva, conductual y emocional. En los individuos con SD la memoria visuo-espacial se encuentra relativamente preservada, sin embargo, existe un deterioro significativo de la memoria verbal a corto plazo (Lanfranchi et al., 2014; Nash y Heath, 2011; Yang et al., 2014). Estos déficits en la memoria a corto plazo dificultan la realización de tareas cognitivas como el desarrollo del lenguaje y el vocabulario o la resolución de problemas. Adicionalmente, también es frecuente que las personas con SD presenten alteraciones conductuales como dificultades para mantener la atención sostenida, impulsividad, agitación, hiperactividad o movimientos repetitivos (del Hoyo Soriano et al., 2020; Edvardson et al., 2014). Desde la adolescencia, todas las personas con SD sufren un deterioro progresivo de sus capacidades cognitivas. Este fenómeno denominado “regresión cognitiva” se caracteriza por una pérdida paulatina de sus capacidades cognitivas (como la memoria y el lenguaje) y, por tanto, de las habilidades para poder desarrollar tareas cotidianas (Hithersay et al., 2017).

#### **2.1.4.1. Alteraciones en el hipocampo de individuos SD**

Los déficits cognitivos característicos del SD se encuentran estrechamente relacionadas con anomalías estructurales y fisiológicas del SNC. Estudios *post mortem* y de neuroimagen han demostrado que el volumen cerebral de las personas con SD se encuentra disminuido hasta en un 20 % respecto a los individuos control (McCann et al., 2021). Sin embargo, esta reducción no ocurre de manera proporcional en todas las áreas cerebrales, estando particularmente afectadas las regiones frontal y temporal y también el cerebelo (Koenig et al., 2021; Lott y Dierssen, 2010)

En el lóbulo temporal, una estructura que se encuentra especialmente afectada en el SD es el **hipocampo**. Esta región cumple un papel fundamental en los déficits cognitivos presentes en el SD ya que está implicada en la formación, almacenamiento y recuperación de la memoria declarativa o explícita. Esta estructura tiene un papel crucial en la memoria declarativa espacial, implicada en el procesamiento y recuperación de información relacionada con localizaciones espaciales o rutas (Buzsáki y Moser, 2013). Adicionalmente, el hipocampo es fundamental para establecer una organización sistemática de los recuerdos, ya que interviene en la codificación de la información secuencial y contextual de eventos (Ofen et al., 2007).

El hipocampo está compuesto por diferentes regiones: la corteza entorrinal, el subículo, el giro dentado y el cuerno de Amón (CA) que, a su vez, se divide en las áreas CA1, CA2 y CA3. En el hipocampo se encuentran principalmente dos tipos de poblaciones celulares. Mientras que el CA y el subículo contienen neuronas piramidales, el giro dentado se compone mayoritariamente por células granulares (CG). Morfológicamente, estas dos poblaciones neuronales tienen características específicas que las hacen ser fácilmente distinguibles entre sí. Las células piramidales reciben este nombre debido a la morfología de su soma, son células grandes y con axones largos que se proyectan hacia otras áreas cerebrales. Sin embargo, las CG son más pequeñas, de morfología redondeada u ovalada y con axones más cortos, denominados fibras musgosas (Frotscher et al., 1991).



**Figura 1. Esquema representativo del circuito trisináptico del hipocampo.** La vía excitatoria trisináptica comienza en la capa 2 de la corteza entorrinal hacia las células granulares del giro dentado (flecha morada). El giro dentado proyecta sus axones hacia el área CA3 (flecha rosa). Las neuronas piramidales del CA3 envían sus axones al área CA1 (flecha amarilla). Finalmente, las neuronas piramidales del área CA1 envían sus proyecciones hacia la CE (flecha verde). La región CA1 también recibe proyecciones directas de la capa 3 de la CA (flecha azul). Figura modificada de Camacho Ugarte et al., (2020).

Para que se formen nuevas memorias de tipo declarativo, se necesita que toda la información sensorial de distintas modalidades sea procesada y transformada en el **círculo trisináptico** del hipocampo (Figura 1). La mayoría de la información que recibe esta estructura proviene de las áreas cerebrales implicadas en el procesamiento y codificación de los estímulos sensitivos, que posteriormente llegan a la corteza entorrinal. Desde ahí, estas neuronas envían sus axones, que constituyen la vía perforante, hacia las CG del giro dentado. A continuación, estas células proyectan sus axones, formando la vía de las fibras musgosas, hacia las neuronas

piramidales del área CA3 que, finalmente, mediante los colaterales del Schaffer llegarán hasta las neuronas de la región CA1. En su recorrido por el circuito trisináptico, la información de tipo declarativo va siendo procesada y transformada para posteriormente almacenarse en diversas áreas de la corteza cerebral (Ribak y Shapiro, 2007; Stepan et al., 2015)

Dada la importancia del circuito trisináptico en el aprendizaje o memoria declarativa, las alteraciones en cualquiera de sus componentes celulares o de sus conexiones se relacionan con un deterioro de la capacidad para almacenar y recuperar la memoria declarativa, así como dificultades para recordar asociaciones contextuales (Clark et al., 2017; Godfrey y Lee, 2018).

Las personas con SD muestran anomalías estructurales y funcionales en el hipocampo desde etapas tempranas del neurodesarrollo. Numerosos trabajos demuestran que el hipocampo de individuos con SD presenta un volumen significativamente reducido debido a la hipocelularidad y a alteraciones en la neurogénesis (Carducci et al., 2013; Nicolas y Hassan, 2014; Stagni et al., 2018). Además, sus células muestran una disminución de sus árboles dendríticos, alteraciones en la conectividad y déficits en la mielinización de sus axones (Ábrahám et al., 2012; Xu et al., 2020). En etapas más avanzadas, el hipocampo de las personas con SD sufre un gran deterioro debido al desarrollo de diferentes procesos neuropatológicos como el estrés oxidativo, la neuroinflamación o el desarrollo de una neuropatología de tipo EA (Martínez-Cué y Rueda, 2020b). De esta manera, durante el envejecimiento de los individuos con SD se produce una disminución del volumen hipocampal causada por una pérdida neuronal (Beacher et al., 2009), así como por alteraciones en la conectividad sináptica (Belichenko et al., 2007). Además, dado que las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal son la principal fuente de inervación del hipocampo, su degeneración está asociada a un deterioro progresivo en la realización de tareas dependientes del hipocampo en las personas con SD (Martinez et al., 2021; Nardone et al., 2006).

Estas anomalías se presentan, de manera generalizada, en todos los tipos celulares que componen el circuito trisináptico. Sin embargo, las CG del giro dentado parecen estar particularmente afectadas (Contestabile et al., 2007; Klein y Haydar, 2022).

#### **2.1.4. Alteraciones del neurodesarrollo en el SD**

Los déficits cognitivos de las personas con SD están causados por anomalías morfológicas y neuroquímicas en el SNC presentes desde etapas tempranas del neurodesarrollo y que progresan gradualmente con el envejecimiento (Lott y Dierssen, 2010; Wilcock y Griffin, 2013; Antonarakis et al., 2020).

La reducción del tamaño cerebral en las personas con SD se debe a una **hipoplasia** generalizada. Esta disminución en el volumen y peso cerebral de las personas con SD es evidente desde etapas prenatales (Baburamani et al., 2019) y se acentúan durante la etapa adulta (Pujol et al., 2018).

La hipocelularidad cerebral está causada, en parte, por diversas **anomalías en la neurogénesis** presentes a lo largo de toda la vida del individuo (Stagni et al., 2018; Contestabile et al., 2007). En primer lugar, la proliferación celular se encuentra especialmente afectada en ciertas regiones cerebrales como el giro dentado del hipocampo, el ventrículo lateral y el cerebelo (Guidi et al., 2008). Tanto en etapas prenatales como postnatales, las alteraciones en la neurogénesis en el SD se deben a diferentes factores. El exceso de dosis génica debido a la triplicación del HSA21, podría causar una ralentización del ciclo celular y una disminución en el número de precursores neurales (Contestabile et al., 2009; Giffin-Rao et al., 2022; Rueda et al., 2012; Stagni et al., 2018). Por otro lado, otro factor que contribuye a la hipocelularidad en el SD son las alteraciones en diferenciación neuronal, ya que se ha demostrado una disminución del número de neuronas maduras en diferentes regiones el hipocampo de estos individuos (Guidi et al., 2008; Stagni et al., 2018).

Además de una disminución en el número de neuronas, los cerebros de personas con SD presentan **alteraciones en la sinaptogénesis y la conectividad**. Desde la infancia, las neuronas de las personas con SD muestran una menor densidad de espinas y una reducción en el tamaño del árbol dendrítico (Garner y Wetmore, 2012). A medida que el individuo envejece, estas alteraciones se hacen más prominentes produciéndose una disminución en el número de espinas, así como un acortamiento de estas (Ferrer y Gullotta, 1990; Antonarakis et al., 2020). La hipocelularidad y la hipotrofia dendrítica dan lugar a una red de conexiones neurales anómala, causando un procesamiento limitado de la información, disminución de la plasticidad sináptica y, por tanto, contribuyendo a los déficits cognitivos presentes en el SD (Lott y Dierssen, 2010; Newpher y Ehlers, 2009).

Por otro lado, las personas con SD también muestran diversas **anomalías neuroquímicas** debidas a alteraciones en los neurotransmisores o en sus respectivos receptores. Los sistemas de neurotransmisión más afectados son: i) el sistema GABAérgico, debido a bajos niveles de ácido  $\gamma$ -aminobutírico y anomalías en sus receptores (Martínez-Cué et al., 2014; Rissman y Mobley, 2011), ii) el sistema serotoninérgico, que muestra niveles bajos de serotonina (5-HT), así como una disminución en el número de receptores (Whittle et al., 2007), iii) el sistema

noradrenérgico, que en la edad adulta presenta una disminución en los niveles de noradrenalina, así como alteraciones en la función de sus receptores y sus vías de señalización (Phillips et al., 2016).

### **2.1.5. Procesos neuropatológicos implicados en el envejecimiento acelerado y en desarrollo de neuropatología tipo EA en el cerebro con SD**

A lo largo de la vida de los individuos con SD se desarrollan varios procesos neuropatológicos que contribuyen al envejecimiento acelerado del cerebro y favorecen el deterioro cognitivo y el desarrollo de neuropatología idéntica a la encontrada en la EA (Lott y Head, 2019). Aunque la teoría clásica del origen de la EA proponía que la demencia era debida a la pérdida de neuronas producida por la acumulación de placas de péptidos  $\beta$ -amiloides y ovillos neurofibrilares, cada vez hay más evidencia de que algunas alteraciones que aparecen años antes que las placas y los ovillos podrían jugar un importante papel en la neuropatología característica de la EA en personas con y sin SD (Martínez-Cué y Rueda 2020b). Estas alteraciones incluyen la pérdida de neuronas y sinapsis, la neuroinflamación, el daño en el DNA que produce senescencia celular, la alteración de la proteostasis y del metabolismo energético y el estrés oxidativo (Chang y Min., 2005; Coskun et al., 2010; Butterfield et al., 2014; Pesini et al., 2019; Martínez-Cué y Rueda, 2020a, 2020b). Numerosos estudios han demostrado el papel que estas alteraciones tempranas tienen en el cerebro con SD y EA en la acumulación de péptidos A $\beta$ , la hiperfosforilación de tau, la muerte neuronal, sobre todo de neuronas colinérgicas) y el declive cognitivo (Wilcock, 2012; Sipos et al., 2007; Eikeleboom et al., 2006; Hardy, 2006; Weldon et al., 1998; Chong, 1997; Gitter et al., 1995; Hardy y Higgins 1992; Davidson et al., 2018; Sanchez et al., 2011; Rafii, 2019; Martinez et al., 2021).

Algunos de estos mecanismos neuropatológicos están presentes desde etapas tempranas del neurodesarrollo de las personas con SD como el incremento del estrés oxidativo. Todos ellos se encuentran estrechamente relacionados entre sí, generándose un ciclo de retroalimentación positiva, en el que la aparición de uno de ellos favorece el desarrollo o agravamiento de otro (Figura 2).

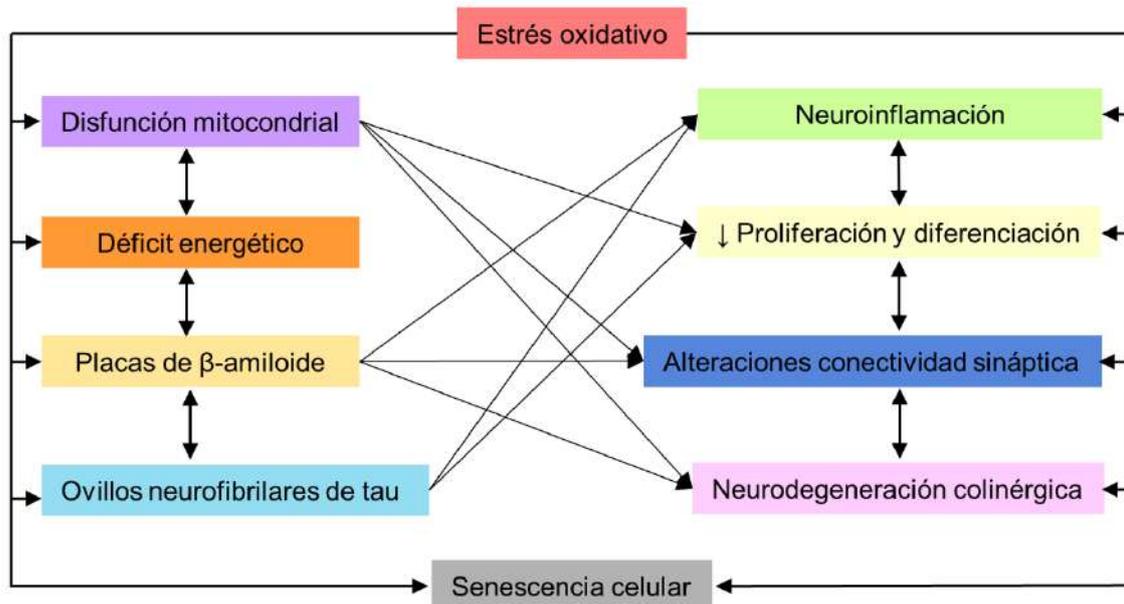


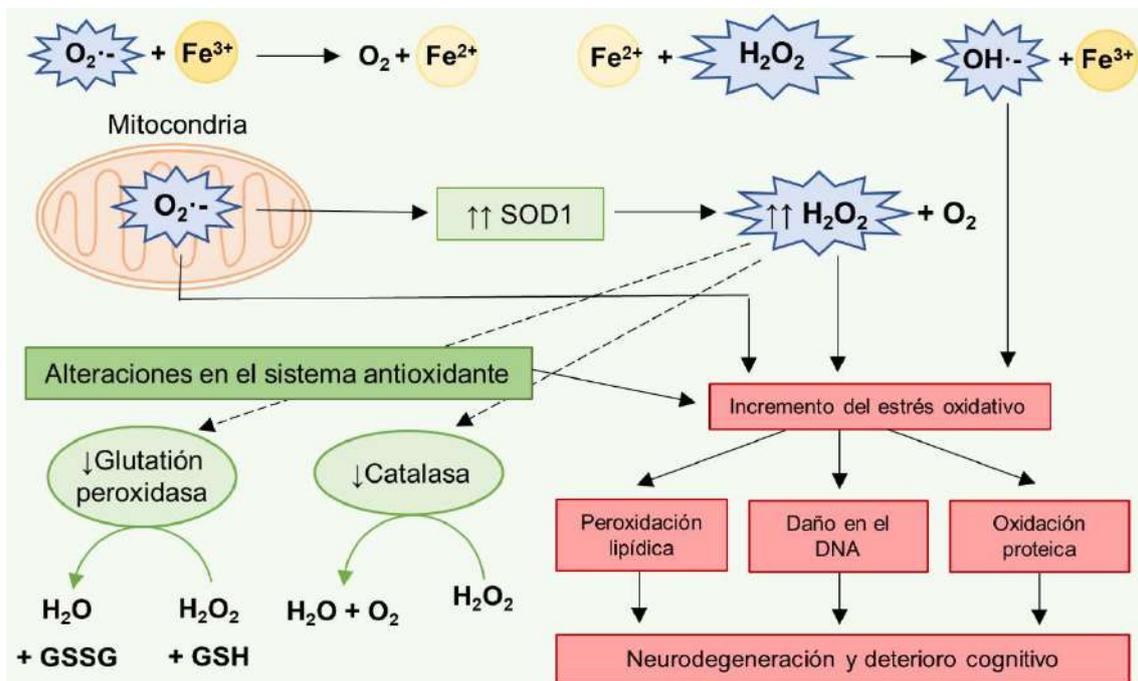
Figura 2. Esquema de los procesos neuropatológicos que contribuyen al envejecimiento acelerado del cerebro y el deterioro cognitivo de las personas con SD. Las flechas marcan relaciones de retroalimentación positiva entre cada uno de ellos. Figura modificada de Martínez-Cué y Rueda, (2020b).

#### 2.1.5.1. Incremento del estrés oxidativo cerebral

Uno de los mecanismos neuropatológicos que tienen un papel más importante en la aparición de las alteraciones cognitivas y la disfunción neuronal de las personas con SD es el incremento del estrés oxidativo cerebral, que aparece desde etapas tempranas del neurodesarrollo y se agrava progresivamente con la edad. El cerebro es un órgano especialmente susceptible al incremento del estrés oxidativo debido a diversos factores: i) contiene altos niveles de ácidos grasos que pueden sufrir procesos de peroxidación, ii) presenta bajas concentraciones de enzimas antioxidantes y iii) se caracteriza por tener una alta tasa de metabolismo aeróbico (Di Carlo et al., 2012).

En el SD, como en otras enfermedades neurodegenerativas, el incremento de estrés oxidativo se produce por un desequilibrio redox causado por una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución de enzimas antioxidantes y otros agentes reductores (Di Domenico et al., 2018; Perluigi y Butterfield, 2012; Rueda y Martínez-Cué, 2020). El exceso de estrés oxidativo en el SD es debido, parcialmente, a la sobreexpresión de algunos genes que se encuentran en el HSA21 (Lott, 2012; Perluigi y Butterfield, 2012; Wiseman et al., 2015) y que están implicados directa o indirectamente con la producción de ROS. Uno de estos genes es *SOD1*, que codifica para la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1). En condiciones fisiológicas, esta enzima cataliza la conversión del radical superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de

hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que posteriormente será neutralizado por la catalasa (CAT) y la glutatión-peroxidasa (GPx) para mantener el equilibrio celular (Figura 3). Sin embargo, la sobreexpresión de SOD1 en el SD produce cantidades anormalmente elevadas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que no pueden ser compensadas por el resto de las enzimas antioxidantes. En el SD, se ha descrito un desequilibrio SOD1/GPx en todos los tejidos (de Haan et al., 1995; Rueda y Martínez-Cué, 2020). En consecuencia, se produce la acumulación de peróxido  $\text{H}_2\text{O}_2$  que da lugar a la formación del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), con un alto potencial oxidante para dañar las membranas mitocondriales y otras biomoléculas celulares.



**Figura 3. Alteraciones en el sistema redox en el SD que contribuyen al incremento de estrés oxidativo.** La fosforilación oxidativa mitocondrial es el principal productor de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  que ha de ser catalizado por la enzima SOD1. En el SD, la sobreexpresión de SOD1 da lugar a un incremento en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que dará lugar a la formación de otras ROS (azul). Además, en el SD la disminución en la expresión de otras enzimas antioxidantes, como la catalasa y la glutatión peroxidasa, dificulta la neutralización del exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El incremento en la producción de ROS y los déficits en el sistema antioxidante dan lugar al incremento de estrés oxidativo que dañará lípidos, DNA y proteínas contribuyendo a la neurodegeneración y el deterioro cognitivo característico del SD.

Además de la CAT y la GPx, otras enzimas antioxidantes como la glutatión transferasa y la tiorredoxina peroxidasa también se encuentran disminuidas en el SD (Di Domenico et al., 2018). En cerebros de fetos humanos con SD también se ha demostrado una disminución de la peroxirredoxina 2, una enzima antioxidante implicada en la protección de lípidos y proteínas frente al daño oxidativo (Sánchez-Font et al., 2003). Por último, además de SOD1, hay otros genes triplicados en el HSA21 que se relacionan con un incremento en el estrés oxidativo celular

tales como *APP*, *CBR* (que codifica para la enzima carbonil reductasa), *BACH1* y *S100β* (Esposito et al., 2008; Mazur-Kolecka et al., 2006; Perluigi et al., 2011; Rueda y Martínez-Cué, 2020).

La principal fuente de ROS es la vía de la fosforilación oxidativa mitocondrial, encargada de la síntesis de ATP. Además, la mitocondria es una de las principales dianas de ROS. Desde etapas tempranas del neurodesarrollo, las personas con SD presentan alteraciones morfológicas y estructurales en las mitocondrias que causan un incremento en la producción de ROS (Perluigi y Butterfield, 2012b; Piccoli et al., 2013; Bayona-Bafaluy et al., 2021) y alteraciones en el metabolismo energético dando lugar a un déficit en la producción de ATP celular (Valenti et al., 2010; 2018). Por lo tanto, la disfunción mitocondrial en el SD incrementa el estrés oxidativo, dañando numerosos componentes celulares que alteran la correcta función neuronal y por tanto contribuyen al deterioro cognitivo (Wiseman et al., 2015).

El exceso de estrés oxidativo daña biomoléculas esenciales como las proteínas, los lípidos o el DNA, causando alteraciones en la fisiología y la funcionalidad neuronal (Butterfield et al., 2014; Perluigi y Butterfield, 2012b). Diversos estudios han demostrado que las neuronas de individuos con SD presentan un incremento en diversos marcadores de peroxidación lipídica, daño en el DNA y oxidación de proteínas (Busciglio y Yankner, 1995; Nunomura et al., 2000; Odetti et al., 1998). Los lípidos son componentes fundamentales de las membranas celulares, por lo que su oxidación causa alteraciones estructurales y funcionales tanto en la membrana celular como en las membranas de los diferentes orgánulos (Gaschler y Stockwell, 2017; Martínez-Cué y Bartesaghi, 2022), especialmente de la mitocondria (Butterfield et al., 2014). El daño oxidativo sobre las proteínas causa alteraciones en su función, afectando a la actividad de receptores, hormonas y enzimas (Muchová et al., 2014), así como a los mecanismos de degradación proteica intracelular que incluyen el sistema ubiquitín-proteasoma (UPS), el endosomal y el autofágico-lisosomal (Lanzillotta y Di Domenico, 2021). Por lo tanto, la acumulación de proteínas oxidadas y disfuncionales contribuye al agravamiento del proceso neurodegenerativo que sufren las personas con SD (Di Domenico et al., 2013; Perluigi et al., 2014). Finalmente, se ha demostrado que el aumento de ROS en células de individuos con SD produce un incremento en los focos de daño en el DNA y defectos en los mecanismos de reparación de daño en el DNA (Morawiec et al., 2008; Necchi et al., 2015; Tiano et al., 2012).

Adicionalmente, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo inducen senescencia celular prematura (Martínez-Cué y Rueda, 2020a; Rodríguez-Sureda et al., 2015; Zhou et al., 2015). Los amniocitos y placentas de embarazadas con fetos SD muestran una mayor

prevalencia de células senescentes (Amiel et al., 2013). Además, en fibroblastos de fetos con SD se ha demostrado que el estrés oxidativo y la mayor producción de ROS, aumenta de los niveles de oxidación proteica, produce déficits en la producción energética, e induce la senescencia celular (Rodríguez-Sureda et al., 2015). Los fibroblastos de niños con SD muestran una mayor ratio en la actividad SOD1/GPx, que aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y promueve la senescencia celular (de Haan et al., 1996). Por último, tanto en cerebros de personas con SD como con EA, se ha descrito un incremento de células senescentes en diferentes poblaciones neuronales (Martínez-Cué y Rueda, 2020a).

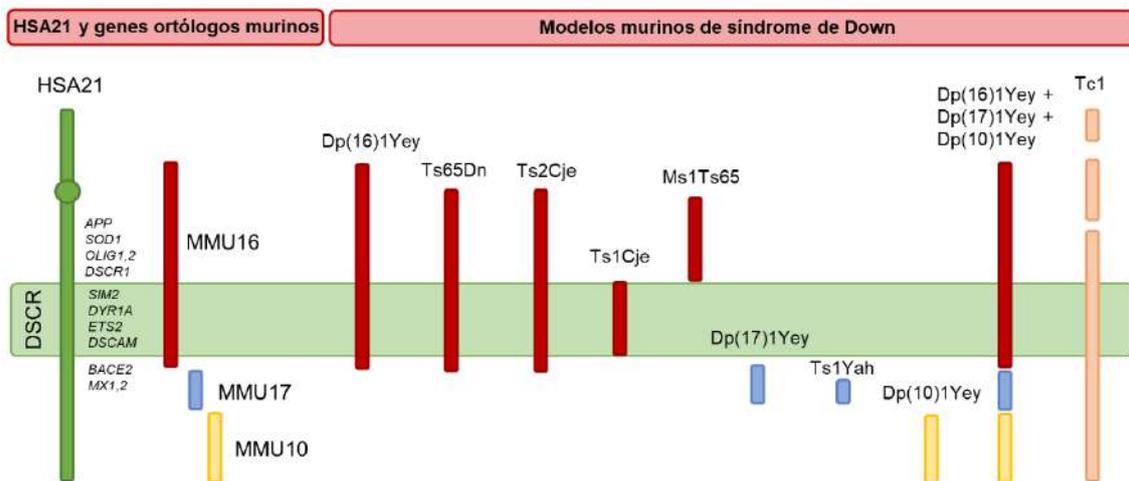
Por lo tanto, el aumento de estrés oxidativo en el cerebro con SD desde etapas prenatales altera el desarrollo normal del cerebro ya que afecta a los procesos de neurogénesis, diferenciación neuronal, migración, conectividad y supervivencia neuronal (Butterfield et al., 2012; Gupta et al., 2016). Sin embargo, en etapas más avanzadas de la vida, el estrés oxidativo se agrava progresivamente acelerando el envejecimiento prematuro, el desarrollo de la neuropatología de tipo EA, la senescencia celular y la neurodegeneración y contribuyendo al deterioro cognitivo característico del SD (Perluigi y Butterfield, 2012b; Rueda y Martínez-Cué, 2020).

## **2.2. Modelos murinos para el estudio del síndrome de Down**

Durante las últimas décadas se han desarrollado numerosos modelos animales con el fin de comprender las bases neurobiológicas responsables de la aparición de los mecanismos patológicos que originan los fenotipos característicos de las personas con SD. Además, estos modelos también permiten probar la eficiencia de nuevas estrategias terapéuticas para paliar estas alteraciones fenotípicas y poder así mejorar la calidad de vida de estos individuos.

Ratones y humanos comparten un genoma muy similar en el que se encuentran muchas regiones homólogas entre ambas especies. El HSA21 tiene tres regiones ortólogas repartidas en los cromosomas murinos 10, 16 y 17 (Mmu 10, 16 y 17; Mmu de *Mus musculus*). El HSA21 contiene 222 genes codificantes de proteínas, de los cuales 158 son homólogos a genes codificantes de proteínas murinos. Estos genes están distribuidos dentro del genoma del ratón de la siguiente manera: la mayoría de ellos se encuentran en el Mmu16, conteniendo un total de 102 genes codificantes, mientras que el Mmu10 y el Mmu17 contienen 37 y 19 genes, respectivamente. Además, de los 325 genes no codificantes del HSA21, 75 se encuentran conservados en el ratón y también se encuentran distribuidos entre el Mmu10, 16 y 17 (Gupta et al., 2016; Antonarakis et al., 2020; Klein y Haydar, 2022).

El desarrollo de modelos murinos que permitan reproducir completamente los rasgos fenotípicos del SD es extremadamente complejo. En primer lugar, como se ha dicho anteriormente, los genes triplicados del HSA21 están distribuidos en diferentes cromosomas del genoma del ratón. Por otro lado, algunos de los genes triplicados en el SD no se encuentran conservados en el genoma del ratón y, además, algunos genes del HSA21 no tienen homólogos en la especie humana. Por ello, en la actualidad hay diversos modelos murinos y, cada uno de ellos, cuenta con unas características fenotípicas diferentes en función de la porción del HSA21, o su región ortóloga en ratón, que contenga triplicada. Estos modelos se subdividen en: i) modelos con una triplicación total o parcial del Mmu16, Mmu17 o Mmu10 ii) modelos con una triplicación total o parcial del HSA21 iii) modelos transgénicos (Gupta et al., 2016; Herault et al., 2017). La figura 4 muestra los modelos murinos de SD más utilizados.



**Figura 4. Representación esquemática del HSA21 y las regiones ortólogas murinas.** En la izquierda se muestra el HSA21 (verde) junto con algunos genes que se encuentran en este cromosoma y las regiones ortólogas del Mmu16 (rojo), Mmu17 (azul) y Mmu10 (amarillo). La parte derecha, muestra el segmento cromosómico triplicado de algunos modelos murinos de SD. La banda verde clara indica la región aproximada del DSCR. Figura modificada de Costa y Scott-Mckean (2013) y de Lana-Elola et al. (2011)

De todos ellos, el ratón Ts65Dn es el modelo murino mejor caracterizado y más utilizado en el estudio del SD, ya que es capaz de reproducir numerosos fenotipos presentes en los individuos con esta condición. Por ello, ha sido el modelo experimental elegido para desarrollar el presente trabajo de Tesis Doctoral.

### 2.2.1. El modelo murino Ts65Dn (TS)

El ratón Ts65Dn (TS), contiene una translocación recíproca que resulta en un cromosoma extra muy pequeño en la que la porción más distal del Mmu16 se fusiona con la región centromérica del Mmu17. Esta región triplicada del Mmu16 contiene 92 genes codificantes de proteínas

ortólogos a los genes del HSA21. No obstante, este modelo es portador de un fragmento triplicado del Mmu17 que contiene genes no triplicados en el SD (Duchon et al., 2011). A pesar de ello, el ratón TS reproduce numerosas alteraciones fenotípicas presentes en las personas con SD entre las que destacan las alteraciones cognitivas y neuroanatómicas y, en etapas más tardías, el desarrollo de una neuropatología de tipo EA. Esto le convierte en el modelo animal mejor caracterizado y el más utilizado para el estudio del SD (Vacano et al., 2012).

Al igual que las personas con SD, los ratones TS presentan déficits cognitivos desde etapas tempranas del desarrollo que empeoran progresivamente durante la edad adulta (Hamlett et al., 2016; Hunter et al., 2004). Además, este modelo presenta otros fenotipos asociados al SD, tales como anomalías craneofaciales, inmunológicas, hormonales y cardiovasculares entre otras (Moore, 2006; Roper et al., 2006; Williams et al., 2008; DeRuisseau et al., 2019; Lorenzo et al., 2013; Antonarakis et al., 2010).

#### **2.2.4.1. Alteraciones cognitivo-conductuales del ratón TS**

El ratón TS muestra un retraso generalizado en su neurodesarrollo lo que da lugar a diferentes fenotipos cognitivo-conductuales similares a los que presentan las personas con SD.

Las habilidades sensorimotoras como la fuerza en las extremidades anteriores, el equilibrio o la tracción se encuentran conservadas en el ratón TS (Escorihuela et al., 1995). Sin embargo, estos animales presentan alteraciones en la estabilidad, el patrón de marcha o la coordinación motora (García-Cerro et al., 2018). Además, presentan hiperactividad en determinados paradigmas experimentales como el campo abierto o el laberinto elevado en cruz, en los que son expuestos a distintas condiciones aversivas (Gao et al., 2021; Holtzman et al., 1996; Stewart et al., 2007). Esta hiperactividad podría ser parcialmente debida a déficits atencionales o alteraciones en el sistema de inhibición (Martínez-Cué et al., 2005; Whitney y Wenger, 2013).

Al igual que las personas con SD, el ratón TS presenta alteraciones a nivel cognitivo, especialmente en la realización tareas dependientes de hipocampo (Freeburn y Munn, 2021). Distintas pruebas cognitivo-conductuales como el laberinto radial o en el laberinto acuático de Morris (MWM, *Morris Water Maze*) han demostrado que en este modelo experimental la memoria espacial se encuentra particularmente afectada (García-Cerro et al., 2020; Olmos-Serrano et al., 2016). Además, el ratón TS muestra alteraciones en la memoria de reconocimiento, analizada mediante la prueba reconocimiento de objetos, y en la memoria asociativa, evaluada en la prueba de condicionamiento del miedo (Fernandez y Garner, 2008; Salehi et al., 2009). Por último, estos

animales presentan déficits en la memoria de trabajo y de referencia en las pruebas del laberinto en T, el MWM y el laberinto radial (Olmos-Serrano et al., 2016; Salehi et al., 2009; Vidal et al., 2020).

Estas alteraciones cognitivo-conductuales del ratón TS están presentes desde etapas muy tempranas de su desarrollo y sufren un deterioro progresivo durante el envejecimiento.

#### **2.2.4.2. Alteraciones neurobiológicas del ratón Ts65Dn**

El ratón TS presenta numerosas alteraciones neuromorfológicas y neuroquímicas similares a las de los individuos SD, probablemente responsables de su fenotipo cognitivo-conductual (Klein y Haydar, 2022).

A diferencia de las personas con SD, el cerebro del ratón TS no presenta cambios en el volumen global ni en etapas post-natales ni durante la edad adulta (Aldridge et al., 2007). Sin embargo, algunas regiones como el hipocampo y el cerebelo sí presentan una reducción en su volumen (Jain et al., 2020). La reducción del volumen en estas áreas cerebrales es debida a su **hipocelularidad**, aunque cada una de ellas desarrolla esta alteración en etapas diferentes (Aziz et al., 2018). En el caso concreto del hipocampo, mientras que en las regiones CA1 y CA3 la disminución de la densidad neuronal se detecta a partir de los 17-18 meses de edad, el giro dentado presenta una reducción en el número de CG desde etapas prenatales hasta la edad adulta (Lorenzi y Reeves, 2006; Rueda et al., 2005), por lo que serán el objeto principal de estudio en este Trabajo de Tesis Doctoral.

De manera similar a lo anteriormente descrito en el SD, la hipocelularidad en los ratones TS se debe a **defectos en la neurogénesis**. Al igual que en los humanos, en los ratones la neurogénesis tiene lugar en la zona subventricular y en la zona subgranular del giro dentado y en ambas zonas se encuentran alteraciones del proceso neurogénico en el ratón TS (Bianchiet al., 2010; Trazzi et al., 2011; Stagni et al., 2018). Así, los ratones TS muestran una reducción en la proliferación de los precursores neurales desde estadios tempranos del neurodesarrollo hasta etapas avanzadas del envejecimiento (Guidi et al., 2017; Rueda et al., 2005). Esta disminución de la proliferación celular puede deberse a que el exceso de dosis génica causado por la trisomía produce una ralentización del ciclo celular tanto en el SD como el ratón TS (Contestabile et al., 2009; Stagni et al., 2018).

Al igual que ocurre en los cerebros con SD, el ratón TS muestra **alteraciones en la conectividad sináptica** (Ayberk Kurt et al., 2004). El ratón TS adulto presenta una reducción en el número de dendritas, así como una disminución de su tamaño. Además, muestran una menor densidad de

espinas dendríticas y alteraciones en su morfología (Belichenko et al., 2004; 2007). Además, las CG del hipocampo muestran una disminución en diversos marcadores moleculares de plasticidad neuronal como el BDNF (*Brain derived Neurotrophic Factor*) o PSA-NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) (Villarroya et al., 2018). Adicionalmente, trabajos previos realizados en este laboratorio han demostrado que el ratón TS presenta una disminución en la expresión de marcadores de las proteínas presinápticas y post-sinápticas, sinaptofisina y PSD95, en el hipocampo (García-Cerro et al., 2020).

Además, el ratón TS también presenta **alteraciones en los sistemas de neurotransmisión**. El cerebro del ratón TS muestra un desequilibrio en el balance de excitación-inhibición cerebral causado por una disminución en el número de sinapsis excitadoras en la corteza cerebral y el hipocampo (Kurt et al., 2004) y un mayor número de sinapsis inhibitoras en el giro dentado y la corteza somatosensorial (Pérez-Cremades et al., 2010), lo que da lugar a una sobreinhibición cerebral. El incremento del tono inhibitor se debe a un aumento en los niveles de marcadores de sinapsis inhibitoras y un mayor tamaño de dichas sinapsis (Belichenko et al., 2009; Martínez-Cué et al., 2013). Los ratones TS también muestran alteraciones en la vía de señalización glutamatérgica, así como una menor activación de estos receptores (Siarey et al., 2006; Vink et al., 2009). Además, el sistema serotoninérgico presenta una disminución de receptores que, podría estar relacionado con los defectos en la neurogénesis (Bianchi et al., 2010). Por último, tanto el sistema noradrenérgico como el colinérgico sufre una pérdida de neuronas en la etapa adulta que se agrava con el envejecimiento (Salehi et al., 2009; Antonarakis et al., 2020).

#### **2.2.4.3. Neurodegeneración en el ratón TS**

El ratón TS sufre un deterioro cognitivo progresivo a medida que aumenta su edad (Hamlett et al., 2016). De manera similar a lo que ocurre en los individuos con SD, en el cerebro del ratón TS también se desarrollan diversos procesos neuropatológicos que contribuyen a un envejecimiento acelerado y a la neurodegeneración. Estos procesos incluyen, el exceso de estrés oxidativo cerebral, el desarrollo de una neuropatología de tipo EA, el aumento de la neuroinflamación y el incremento de la senescencia celular (Martínez-Cué y Rueda, 2020a; 2020b; Rueda y Martínez-Cué, 2020).

Al igual que las personas con SD, el ratón TS también presenta triplicado el gen *Sod1*, lo que genera un incremento en la producción de ROS (Capone et al., 2002). Además, se han descrito anomalías en el sistema antioxidante, lo que contribuye al desequilibrio redox en el cerebro de estos animales (Lanzillotta y Zuliani, et al., 2021; Parisotto et al., 2016). De acuerdo

con estas alteraciones, el cerebro del ratón TS presenta un perfil oxidativo y anomalías mitocondriales similares a las descritas en los individuos SD (Alldred et al., 2021; Corrales et al., 2017; Shichiri et al., 2011; Valenti et al., 2016). En concreto, este modelo muestra niveles elevados de estrés oxidativo en el hipocampo y la corteza, que causan un incremento en la peroxidación lipídica, carbonilación de proteínas y disfunción mitocondrial (Parisotto et al., 2016; Shichiri et al., 2011; Valenti et al., 2016) que afectan a la estructura y función del cerebro (Herault et al., 2017b). Aunque hasta el momento no hay estudios sobre daño en el DNA en el cerebro de este modelo, trabajos realizados en células satélite del músculo esquelético y en células madre hematopoyéticas de este ratón, han demostrado que el incremento del estrés oxidativo produce un aumento del daño en el DNA y la adquisición prematura de un fenotipo senescente (Pawlikowski et al., 2018; Rueda et al., 2018b; Wang et al., 2016). Además, el ratón TS muestra un aumento en la densidad de células senescentes en diferentes áreas del hipocampo, incluyendo la capa de células granulares, que se asocian al incremento del estrés oxidativo (Parisotto et al., 2016; Martínez-Cué y Rueda, 2020a).

El desarrollo de una **neuropatología de tipo EA** es otro rasgo común a las personas SD y el ratón TS (Hamlett et al., 2016). Cabe destacar que este modelo murino no desarrolla las placas seniles de péptidos  $\beta$ -amiloides ni los ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada característicos de la EA (Hunter et al., 2004; Seo y Isacson, 2005). Sin embargo, dado que el ratón TS contiene el gen *App* en el segmento cromosómico triplicado, muestra un incremento en los niveles de APP y péptidos A $\beta$  en el hipocampo y la corteza cerebral (Cataldo et al., 2004; Hunter et al., 2003; Rueda et al., 2010). Además, el cerebro de estos animales presenta niveles elevados de proteína tau hiperfosforilada (Qian et al., 2013; Rachubinski et al., 2012). Estas alteraciones contribuyen a la neurodegeneración de neuronas colinérgicas y noradrenérgicas, comprometiendo así la función del hipocampo (Millan Sanchez et al., 2012).

Al igual que ocurre en el cerebro de las personas con SD y con EA, a partir de los 6 meses de edad, los ratones TS presentan una **neurodegeneración colinérgica** progresiva de las neuronas del prosencéfalo basal, caracterizada por una disminución en los niveles de diferentes marcadores colinérgicos y una reducción en el tamaño de estas neuronas (Kirstein et al., 2022; Powers et al., 2016).

Por último, el cerebro del ratón TS también presenta un incremento de los **procesos neuroinflamatorios**. En concreto, se ha descrito un aumento en la activación de la microglía de ciertas áreas cerebrales como el hipocampo y el prosencéfalo basal, así como un incremento en

la expresión de citoquinas proinflamatorias (Hamlett et al., 2020; Lockrow et al., 2012; Rueda et al., 2018) .

En su conjunto, todos estos mecanismos neuropatológicos comprometen el correcto funcionamiento neuronal, inducen un envejecimiento prematuro del cerebro, favorecen la neurodegeneración y la senescencia celular y, por tanto, contribuyen a los déficits cognitivos que muestran los ratones TS (Alldred et al., 2021; Capone et al., 2002).

### **2.3. Componentes celulares afectados por el exceso de dosis génica o por el estrés oxidativo en las CG del hipocampo del ratón TS**

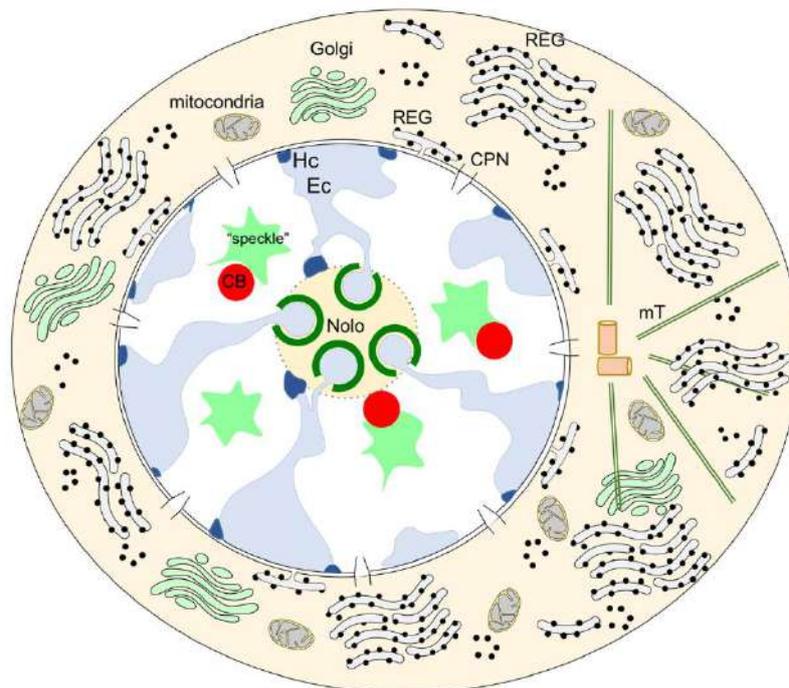
Como se ha ido mencionando a lo largo de la Introducción de esta Tesis Doctoral, la disfunción cognitiva del SD y del ratón TS se debe, por un lado, al exceso de dosis génica que modifica la expresión de numerosos genes causando alteraciones celulares desde etapas tempranas del neurodesarrollo que comprometen la correcta función neuronal. Pero, además, a lo largo de la vida de las personas con SD aparecen diversos mecanismos neuropatológicos que dañan componentes celulares esenciales, inducen neurodegeneración o senescencia celular, favorecen el desarrollo de la neuropatología de tipo EA y por tanto agravan los déficits cognitivos característicos de este síndrome.

Así, esta Tesis Doctoral ha sido dividida en dos estudios. En el primero de ellos nos hemos centrado en evaluar las alteraciones de diversos componentes nucleares causadas por el exceso de dosis génica en las CG del hipocampo del ratón TS. En el segundo estudio, hemos analizado alteraciones celulares asociadas al exceso de estrés oxidativo en la misma población neuronal del ratón TS. Se ha elegido esta población neuronal porque tiene una función fundamental en la formación de nuevas memorias de tipo declarativo ya que constituyen el primer elemento del circuito trisináptico del hipocampo. Además, las CG del ratón TS muestran muchas alteraciones como una disminución en su densidad, así como anomalías morfológicas, electrofisiológicas y funcionales desde etapas tempranas del desarrollo que se agravan con la edad (García-Cerro et al., 2020; Rueda et al., 2020; Stagni et al., 2021; Corrales et al., 2014; 2017; Rueda et al., 2018; Uguagliati et al., 2021; Mojabi et al., 2016; Villarrolla et al., 2018; Stagni et al., 2019; Guidi et al., 2013). Para entender los efectos causados por el exceso de dosis génica o por el estrés oxidativo sobre algunos componentes celulares implicados en la homeostasis neuronal, en los siguientes apartados de la Introducción, se explicará detalladamente el funcionamiento de algunos componentes celulares y el estado actual de los mismos en el SD.

### 2.3.1 Biología del núcleo celular en el SD

El núcleo celular es un orgánulo membranoso que contiene el material genético y la maquinaria necesaria para su metabolismo. Se encuentra rodeado por la envoltura nuclear y está encargada de separar el nucleoplasma del citoplasma, así como de permitir la comunicación entre ambas partes.

Ensayos de Biología Celular y Molecular *in situ* han demostrado que el núcleo celular se encuentra dividido en dos territorios funcionales y estructurales diferentes: el territorio cromosómico y el territorio intercromosómico. La proporción que ocupan cada uno de estos territorios respecto al volumen nuclear se ha relacionado con los requerimientos transcripcionales y traducionales de la célula (Cremer y Cremer, 2001). El territorio cromosómico está constituido por la cromatina, mientras que en el territorio intercromosómico se encuentran algunas estructuras nucleares como el nucleolo, los cuerpos nucleares de Cajal (CB) y los *speckles* (Cioce y Lamond, 2005; Lamond y Spector, 2003) (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de la estructura nuclear (blanco y azul) y citoplasmática (amarillo) de una neurona.** En el núcleo se aprecian dos dominios diferenciados: el dominio cromosómico formado por la euromatina (Ec, azul claro) y la heterocromatina (Hc, azul oscuro) y el dominio intercromatínico (blanco) que contiene el nucleolo (Nolo), cuerpos nucleares de Cajal (CB) y los *speckles*. En la envoltura nuclear se representan los complejos de poros nucleares (CPN). En el citoplasma se representan algunas organelas implicadas en el correcto funcionamiento celular como las mitocondrias, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico rugoso (REG) y los microtúbulos (mT). Imagen cedida por María Teresa Berciano Vega.

### 3.3.1.1. Territorio cromosómico

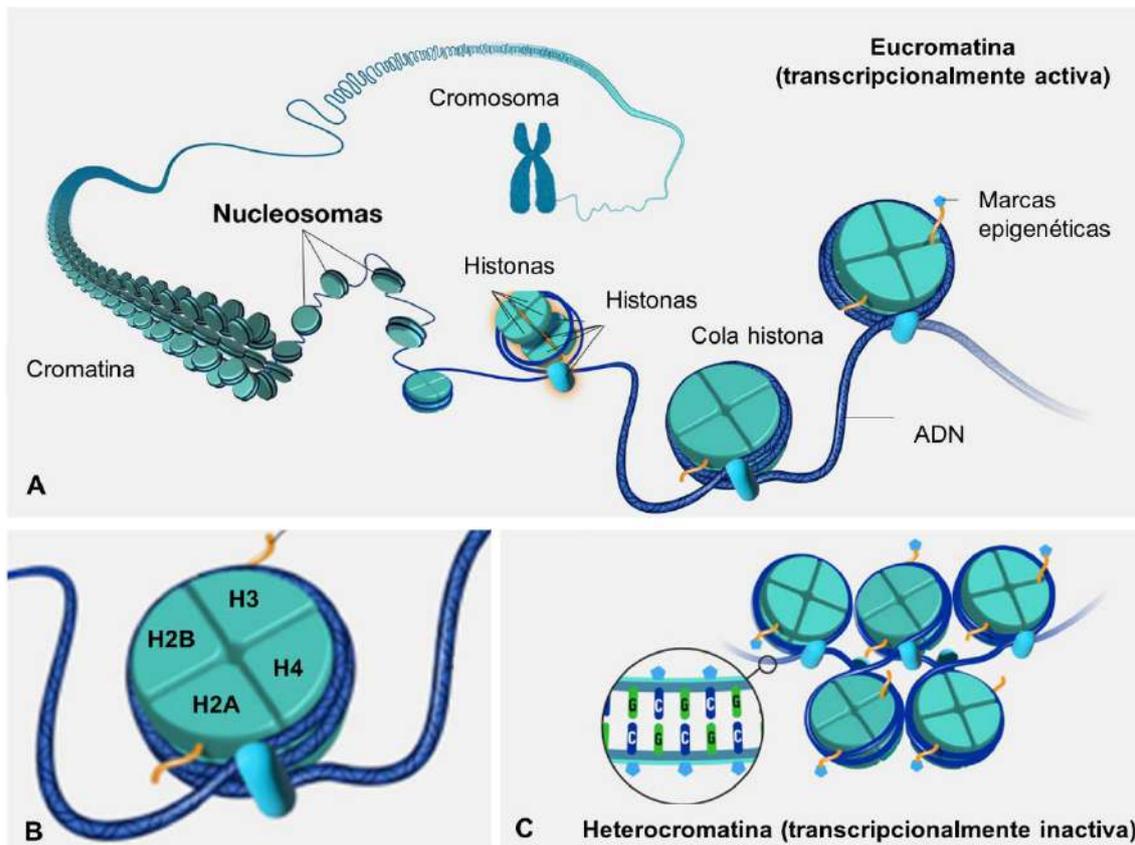
El territorio cromosómico, también denominado territorio cromatínico, corresponde a la porción nuclear ocupada por los cromosomas. Los **cromosomas** son estructuras conformadas por cromatina, una combinación de una molécula de ADN con diferentes proteínas que permiten la compactación del material genético dentro del núcleo celular. Los niveles de plegamiento de la cromatina son un sistema esencial para la regulación de la expresión génica, pudiéndose distinguir dos estados funcionales: la *eucromatina*, con una estructura poco condensada para permitir el acceso de la maquinaria de transcripción y la *heterocromatina*, altamente compactada, inaccesible para esta maquinaria y transcripcionalmente inactiva.

Para poder cambiar de un estado funcional a otro, la cromatina se organiza en bloques estructurales denominados **nucleosomas**, alrededor de los cuales se organiza el DNA. Cada nucleosoma está compuesto por un octámero de histonas, dos dímeros de H3-H4 y dos dímeros de H2A-H2B (Zhou et al., 2019). Las histonas nucleosomales contienen dos dominios diferenciados, una región globular central que se encuentra en contacto con el DNA y se encuentra altamente compactada y los extremos N-terminales desplegados que salen del nucleosoma en forma de cola (Figura 6).

Las colas de las histonas sufren **modificaciones postraduccionales** que modifican los niveles de compactación de la cromatina y, por tanto, su función. Estas modificaciones son reversibles y muy dinámicas para adaptarse a las necesidades celulares. Entre ellas se incluyen la metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y ADP-ribosilación y su combinación se conoce como “código de histonas” (Zhang et al., 2021). En función del tipo de marca epigenética y de la posición dentro del dominio N-terminal de la histona, estas modificaciones postraduccionales se han relacionado con cambios en la compactación de la cromatina y con otras funciones tales como la reparación del daño en el DNA. Algunas de las marcas epigenéticas mejor caracterizadas son la acetilación de la histona H4 en la lisina 16, que promueve un estado abierto de la cromatina y la actividad transcripcional (Zhang et al., 2015). Sin embargo, la trimetilación de la histona H4 en la lisina 20 tiene el efecto inverso, generando la compactación de la cromatina y un estado transcripcionalmente inactivo (Castillo-Iglesias et al., 2019; Webster et al., 2009). Adicionalmente, se ha descrito una estructura de orden superior de la cromatina mediante la interacción de la histona H1 con los extremos libres del DNA nucleosomal que se denomina cromatosoma. La unión de la histona H1 con los extremos del DNA nucleosomal genera un cambio hacia una conformación cerrada y compacta, dificultando

la transcripción del RNA; por el contrario, la disociación de H1 produce la apertura del nucleosoma para favorecer la interacción con la maquinaria de transcripción (Andrés et al., 2020).

**Figura 6. Organización estructural de la cromatina.** A. El cromosoma está formado por cromatina, un complejo formado por la hebra de DNA e histonas nucleosomales que forman los nucleosomas. En este esquema la cromatina



presenta una conformación abierta y transcripcionalmente activa (euromatina). **B.** Ampliación de la estructura de un nucleosoma formado por un octámero con cuatro tipos de histonas nucleosomales, alrededor del cual se enrolla la hebra de DNA. Las histonas nucleosomales contienen unas colas que se proyectan hacia el exterior y son susceptibles de sufrir modificaciones epigenéticas que modifican su nivel de compactación. **C.** Representación de la cromatina en una conformación más compacta y transcripcionalmente cerrada (heterocromatina). Modificación de *Recursos educativos del National Human Genome Research Institute (NIH)*: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Nucleosoma>

Actualmente, gracias a técnicas avanzadas de Biología Molecular y Celular, se ha demostrado que los cromosomas ocupan una posición específica dentro del núcleo celular. De esta manera, la organización tridimensional del genoma está implicada en la regulación de la expresión génica mediante la interacción inter e intracromosómica (Cremer y Cremer, 2001). Por lo tanto, anomalías en la arquitectura nuclear que generen cambios en estas interacciones pueden causar alteraciones en la regulación de la expresión génica (Maass et al., 2019a).

En este contexto, la presencia de una copia extra del HSA21 o del Mmu16 en el núcleo de las células de las personas con SD o del ratón TS respectivamente causa alteraciones en la posición de los cromosomas dentro del territorio cromosómico (Kemeny et al., 2018). Estas anomalías producen alteraciones en la expresión génica en los individuos SD y el ratón TS, así como modificaciones en el perfil epigenético de las histonas (Letourneau et al., 2014). Las anomalías en la distribución tridimensional de los cromosomas modifican el patrón epigenético de la cromatina encargado de regular los niveles de plegamiento y, por tanto, alteran los dominios ocupados por la heterocromatina o eucromatina y su actividad transcripcional (Ito y Takizawa, 2018). Trabajos previos demuestran que la desregulación génica presente en el SD y el ratón TS no solo afecta a los genes que se encuentran en el segmento cromosómico triplicado, sino que numerosos genes que se encuentran en doble dosis también sufren alteraciones en su expresión (Kahlem et al., 2004). Adicionalmente, cabe destacar que mientras que algunos genes en triple dosis están sobreexpresados en el SD y el ratón TS, otros presentan una expresión normal o reducida (Kahlem et al., 2004; Lyle et al., 2004; Rachidi y Lopes, 2007), sugiriendo la presencia de mecanismos reguladores adicionales específicos de cada tejido. Por lo tanto, el exceso de dosis génica en el SD genera una compleja alteración en la regulación de la expresión génica y cambios epigenéticos en el DNA y las histonas que pueden estar implicados en numerosos fenotipos presentes en este síndrome como los déficits cognitivos, el envejecimiento acelerado y la neurodegeneración (Antonarakis et al., 2020; Mentis, 2016).

### **2.3.1.2. Territorio intercromosómico**

El territorio intercromosómico, también denominado territorio intercromatínico, contiene diversas organelas o cuerpos nucleares implicados en la regulación de la expresión génica y el mantenimiento de la proteostasis celular. Entre ellos se encuentra el nucleolo, el cuerpo de Cajal (CB, *Cajal Body*) y los *speckles*.

#### **2.3.1.2.1. El nucleolo y la síntesis de ribosomas**

El nucleolo es la estructura más prominente dentro del núcleo celular y su función principal es la biogénesis de los RNA ribosomales (rRNA) y su ensamblaje con proteínas para formar las partículas pre-ribosomales (Boisvert et al., 2007). Los **ribosomas** son organelas citoplasmáticas encargadas de la síntesis proteica en la célula y se componen de dos subunidades: la subunidad mayor está formada por los rRNA 5S, 28S y 5.8S y la subunidad menor por una única molécula de rRNA 18S (Wilson y Cate, 2012). Por lo tanto, la integridad del nucleolo es esencial para el mantenimiento de la proteostasis celular y las alteraciones en la estructura o funcionamiento

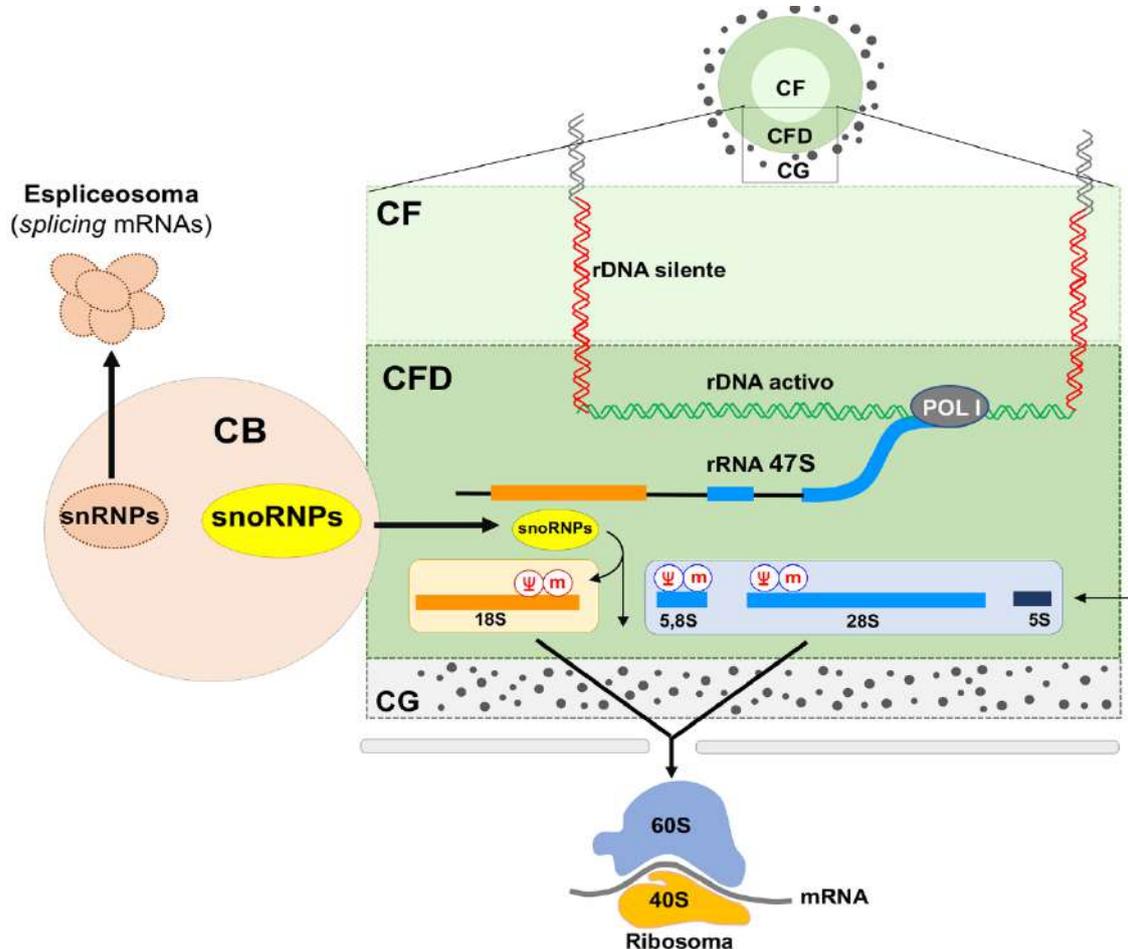
nucleolar podrían causar anomalías en el neurodesarrollo o neurodegeneración (Baltanás et al., 2011; 2019; Hernández-Ortega et al., 2016; Parlato y Kreiner, 2013).

Los nucleolos se organizan alrededor de las regiones organizadoras de nucleolos (NOR, *Nucleolar Organizer Regions*), que contienen las secuencias génicas para la codificación de los rRNA. Los NOR están formados por repeticiones en tándem de DNA ribosomal (rDNA) que codifican para los diferentes rRNAs maduros que formarán los ribosomas (Mcstay, 2016). Las células humanas diploides contienen diez NOR situados en los cromosomas 1, 2, 15, 21 y 22 (van Sluis et al., 2019), mientras que las células murinas contienen 6 cromosomas portadores de NOR (12, 15, 16, 17, 18, 19) (Mcstay, 2016). Estudios previos realizados en células mitóticas de individuos con SD han demostrado un incremento en el número de Ag-NOR, debido a la presencia de una de estas regiones en el HSA21 (Demirtas, 2009). Sin embargo, el fragmento del Mmu16 triplicado en el ratón TS no porta ninguna de estas regiones. Además, el exceso de dosis génica presente en éstas podría modificar la distribución tridimensional de las NOR dentro del núcleo y alterar el patrón de fusión nucleolar.

Los genes ribosomales codifican para un rRNA precursor denominado 45S que incluye los transcritos de los rRNA maduros 5.8S, 18S y 28S. El pre-rRNA 45S tiene una vida muy corta ya que, una vez se sintetiza, sufre un rápido y complejo procesamiento que da lugar a los rRNA maduros que formarán parte de las partículas ribosomales (Wilson y Cate, 2012).

La organización estructural del nucleolo refleja las etapas de procesamiento de las enzimas y factores reguladores implicados en la síntesis y procesamiento de rRNA (Figura 7). Los centros fibrilares (CF) son lugares de almacenamiento de la maquinaria de transcripción, como la polimerasa I y el factor de transcripción UBF (*Transcription Upstream Binding Factor*) (Boisvert et al., 2007). Los genes ribosomales activos se encuentran en el componente fibrilar denso (CFD), donde se lleva a cabo la transcripción del pre-rRNA 45S y su procesamiento hacia los rRNAs maduros 5.8S, 18S y 28S (Smirnov et al., 2016). Este procesamiento está guiado por ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNA), como la fibrilarina o la diskerina. En particular, la fibrilarina produce la metilación de pre-RNA y la diskerina/NAP57 la pseudouridinización, cruciales para el correcto plegamiento y ensamblaje con proteínas ribosomales (Trinkle-Mulcahy y Sleeman, 2017). Las partículas preribosomales emergentes del CFD se transfieren al componente granular donde interactúan con chaperonas, particularmente la nucleofosmina (NPM/B23) (Raška et al., 2006). Aquí, el 18S interactúa con proteínas ribosomales para formar la subunidad pequeña del ribosoma, mientras que el 5.8S y el 28S se unen a las proteínas para formar la subunidad mayor del ribosoma (Figura 7). Las

partículas ribosomales maduras en el componente granular salen del nucleolo y se exportan al citoplasma donde se ensamblan (Schöfer y Weipoltshammer, 2018).



**Figura 7. Representación del proceso de biogénesis de los ribosomas.** El rDNA activo presente en el componente fibrilar denso (CFD) del nucleolo se transcribe mediante la acción de la polimerasa I (POL I), dando lugar a un precursor de rRNA denominado 45S. Gracias a la acción de diferentes proteínas (snoRNP) sintetizadas en el cuerpo nuclear de Cajal (CB) se llevan a cabo diversas modificaciones que dan lugar a los rRNA maduros 5.8S, 18S y 28S. El 18S formará la subunidad pequeña del ribosoma, mientras que el 5.8S y el 28S la subunidad mayor. Esquema modificado de la Tesis de Oriol Narcís Majós, 2019.

### 2.3.1.2.2. El cuerpo nuclear de Cajal

El CB es una organela del dominio intercromatínico que recibe este nombre en honor a su descubridor Santiago Ramón y Cajal. Éste lo describió como una estructura nuclear esférica que se encuentra libre en el nucleoplasma celular y aparece, frecuentemente, asociada al nucleolo (Gall, 2003; Lafarga et al., 2009).

A nivel molecular, el CB está formado por coilina, una proteína estructural específica de los CB canónicos. Además, estos cuerpos concentran diversos componentes como RNAs no

codificantes, proteína de supervivencia de motoneuronas (SMN, *survival of motor neurons*) ribonucleoproteínas nucleares pequeñas espliceosomales (snRNP, *small nuclear ribonucleoproteins*) y ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNP, *small nucleolar ribonucleoproteins*) (Lafarga et al., 2018; Machyna et al., 2014; Meier, 2017).

Los CB son organelas plurifuncionales implicadas en la maduración del complejo de la telomerasa, el procesamiento de histonas y la biogénesis de snRNP y snoRNP. Destaca su participación en la síntesis de snRNP espliceosomales, implicadas en el procesamiento de pre-RNA, y de snoRNP, responsables del procesamiento pre-rRNA en el nucleolo (Meier, 2017). Por otro lado, los CB se encuentran asociados a loci que codifican para histonas, snoRNP o snRNP lo que sugiere que, además, están implicados en la organización del genoma (Sawyer et al., 2016). De esta manera, se puede justificar la estrecha relación espacial que tienen los CB con algunas estructuras celulares como los nucleolos o los télómeros (Cioce et al., 2006a). Así, los CB no son un sitio de transcripción ni de *splicing*, sino que sirven como suministro de diferentes componentes moleculares esenciales para el mantenimiento de la proteostasis celular.

En mamíferos, el número y tamaño de CB por célula es específico de cada tipo neuronal y ambos parámetros se encuentran directamente relacionados con el tamaño y la actividad transcripcional neuronal (Berciano et al., 2007; Pena et al., 2001a). Por lo tanto, la reducción del número o tamaño de CB causa una alteración en la proteostasis neuronal, contribuyendo así a la neurodegeneración (Narcís et al., 2018; Tapia et al., 2017).

### **2.3.2. Alteraciones celulares asociadas al exceso de estrés oxidativo en el SD**

Como se ha mencionado anteriormente, el incremento de estrés oxidativo es un proceso neuropatológico que se encuentra estrechamente relacionado con los déficits cognitivos del SD, así como en el envejecimiento acelerado del cerebro y el desarrollo de la neuropatología de tipo EA (Gomez et al., 2020).

Como consecuencia de este incremento de ROS en el SD, se genera daño oxidativo en diferentes biomoléculas celulares (incluyendo proteínas, lípidos y DNA) (Busciglio y Yankner, 1995; Morawiec et al., 2008; Odetti et al., 1998; Rueda y Martínez-Cué, 2020), en la membrana celular y de diferentes orgánulos citoplasmáticos (mitocondrias, lisosomas o retículo endoplásmico) contribuyendo a su disfuncionalidad (Manna et al., 2016) y en los sistemas de degradación proteica intracelular como el sistema autofágico-lisosomal (apartado 2.3.2.3) y el sistema ubiquitín-proteasoma causando alteraciones en la proteostasis celular (Di Domenico et al., 2013; Lanzillotta y Domenico, 2021). Todas estas alteraciones ocasionadas por el estrés

oxidativo pueden causar inestabilidad genómica, comprometer la función neuronal y acelerar la neurodegeneración (Necchi et al., 2015b; Tiano et al., 2012b).

### 2.3.2.1. Disfunción mitocondrial en el SD

La mitocondria es una organela citoplasmática cuya función principal es la síntesis de la energía en forma de ATP. El mantenimiento de la integridad de esta organela es especialmente importante en neuronas por sus altos requerimientos energéticos.

Como se ha mencionado anteriormente, la fosforilación oxidativa mitocondrial es la principal fuente de ROS en la célula por lo que alteraciones en esta organela darán lugar a un incremento del estrés oxidativo celular (Perluigi et al., 2011; Piccoli et al., 2013). Además, las membranas mitocondriales y el DNA mitocondrial (mtDNA) son una diana directa de estas ROS, por lo que el estrés oxidativo daña el funcionamiento de las mitocondrias (Coskun y Busciglio, 2012; van Houten et al., 2006; Wang et al., 2014). En el SD se han descrito numerosas alteraciones morfológicas y funcionales en las mitocondrias (Bordi et al., 2019; Izzo et al., 2018; Mollo et al., 2020; Zamponi et al., 2018). En fibroblastos humanos se ha observado una disminución de crestas mitocondriales, así como la dilatación de sus membranas y anomalías en su distribución (Helguera et al., 2013; Izzo et al., 2017; Piccoli et al., 2013; Zamponi y Helguera, 2019). Además, el sistema de fosforilación oxidativa muestra alteraciones en los niveles de expresión de diferentes complejos implicados en este proceso, disminución en el consumo de oxígeno y reducción en el potencial de la membrana interna mitocondrial en diferentes tejidos, células y edades en el SD (Bayona-Bafaluy et al., 2021; Valenti et al., 2011). Adicionalmente, en cerebros SD se ha observado una disminución en la expresión de diferentes genes codificados en el mtDNA, que comprometen el correcto funcionamiento de esta organela (Coskun et al., 2010). Todas estas alteraciones mitocondriales causan una reducción en la producción de energía celular.

En el SD, también se han descrito alteraciones en la biogénesis y la degradación mitocondrial (Bordi et al., 2019). En fibroblastos humanos de SD se ha observado una reducción en la expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial, así como un incremento en la expresión de genes relacionados con la fisión (Izzo et al., 2018).

Las mitocondrias disfuncionales han de ser degradadas mediante una forma específica de autofagia denominada **mitofagia**. Esta vía de señalización comienza con una despolarización de la membrana mitocondrial que sirve para reclutar dos factores señalizadores PINK1 y Parkina (Yoshii y Mizushima, 2015). PINK1 es una kinasa que se acumula en la membrana externa mitocondrial y su función es fosforilar a la Parkina (Koyano et al., 2014). Así, se produce el

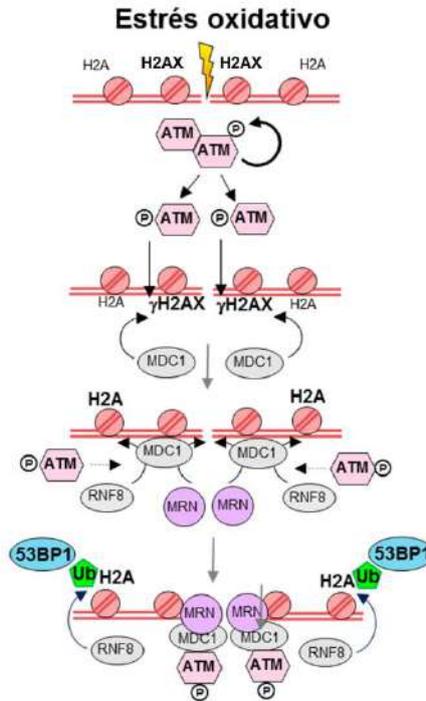
reclutamiento de la Parkina, una ubiquitín E3 ligasa encargada de unir pequeñas colas de ubiquitinas en las mitocondrias disfuncionales o dañadas para comenzar la cascada de señalización hasta formar el autofagosoma donde serán degradadas (Lazarou et al., 2015; Rakovic et al., 2013). En el SD se han descrito déficits en la degradación mitocondrial mediada por esta vía debidas a alteraciones en la interacción PINK1/Parkina y defectos en la formación del autofagosoma (Bordi et al., 2019). Además, en el hipocampo de individuos SD se ha descrito una hiperactivación de la vía de mTOR que inhibe la mitofagia (Iyer et al., 2014; Perluigiet al., 2014).

En su conjunto, esta disfunción mitocondrial presente en el SD induce daño y disfunción de mitocondrias caracterizadas por una menor producción de ATP y mayor generación de ROS (Bayona-Bafaluy et al., 2021; Bordi et al., 2019; Mollo et al., 2020; Zamponi et al., 2018). Por lo tanto, los déficits energéticos junto con el incremento de estrés oxidativo son dos procesos que se encuentran directamente relacionados con la neurodegeneración característica del SD (Martínez-Cué y Rueda, 2020b).

#### **2.3.2.2. Daño en el DNA y mecanismos de reparación en el SD**

En condiciones fisiológicas, el daño en el DNA se produce de forma constante en las células y aumenta progresivamente durante el envejecimiento contribuyendo a la senescencia celular (Zhou et al., 2015; Martínez-Cué y Rueda, 2020a). Sin embargo, en situaciones en las que hay un incremento del estrés oxidativo celular se produce una acumulación de daño en el DNA, particularmente daño de doble cadena (DSB, *Double Strand Breaks*), la forma más nociva para la célula. En fibroblastos de individuos con SD se ha descrito un incremento de daño oxidativo en el DNA, así como roturas en el DNA de doble cadena (Tiano et al., 2012a; Zana et al., 2007). Además, se ha demostrado que las células de personas con SD presentan mayor sensibilidad al daño oxidativo en el DNA que las células de individuos control (Morawiec et al., 2008a). Cuando se produce daño en el DNA por estrés oxidativo se activan los mecanismos de respuesta al daño en el DNA (DDR, *DNA Damage Response*). La DDR comienza con la fosforilación de la histona nucleosomal H2AX en la serina 139 ( $\gamma$ H2AX) mediante la quinasa ATM. Esta fosforilación recluta en el foco de daño a MDC1 que actúa como amplificador de la fosforilación de H2AX (Harper y Elledge, 2007). Posteriormente, la fosforilación de MDC1 atrae enzimas como la RNF8, una ubiquitina ligasa E3 implicada en la ubiquitinación de la histona H2A (Huen et al., 2007). Esta modificación postraduccional en la lisina 15 de la histona H2A (H2Aub) es fundamental para activar una cascada de señalización de reparación de las DSB que promueve el reclutamiento

de diversos factores, como la 53BP1 que permite el acceso de la maquinaria de reparación del DNA en los focos de daño (Walser et al., 2020) (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de la vía de señalización de la respuesta al daño en el DNA generado por un exceso de estrés oxidativo.** La exposición crónica al estrés oxidativo genera roturas en el DNA de doble cadena que han de ser reparadas mediante la DDR. En primer lugar, la ATM fosforila a la histona H2AX y se produce un reclutamiento de diversas enzimas. Posteriormente, se produce la ubiquitinación de la histona H2A, que será reconocida por la 53BP1. La activación de esta cascada de señalización permitirá el acceso de la maquinaria de reparación en los focos de daño en el DNA. Esquema cedido por María Teresa Berciano.

En células de fetos y adultos con SD se ha descrito una acumulación de daño en el DNA y defectos en los mecanismos de reparación causados por el exceso de estrés oxidativo (Morawiec et al., 2008; Tiano et al., 2012; Necchi et al., 2015a; Zana et al., 2007).

El incremento en el daño en el DNA se relaciona con la inestabilidad genómica y la apoptosis, eventos que pueden contribuir al deterioro cognitivo y la neurodegeneración en el SD (Morawiec et al., 2008; Tiano et al., 2012; Martínez-Cué y Rueda, 2020b).

### 2.3.2.3. Alteraciones en la proteostasis celular en el SD

La proteostasis celular hace referencia a la correcta función y balance de la abundancia del proteoma celular y engloba la síntesis, plegamiento y degradación proteica. Por lo tanto, para mantener la proteostasis celular se requiere un adecuado funcionamiento de los ribosomas, el

RE y los sistemas de degradación intracelular, que incluyen el sistema ubiquitín-proteasoma (UPS), el sistema autofágico-lisosomal y la vía endocítica (Labbadia y Morimoto, 2015).

El exceso de dosis génica es un factor que, por sí mismo, afecta a la proteostasis celular (Larrimore et al., 2020; Oromendia y Amon, 2014). Por lo tanto, en el SD, se producen alteraciones en la proteostasis desde etapas tempranas del neurodesarrollo. Posteriormente, con la aparición de mecanismos neuropatológicos como el exceso de estrés oxidativo cerebral y el desarrollo de la neuropatología de tipo EA se produce la acumulación de proteínas oxidadas y mal plegadas, que forman agregados y contribuyen, aún más, al deterioro de la proteostasis celular (Aivazidis et al., 2017; Butterfield y Boyd-Kimball, 2018).

Por tanto, el correcto funcionamiento de estos sistemas de degradación intracelular es esencial para evitar la acumulación de proteínas dañadas que formen agregados tóxicos o indeseados, así como asegurar la homeostasis celular.

#### **2.3.2.3.1. El sistema ubiquitín-proteasoma (UPS)**

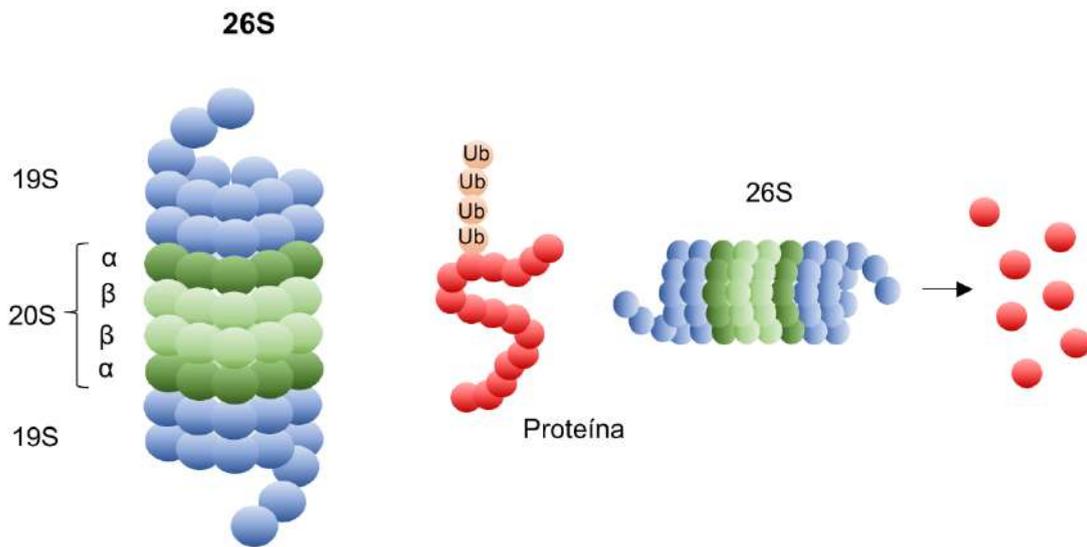
El sistema UPS está implicado en el reconocimiento y degradación de proteínas dañadas, disfuncionales o mal plegadas, así como de reciclar proteínas funcionales que ya no son necesarias para el funcionamiento celular. El proteasoma es una estructura proteica de forma cilíndrica compuesta por una subunidad catalítica 20S, también denominada “core”, y dos subunidades reguladoras 19S que constituyen una estructura denominada 26S (Figura 9) (Wehmer y Sakata, 2016).

La subunidad 20S está compuesta 4 por anillos superpuestos, dos  $\alpha$  y dos  $\beta$ . Los dos anillos  $\alpha$  se encargan del reconocimiento de las proteínas, mientras que los anillos  $\beta$  poseen la actividad catalítica. Los anillos  $\beta$  poseen 6 centros catalíticos clasificados en 3 categorías según su actividad proteolítica: i) caspasa-like, que corta después de aminoácidos ácidos, ii) tripsina-like, que corta después de aminoácidos básicos y iii) quimiotripsina-like, que corta después de aminoácidos hidrofóbicos (Orlowski y Wilk, 2000). En células eucariotas, la actividad proteolítica del 20S degrada aproximadamente el 90 % de las proteínas dañadas por exceso de estrés oxidativo (Jung et al., 2006).

La actividad del proteasoma está regulada, fundamentalmente, por las dos subunidades 19S que se unen a los anillos  $\alpha$  del core. La función de la subunidad reguladora es reconocer, desplegar y activar a la subunidad 20S para la degradación de proteínas (Bedford et al., 2010). Para poder cambiar la configuración tridimensional de las proteínas y que puedan ser

degradadas en el core, la subunidad 19S cuenta con actividad ATP-asa (Cascio et al., 2002) (Figura 9).

Las proteínas que han de ser degradadas mediante el UPS sufren un proceso de modificación postraduccional denominado poliubiquitinización, que consiste en la adición de una pequeña cola de ubiquitinas. Para ello, este sistema cuenta con un conjunto de enzimas (E1, E2, E3) cuyo funcionamiento es ATP-dependiente (Tai y Schuman, 2008). De esta manera, las proteínas poliubiquitiniladas son reconocidas por la subunidad 19S y degradadas en el core.



**Figura 9. Esquema de la estructura y función del proteasoma.** A la izquierda, se muestra la estructura del proteasoma 26S compuesto de dos subunidades reguladoras 19S en los extremos (azul) y una subunidad catalítica 20S que, a su vez, contiene dos anillos  $\alpha$  (verde claro) y  $\beta$  (verde oscuro). A la derecha se representa el proceso de ubiquitinización de una proteína para ser degradada mediante el UPS, dando como resultado su descomposición en aminoácidos.

Por tanto, la degradación de proteínas mediante el proteasoma supone un gran gasto energético para la célula (Henderson et al., 2011), por lo que una disminución de la energía celular produce alteraciones en la degradación proteica mediante este sistema. Por otro lado, el incremento de ROS afecta negativamente a la actividad del proteasoma 26S (Ishii et al., 2005; Zmijewski et al., 2009). En consecuencia, en cerebros y fibroblastos de individuos con SD se ha observado una disminución de la actividad proteasomal (Aivazidis et al., 2017; di Domenico et al., 2013), así como la acumulación de proteínas poliubiquitinadas (Tramutola et al., 2017).

### 2.3.2.3.2. El sistema autofágico-lisosomal

El sistema autofágico-lisosomal se encarga de la degradación de macromoléculas, agregados proteicos, así como de organelas dañadas o disfuncionales. Además, en condiciones en las que el proteasoma está dañado, la vía autofágica-lisosomal toma especial relevancia ya que

degradará las proteínas oxidadas o mal plegadas que no han podido ser procesadas por este sistema (Pandey et al., 2007).

Los **lisosomas** son organelas compuestas por una doble membrana lipídica en cuyo interior hay una gran variedad de enzimas hidrolíticas. Entre ellas se encuentran diversas proteasas, lipasas y nucleasas que necesitan un entorno ácido para su correcto funcionamiento, por lo que la membrana lisosomal cuenta con numerosas bombas de protones ATP-dependientes que aseguran un pH entre 4.5 y 5.5. Las principales proteasas lisosomales son las catepsinas y se agrupan en 3 grupos en función del residuo responsable de su actividad catalítica: aspartato-proteasas (catepsina D y E), cisteína-proteasas (catepsina B, C, F, K, L, O, S, V, W y X) y serína-proteasas (catepsina G) (Stoka et al., 2016). Los lisosomas son estructuras muy dinámicas que se fusionan o dividen en función de los requerimientos proteolíticos celulares (Luzio et al., 2007). En función de su actividad funcional se clasifican en 3 categorías: i) los *lisosomas primarios* que son organelas sin actividad hidrolítica ya que necesitan la activación de las catepsinas mediante la fusión con vesículas autofágicas o endosomas tardíos. ii) Los *lisosomas secundarios* que se forman con la fusión del lisosoma primario con la vesícula autofágica, induciendo la activación de las hidrolasas para degradar el material celular contenido en su interior. Una vez degradado, el lisosoma libera los productos al citoplasma y entra en una fase de reposo y se fusiona con otros lisosomas. Por ello, en condiciones fisiológicas, las células no presentan muchos lisosomas secundarios (Yorimitsu y Klionsky, 2005). iii) En células post-mitóticas se encuentra un tercer tipo de lisosoma denominado *cuerpo residual*. Los cuerpos residuales se forman cuando el material lisosomal no es digerible y agota la actividad enzimática de los lisosomas, produciéndose una acumulación de compuestos celulares que no pueden ser degradados en el interior del lisosoma y que normalmente son tóxicos para la célula (Kurz et al., 2008).

Además de la degradación lisosomal, estas organelas están implicadas en la degradación intracelular mediada por la **vía autofágica**. La autofagia es el proceso biológico de renovación permanente de los constituyentes celulares (Parzych y Klionsky, 2014). Este sistema se encuentra regulado, principalmente, mediante la vía de señalización mTOR, cuya activación inhibe esta vía autofágica-lisosomal (Deleyto-Seldas y Efeyan, 2021). Se describen 3 tipos de autofagia: i) la *macroautofagia* es el tipo más frecuente y se encarga de la degradación de organelas dañadas o disfuncionales (mitocondrias, retículo endoplásmico (RE), ribosomas y peroxisomas), proteasomas, y proteínas solubles de gran tamaño. Este proceso se inicia con el englobamiento de material citosólico en una vesícula de doble membrana desprovista de actividad proteolítica, denominada fagóforo. Posteriormente, se fusiona con lisosomas y forman

en autofagolisosomas, en cuyo interior se produce la degradación del material y el reciclaje de aminoácidos y otras moléculas. ii) la *microautofagia* está implicada en la degradación de peroxisomas, mitocondrias, RE, partes nucleares, gotas lipídicas y ciertas enzimas citoplasmáticas mediante la invaginación directa de la membrana lisosomal (Schuck, 2020) y iii) la *autofagia mediada por chaperonas* es un proceso muy selectivo implicado en la degradación de proteínas citosólicas y solubles (Kaushik y Cuervo, 2018).

El estrés oxidativo puede alterar la vía autofágica-lisosomal oxidando las enzimas lisosomales y las bombas de protones dependientes de ATP de la membrana. Estas modificaciones oxidativas alteran el pH produciendo déficits en la degradación de la vía autofágica-lisosomal. Por otro lado, un incremento en el estrés oxidativo celular produce un incremento de hierro y otros metales, liberados durante el proceso de degradación de metaloproteínas, que entran en el ciclo de oxidación y alteran la homeostasis redox del lisosoma (Kurz et al., 2008).

Tanto en individuos con SD como en el ratón TS se han descrito diversas alteraciones relacionadas con este sistema autofágico-lisosomal. Por un lado, en fibroblastos humanos y en cultivos primarios de neuronas corticales del modelo murino Ts2, se han descrito alteraciones morfológicas lisosomales, que incluyen el agrandamiento y acumulación de estas organelas en el citoplasma celular y un aumento en el pH intralisosomal que produce la inactivación de algunas proteasas como la catepsina D (Jiang et al., 2019). Por otro lado, se ha descrito una hiperactivación en la vía de señalización de mTOR que causa una inhibición del sistema autofágico-lisosomal en muestras hipocámpales de personas con SD (Iyer et al., 2014; Perluigi, et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, los fibroblastos de individuos con SD muestran defectos en la activación de esta vía (Deleyto-Seldas y Efeyan, 2021), lo que contribuye a la acumulación de mitocondrias disfuncionales y al incremento de estrés oxidativo.

Con el tiempo, esta estructura irá incorporando lípidos peroxidados, carbohidratos oxidados y agregados proteicos dañados que contribuirán a incrementar el estado oxidativo de la célula. De esta manera, se formará la **lipofuscina**, un pigmento autofluorescente que resulta altamente tóxico para la célula (Korovila et al., 2017). El 99 % de la lipofuscina es captada por los lisosomas, sin embargo, este compuesto es resistente a la acción de las proteasas por lo que no puede ser degradada en el interior de estas organelas (Höhn et al., 2012). Las células tratan de diluir la acumulación de lipofuscina mediante la división celular por lo que, en las células post-mitóticas como las neuronas, la acumulación de lipofuscina es irreversible y se agrava con el envejecimiento. La acumulación de lipofuscina en el interior celular contribuye al incremento del

estrés oxidativo, afectando negativamente al funcionamiento celular y contribuyendo a la neurodegeneración.

En conclusión, el incremento de estrés oxidativo característico del SD incrementa la oxidación de proteínas y afecta negativamente a los sistemas de degradación intracelular dando lugar a un incremento de proteínas mal plegadas que tienden a formar agregados no deseados en el citoplasma de las neuronas que pueden dañar otros procesos celulares. Todas estas alteraciones contribuyen al deterioro cognitivo y al desarrollo de la neuropatología de tipo EA en el SD (Di Domenico et al., 2018).



### **3. Objetivos**

---



El objetivo general de esta Tesis Doctoral era estudiar las alteraciones celulares producidas por diferentes mecanismos neuropatológicos en las CG del hipocampo que podrían estar contribuyendo a los déficits cognitivos del modelo experimental de síndrome de Down Ts65Dn, a los 6 meses de edad. Dado que las alteraciones neuronales en el SD son debidas al exceso de dosis génica responsable de la aparición y desarrollo de mecanismos neuropatológicos, entre los que destaca el estrés oxidativo, este trabajo se ha dividido en dos bloques de estudio:

**Estudio I. Evaluación de las alteraciones en la arquitectura nuclear y la organización de diferentes compartimentos nucleares causados por el exceso de dosis génica y la reorganización tridimensional del genoma en las CG del hipocampo del ratón TS.**

Los objetivos específicos de este primer estudio eran:

1. Analizar si el exceso de dosis génica induce cambios en el tamaño nuclear o alteraciones epigenéticas implicadas en la remodelación de la cromatina.
2. Evaluar si las alteraciones en la organización de la cromatina causan cambios en la actividad transcripcional global.
3. Determinar si la reorganización tridimensional del genoma afecta a la localización de las NOR dentro del núcleo celular y, en consecuencia, altera el patrón de fusión nucleolar, el número de nucleolos o la síntesis de rRNA.
4. Evaluar si el exceso de dosis génica produce cambios en el número o función de los CB.

**Estudio II. Análisis de las alteraciones celulares asociadas al incremento de estrés oxidativo sobre sistemas fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis de las CG del hipocampo del ratón TS.**

Los objetivos específicos del segundo estudio eran:

1. Profundizar en el estado oxidativo y mitocondrial del hipocampo y de esta población neuronal.
2. Analizar los efectos del estrés oxidativo sobre el daño en el DNA.
3. Evaluar las alteraciones asociadas al estrés oxidativo sobre el sistema ubiquitín proteasoma (UPS).
4. Evaluar las anomalías asociadas al estrés oxidativo sobre el fenotipo y organización lisosomal.



## **4. Material y Métodos**

---



#### **4.1. Animales de experimentación**

El modelo animal utilizado en el presente trabajo de Tesis Doctoral es el ratón trisómico Ts65Dn (TS), un modelo murino de síndrome de Down que presenta una triplicación parcial del cromosoma Mmu16.

Los animales se criaron y mantuvieron en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Universidad de Cantabria. Se estabularon en grupos de dos o tres animales en jaulas transparentes de Plexiglás (20 x 22 x 20 cm) en condiciones estándar de laboratorio a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y acceso a comida y agua *ad libitum*.

Los protocolos de mantenimiento, manejo y sacrificio realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria y llevados a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas (86/609/EEC del 24 de noviembre de 1986).

##### **4.1.1. Obtención del modelo animal**

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratones de 6 meses de edad, tanto machos como hembras, del modelo Ts65Dn que fueron comparados con sus hermanos euploides (CO). Los animales fueron obtenidos a partir de cruces de hembras TS reproductoras suministradas por The Robertsonian Chromosome Resources (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) con machos híbridos C57BL/6Ei-C3H/HeSNJ (B6EiC3Sn) F<sub>1</sub>.

##### **4.1.2. Cariotipado de los animales**

Dado que los ratones CO y TS no son distinguibles por su aspecto externo, es necesario identificar el cariotipo de los animales de experimentación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR, del inglés "*Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*").

La extracción de DNA genómico (gDNA) se realizó a partir de la digestión de aproximadamente 1-2 mm de la cola de cada ratón obtenidas en el día del destete (día 21 postnatal). La muestra se recogió en un tubo eppendorf de 1.5 ml en el que se añadieron 300 µl de NaOH 50mM y se incubaron durante 30 minutos a 98 °C en un bloque seco Tembloc (JP Selecta, Barcelona, España). A continuación, las muestras se agitaron en vórtex y se volvieron a incubar durante 30 minutos a 98 °C hasta conseguir una digestión completa. Una vez terminada la digestión, se añadieron 30 µl de Tris 1M (pH=8) para neutralizar la reacción. Seguidamente,

las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 13,000 r.p.m. (revoluciones por minuto) en una centrífuga Biofuge Fresco (Heraeus Instruments, Hanau, Alemania) y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Finalmente, se cuantificó el ADN en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermoscientific, Waltham, Massachusetts, USA) a una longitud de onda de 260 ( $\lambda_{260}$ ) y se diluyeron las muestras en agua Milli-Q® (Sigma) hasta una concentración de 20 ng/ $\mu$ l.

Para poder identificar la presencia de la trisomía se utilizaron como marcadores los genes codificantes para la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide (*App*) y de resistencia a Mixovirus (*Mx1*), situados cerca de los extremos proximal y distal, respectivamente, del segmento triplicado del cromosoma Mmu16. Para normalizar las cantidades de gDNA se utilizó el gen de la apolipoproteína B (*ApoB*) que está situado en el cromosoma murino Mmu12 y, por tanto, se encuentra presente en doble dosis. La amplificación del gDNA se llevó a cabo utilizando *primers* sentido y antisentido y sondas de tipo Taqman específicos para cada gen de interés (Tabla 1).

**Tabla 1.** *Primers* y sondas utilizadas para el cariotipado de animales.

	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sonda (5'-3')
<i>App</i>	TGGTGAAGATGTGGGTTCC GA	GACATTCACGGTTGCTATGA CAA	FAM- CAAAGGCGCCATCATCG GACTCA-TAMRA
<i>Mx1</i>	TCTCCGATTAACCAGGCT AGCTAT	GACATAAGGTTAGCAGCTAA AGGATCA	FAM- CTTTCCTGGTCGCTGTGC A-TAMRA
<i>ApoB</i>	CACGTGGGCTCCAGCATT	TCACCAGTCATTTCTGCCTT TG	HEX- CCATGGTCCGGCACTGC TCAA-TAMRA

La cuantificación del número de copias de los genes de interés se realizó en cada muestra de manera simultánea por lo que las sondas contenían fluorocromos con longitud de onda máxima de excitación y emisión diferentes: FAM para *App* y *Mx1* y HEX para *ApoB*. Para comparar cada par de genes se utilizó la siguiente preparación: 8  $\mu$ l de gDNA diluido a 20 ng/ $\mu$ l (160 ng/pocillo), 10  $\mu$ l de 2x Taqman Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 0.2  $\mu$ l de cada *primer* del gen problema a una concentración de 40  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ l de cada *primer* del gen control a una concentración de 40  $\mu$ M (Metabion, Martinsried, Alemania) y 0.6  $\mu$ l de cada sonda a una concentración de 5  $\mu$ M (Applied Biosystems).

Las qPCRs se realizaron en un termociclador Mx3000 (Stratagene, California, USA) utilizando placas de 96 pocillos (Teknovas, Derio, Vizcaya, España) y película adhesiva óptica MicroAmp (Applied Biosystems). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

Temperatura	Duración	Repeticiones
50 °C	2 minutos	1X
95 °C	10 minutos	1X
95 °C	15 segundos	40X
60 °C	1 minuto	

Los resultados obtenidos con el programa MxPro-3005P se analizaron mediante el método Livak o método  $\Delta\Delta Ct$  (Livak y Schmittgen, 2001). Los resultados obtenidos representan la relación de los genes problema respecto al control. Los valores similares a 1 indican que el animal es CO, mientras que los valores de 1.5 indica que se trata de un ratón TS. Cada uno de los valores se evaluó por duplicado en la misma placa y en dos experimentos independientes.

#### 4.1.3. Obtención y procesamiento del tejido biológico

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han utilizado muestras del hipocampo de ratones TS que se han comparado con sus hermanos euploides a los 6 meses de edad. Para ello, se han utilizado técnicas de Biología Celular y Molecular que han permitido evaluar posibles alteraciones nucleares y citoplasmáticas en las células del hipocampo del ratón TS. Además, también se han utilizado técnicas de Biología Celular que permitieron analizar de manera aislada las células granulares (CG) del hipocampo de estos ratones. En este caso, los animales fueron anestesiados y perfundidos con diferentes soluciones fijadoras. Mientras que en las técnicas de Biología Molecular se utilizaron lisados hipocampales totales y los animales fueron anestesiados y sacrificados mediante decapitación para la extracción en fresco del tejido.

## 4.2. Técnicas de Biología Celular

### 4.2.1. Perfusión de los animales

Para poder analizar las CGs del giro dentado se emplearon diferentes técnicas de Biología Celular. Dependiendo de la técnica concreta que se fuera a utilizar, los animales fueron perfundidos con diferentes soluciones fijadoras con el fin de preservar correctamente las estructuras celulares. En primer lugar, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (20 mg/ml), diluido en etanol (10 %) y propilenglicol (20 %) a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal. Los tejidos fueron fijados por perfusión intracardiaca siguiendo el siguiente protocolo: una vez comprobado que el animal no respondía al dolor, se realizó una incisión en el tramo abdominal, posteriormente se seccionó el diafragma y se levantó el peto costal, dejando al descubierto el corazón. Se introdujo una aguja de calibre 25G en el vértice del ventrículo izquierdo por donde se introdujo la solución fijadora y, a

continuación, se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de dicha solución.

Para realizar este procedimiento se utilizó una bomba ISMATEC ISM 829 (IDEX Health & Science) a un flujo constante de 5 ml/minuto y se bombeó el doble de volumen en ml que el peso en gramos del ratón. Una vez finalizada la perfusión, el animal fue decapitado y se procedió a la extracción del cerebro.

#### **4.2.2. Obtención de disociados neuronales**

La técnica de *squash* o disociado celular se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Lafarga et al. (1991). De esta manera, es posible conservar los somas neuronales completos para realizar estudios de distribución y cuantificación de diferentes estructuras intracelulares, tanto nucleares como citoplasmáticas. En el presente trabajo, se utilizaron los disociados de CG hipocampales para el estudio de inmunofluorescencia, el ensayo de transcripción *in situ* y la tinción argéntica de Ag-NORs.

Para llevar a cabo los disociados de CG del giro dentado el tejido fue fijado mediante perfusión con paraformaldehído (PFA) al 3.7 % en PBS (PBS 1X: 137mM NaCl; 2.7 KCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1.75 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4), siguiendo el protocolo de perfusión descrito en el apartado anterior. Posteriormente, se realizaron secciones coronales del cerebro de 200 µm de grosor en un vibratomo de deslizamiento (Leica VT1000S, Leica Instruments GmbH) que fueron recogidas en PBS y almacenadas a 4 °C hasta el momento de su uso.

A continuación, se realizó una microdissección del giro dentado del hipocampo bajo una lupa estereoscópica y se obtuvieron pequeños fragmentos que fueron depositados individualmente sobre un portaobjetos (Superfrost ®Plus, Menzel-Gläser, Alemania). Cada muestra se cubrió con 10 µl de PBS y sobre ella se colocó un cubreobjetos para después percutir el tejido con una aguja histológica y disociar las células. Para controlar el grado de disociación y preservación citológica se realizaron observaciones en el microscopio en contraste de fase. Para que las células quedaran adheridas al portaobjetos, las muestras se congelaron en nieve carbónica durante, al menos, 10 minutos. Posteriormente, con ayuda de una cuchilla, se retiró el cubreobjetos y se delimitó la zona donde se encontraba el tejido disociado con un lápiz de diamante. Por último, las muestras se sumergieron durante 4 minutos en etanol al 96 % y se almacenaron en PBS a 4 °C.

### 4.2.3. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Con el fin de detectar específicamente distintos antígenos se ha utilizado la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre *squashes* de CG del hipocampo. Las muestras de disociados celulares, que se encontraban almacenadas a 4 °C en PBS, se lavaron con PBS y se incubaron con glicina 0.1M durante 20 minutos para eliminar los grupos aldehído de la fijación. Tras ello, para permeabilizar las muestras se incubaron con PBS-Tritón X-100 0.5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación suave. Una vez permeabilizado, se realizaron varios lavados con PBS-Tween 20 (0.05 %) antes de proceder al marcaje por inmunofluorescencia indirecta. Posteriormente, se añadieron 8 µl del anticuerpo primario diluido en PBS con BSA al 1 % sobre la muestra y se incubaron en cámara húmeda durante 3 horas a temperatura ambiente o bien, toda la noche (o/n) a 4 °C. La relación de anticuerpos primarios utilizados en este trabajo se enumera en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Especie	Casa Comercial	Referencia	Dilución
Histona H4 acetilada H4	Conejo	Upstate	06-598	1:100
Catepsina D	Cabra	Santa Cruz	sc-6486	1:100
Coilina	Conejo		Bohmann et al.,1995	1:300
Nucleolina	Conejo	Abcam	ab22758	1:200
Histona H2AX fosforilada (Ser139)	Ratón	Millipore	05-636	1:100
PSMB5	Conejo	Invitrogen	PA1-977	1:50
TMG-cap	Ratón	Oncogene	NA02	1:100
Histona H4 trimetilada (Lys20)	Conejo	Upstate	07-463	1:100
Ubiquitina	Ratón	Santa Cruz	sc-8017	1:50

Tras la incubación del anticuerpo primario, las muestras se lavaron varias veces con PBS-Tween 20 (0.05 %) y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo de la siguiente manera: los anticuerpos conjugados con fluoresceína (FITC) o Texas Red (TxR) se prepararon a una dilución 1:75 en PBS y se incubaron 45 minutos en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente; mientras que aquellos conjugados con Cy3 se diluyeron 1:750 en PBS y se incubaron 30 minutos utilizando el mismo protocolo que los anteriores.

En aquellos casos en los que se realizó doble inmunomarcaje, la incubación de los anticuerpos primarios se efectuó por separado de manera secuencial y, posteriormente, se revelaron con anticuerpos secundarios conjugados con diferentes fluorocromos del mismo modo. Además, en algunos inmunomarcajes fue necesario realizar un contraste con yoduro de propidio

(IP), un intercalante de ácidos nucleicos que tiñe preferentemente el nucleolo y los grumos de Nissl. Esta solución se preparó a una dilución 1:2000 en PBS a partir de un stock de 1 mg/ml y se incubó sobre las muestras durante 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscura.

Finalmente, las preparaciones se montaron con el medio de montaje Vectashield con DAPI ® (Vector Laboratories, USA) y se sellaron con laca de uñas. Para el análisis de las muestras se utilizaron dos microscopios confocales: el microscopio confocal láser Zeiss LSM 510, provisto del láser argón (488) y HeNe (543) para excitar FITC y TxRed/Cy3 respectivamente, y el microscopio confocal NIKON A1R espectral, para aquellas preparaciones que, además, requerían el láser de 405nm para visualizar la tinción con DAPI.

#### **4.2.3.1. Análisis de imágenes de Inmunofluorecencia**

Para evaluar posibles alteraciones en estructuras celulares en las CG del hipocampo del ratón TS se llevaron a cabo distintos análisis cuantitativos, morfométricos y densitométricos. Todos los estudios se realizaron sobre imágenes panorámicas de disociados de CG del hipocampo y se cuantificó un mínimo de 100 CG del giro dentado en, al menos, 3 ratones de cada cariotipo. En el presente Trabajo de Tesis Doctoral se realizaron los siguientes análisis cuantitativos: i) evaluación del número de nucleolos por célula (Figura 18), ii) cuantificación del número de Cuerpos de Cajal (CBs) y del porcentaje de CG que contenían rosetas perinucleolares por célula (Figura 23), iii) análisis del número de focos de daño en el DNA por célula y del porcentaje de células que acumulan focos de daño (Figura 30), iv) cuantificación del número de clastosomas por célula (Figura 34), v) análisis del número de agregados de proteínas ubiquitinadas por célula (Figura 35) y vi) determinación del número de focos catepsina D positivos, marcador de lisosomas, por célula (Figura 36).

Además, se llevaron a cabo los siguientes análisis morfométricos y densitométricos mediante el software informático Image J (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>):

i) Para realizar el estudio morfométrico del área nuclear de las CG del hipocampo (Figura 11) se realizó una tinción con DAPI, un marcador citoquímico con gran afinidad por el DNA que permite observar la morfología del núcleo celular. Sobre imágenes panorámicas de CG se dibujó el perfil nuclear manualmente y se cuantificó el área seleccionada.

ii) Para evaluar el porcentaje de área nuclear ocupada por bloques de heterocromatina (marcados por el anticuerpo anti-Histona H4 trimetilada) (Figura 12) se siguieron los siguientes

pasos: en primer lugar, se realizó una cuantificación del área celular tal y como se indica en el punto anterior. Posteriormente, se aplicó un umbral a partir del cual se reconocían las zonas marcadas por la histona H4 trimetilada con el que se cuantificó el área ocupada por este marcador. Finalmente, se calculó el porcentaje de área ocupada por bloques de heterocromatina utilizando la siguiente fórmula:  $\text{área nuclear} / \text{área ocupada por histona H4 trimetilada} \times 100$ .

iii) El análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia de la histona H4 acetilada (Figura 15) se llevó a cabo rodeando manualmente el perímetro nuclear de las CG del hipocampo. Con el software Image J, se analizó el parámetro "*Raw integrated density*", que proporciona la suma de la intensidad de fluorescencia de cada píxel seleccionado.

#### **4.2.4. Ensayo de actividad transcripcional con 5'-fluorouridina**

Las zonas de actividad transcripcional activa se marcaron mediante la incorporación de 5'-fluorouridina (5'-FU) en el RNA naciente. La pauta de administración usada fue una dosis única de 10  $\mu\text{l/g}$  de una solución stock de 5'-FU (F5130, Sigma) preparada previamente a 0.4M en suero salino. Tras 45 minutos de exposición al compuesto, los animales fueron anestesiados y fijados mediante perfusión con paraformaldehído al 3.7 % y Tritón X 0.5 % en el buffer de disolución HPEM (HPEM 2x: 60mM Hepes, 130mM Pipes 20mM EGTA y 4mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Los cerebros fueron extraídos y post-fijados durante 1 hora a temperatura ambiente y después lavados en HPEM. Posteriormente, se realizaron los disociados neuronales tal y como se ha descrito previamente.

Para detectar los sitios de incorporación de 5'-FU se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-bromodeoxiuridina (anti-BrdU) (B84334 Clon BU-33, Sigma), que se incubó a 37 °C en una cámara húmeda durante una hora. Posteriormente, tras varios lavados con PBS-Tween-20 0.05 % las preparaciones se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (FITC) durante 45 minutos a temperatura ambiente en una cámara oscura y húmeda. Por último, las muestras se lavaron varias veces con PBS, se montaron con Vectashield® (Vector Laboratories) y se sellaron con laca de uñas para ser examinadas con un microscopio confocal láser Zeiss LSM 510.

El análisis de intensidad de fluorescencia de la 5'-FU se llevó a cabo con el Software Image J. Para ello, se rodeó el perímetro de cada célula manualmente y se cuantificó el parámetro "*Raw integrated density*". En este experimento se utilizaron 3 animales de cada cariotipo y se analizaron, al menos, 100 CG de cada uno de ellos.

#### 4.2.5. Tinción de plata para la detección de Ag-NORs

Para detectar las regiones organizadoras de nucleolos (NOR, del inglés *Nucleolar Organizer Regions*) se utilizó una tinción de plata descrita por Zatssepina (2019). Inmediatamente antes de iniciar el protocolo de tinción se prepararon las siguientes soluciones: una solución de  $\text{AgNO}_3$  al 50 % en agua destilada y una solución de gelatina al 2 % en agua destilada con ácido fórmico al 1 %.

Sobre las preparaciones de disociados neuronales se realizaron dos lavados de 5 minutos con agua destilada y, posteriormente, se incubaron con una mezcla de solución de  $\text{AgNO}_3$  y gelatina en una proporción 2:1, respectivamente, durante 15 minutos a 37 °C en cámara húmeda. A continuación, se lavaron las preparaciones varias veces en agua destilada en un coplin de vidrio y se montaron con Vectashield ®.

Finalmente, las muestras fueron examinadas en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop 2 Plus con un objetivo 100x. La tinción reveló dos tipos de estructuras: unos cuerpos argirófilos grandes que contienen varios Ag-NORs que han fusionado un nucleolo y otros cuerpos más pequeños que corresponden con Ag-NORs que no han fusionado nucleolos. Se realizó la cuantificación de los dos tipos de cuerpos argirófilos por separado en 3 ratones de cada cariotipo en un mínimo de 100 CGs por ratón (Figura 19).

#### 4.2.6. Detección de lípidos

Para llevar a cabo la tinción de lípidos peroxidados y de gotas lipídicas se realizó el mismo protocolo de fijación del tejido que para la inmunofluorescencia (3.7 % de PFA en PBS). Sin embargo, durante el procesamiento de los disociados de CG no se realizó la estabilización de las muestras en etanol de 96 % sino que estas preparaciones fueron secadas al aire en los portaobjetos. Una vez secos, los disociados neuronales se almacenaron en PBS.

##### Tinción de lípidos peroxidados

Para la detección de lípidos peroxidados se utilizó el Bodipy C11 581/591 (Molecular Probes) a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se depositaron 8  $\mu\text{l}$  de este reactivo sobre el disociado neuronal y se incubó durante 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron varios lavados en PBS y se montaron las preparaciones con Vectashield ® con DAPI. Inmediatamente se procedió a digitalizar las imágenes de las preparaciones.

Para cuantificar la peroxidación lipídica, se realizó un análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia del marcador Bodipy C11 en el citoplasma celular (Figura 27). Para ello, se evaluaron 3 áreas de igual tamaño por cada CG, excluyendo los focos Bodipy C11 positivos que corresponden con membranas de organelas con niveles altos de peroxidación. Se

analizó con el software Image J la suma integrada de los valores de intensidad en cada píxel del área seleccionada (*Raw integrated density*). Además, para cuantificar organelas con altos niveles de peroxidación lipídica, se analizó el número de focos citoplasmáticos Bodipy C11 positivos por CG del giro dentado (Figura 27).

#### **Tinción de gotas lipídicas**

La detección de gotas lipídicas se realizó mediante la incubación de las muestras con Bodipy 493/503 a una concentración final de 5µM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se lavaron en PBS, se montaron con Vectashield ® con DAPI y se digitalizaron inmediatamente.

#### **Evaluación de Lipofuscina**

La evaluación de la presencia de lipofuscina en las CG se realizó sobre disociados celulares procesados según el protocolo estándar descrito en el apartado 3.2.2. A continuación, dado que la lipofuscina es un pigmento autofluorescente, los *squashes* se montaron directamente con Vectashield ® con DAPI y se digitalizaron las imágenes mediante la excitación con un láser de argón (488) en un microscopio confocal LSM510.

### **4.3. Técnicas de Microscopía Electrónica**

#### **4.3.1. Inclusión en Araldita**

Para la realización del estudio de microscopía electrónica de transmisión (MET) se siguió el protocolo descrito por Palay y Chan Palay (1976). En primer lugar, los animales fueron perfundidos con glutaraldehído al 3 % en tampón fosfato (TF) 0.12M (TF: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 70mM; pH 7.4) utilizando una bomba de perfusión durante 10 minutos. Tras esta fijación, se extrajeron los cerebros, se post-fijaron con la misma solución de perfusión durante una hora a temperatura ambiente y se realizaron varios lavados en TF.

Posteriormente, se realizaron secciones coronales del cerebro de 300 µm de grosor y se microdisecionaron fragmentos de 1-2 mm<sup>3</sup> del giro dentado del hipocampo utilizando un vibratomo de deslizamiento. A continuación, el tejido se post-fijó con tetróxido de osmio al 2 % en una solución tampón (glucosa 14 %, CaCl<sub>2</sub> 0.025 % en TF 0.28M) durante 3 horas a temperatura ambiente en agitación suave y protegido de la luz y se lavó varias veces en solución de lavado (ácido maleico 80mM, NaOH 7.5mM; pH 4.5). Posteriormente, las piezas se contrastaron con una solución que contenía acetato de uranilo al 2 % en solución de lavado durante 90 minutos a 4 °C en oscuridad y se realizaron dos lavados de 15 minutos.

A continuación, se procedió a la deshidratación de las muestras siguiendo los siguientes pasos:

Solución	Duración	Repeticiones
Acetona 30 %	10 minutos	1X
Acetona 50 %	10 minutos	
Acetona 70 %	10 minutos	
Acetona 80 %	15 minutos	
Acetona 90 %	15 minutos	4x
Acetona anhidra	30 minutos	4x

Finalmente, las piezas de tejido se incluyeron en Araldita (Durcapan, Fluka, Suiza) siguiendo las especificaciones del fabricante (ACM, Fluka AG, Suiza) y se dejaron polimerizar durante 3 días a 60 °C. Una vez que los bloques de araldita estaban completamente polimerizados, se realizaron cortes de semifinos de 1 µm, que se tiñeron con azul de toluidina al 1 % para evaluar la correcta preservación del tejido y seleccionar los bloques más adecuados para realizar la ultramicrotomía. En estos bloques, se realizaron cortes ultrafinos de 50 nm de grosor, se montaron en rejillas de cobre recubiertas con una película de Formvar (Sigma-Aldrich) y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo siguiendo el protocolo descrito por Reynolds (1963). Por último, las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión convencional JEOL – modelo JEM 1011 y las imágenes se registraron con una cámara digital Gatan de alta resolución (Peabody, USA).

#### 4.3.2. Inmunocitoquímica ultraestructural

La detección de antígenos específicos a nivel ultraestructural se llevó a cabo mediante técnicas de inmunocitoquímica en cortes ultrafinos. Para ello, los ratones fueron perfundidos con PFA 3.7 % en tampón cacodilato 0.1M pH 7.4 durante 20 minutos. A continuación, se extrajeron los cerebros, se post-fijaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la misma solución fijadora y se realizaron 3 lavados de 15 minutos con la solución de lavado de cacodilato 0.1M pH 7.4. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 300 µm en un vibratomo de deslizamiento y se realizó una microdisección del giro dentado del hipocampo, obteniéndose secciones de unos 1-2 mm<sup>3</sup> del tejido. Estas secciones se incubaron con una solución de tampón cacodilato 0.1M pH 7.4 que contenía 50mM de NH<sub>4</sub>Cl durante 50 minutos a 4 °C y se lavaron la solución de lavado.

El tejido fue deshidratado mediante concentraciones crecientes de metanol e incluido en Lowicryl siguiendo el siguiente procedimiento:

Solución	Duración	Temperatura
Metanol 30 %	5 minutos	4 °C
Metanol 50 %	5 minutos	
Metanol 70 %	5 minutos	
Metanol 90 %	30 minutos	-20 °C
Metanol 90 %: Lowicryl (1:1)	60 minutos	
Metanol 90 %: Lowicryl (1:2)	60 minutos	
Lowicryl puro	60 minutos	
Lowicryl puro	o/n	

Una vez que estaban totalmente embebidas el Lowicryl, las secciones de tejido se introdujeron en cápsulas de gelatina transparente (Gelatin capsule, size 2; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) evitando el contacto con el aire. La polimerización se llevó a cabo mediante exposición a luz ultravioleta (366nm) con una lámpara Phillips T16/05 situada a 30 cm de las cápsulas durante 5-7 días a -20 °C seguida de 2-3 días a temperatura ambiente. Los bloques de tejido incluidos en Lowicryl se cortaron con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, San Marcos, USA) y las secciones ultrafinas se recogieron sobre rejillas de níquel cubiertas de Formvar.

A continuación, se realizó el protocolo de inmunocitoquímica siguiendo el siguiente procedimiento. En primer lugar, las secciones de tejido se incubaron con PBS-glicina 0.1M durante 15 minutos y, seguidamente, con el anticuerpo primario anti-coilina (Bohmann et al., 1995) diluido 1:30 en PBS-BSA 1 % durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras varios lavados con PBS, las muestras se incubaron con un anticuerpo secundario que tiene conjugadas partículas de oro coloidal de 10 nm de diámetro (BioCell, UK) a una concentración de 1:50 en PBS-BSA 1 % durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las rejillas se lavaron con agua destilada, se dejaron secar al aire y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo siguiendo el protocolo de Reynolds (1963). Como control negativo algunas rejillas fueron procesadas siguiendo el mismo protocolo en ausencia de la incubación del anticuerpo primario.

La obtención de las imágenes se llevó a cabo en un microscopio electrónico de transmisión convencional JEOL - modelo JEM 1011 y las imágenes se registraron con una cámara digital Gatan de alta resolución.

## 4.4. Técnicas de Biología Molecular

### 4.4.1. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Para analizar los niveles de expresión de los transcritos producidos por los diferentes genes de interés se utilizó la técnica de RT-qPCR. Para cada gen, se comprobó la especificidad de la RT-qPCR mediante el análisis de la curva de disociación. Esta curva representa la derivada de la medida de fluorescencia con respecto al aumento de la temperatura. La aparición de más de un pico indica la presencia de más de un producto de amplificación. Por el contrario, un solo pico verifica la presencia de un solo producto y, por tanto, la especificidad de la reacción.

#### 4.4.1.1. Extracción del RNA total

Los animales fueron decapitados bajo anestesia con pentobarbital a una dosis de 50 mg por kilo del animal. Posteriormente, se extrajeron los cerebros rápidamente y se diseccionaron los hipocampos sobre hielo e inmediatamente se congelaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento para la extracción de RNA. Las muestras de tejido fueron homogeneizadas utilizando un politrón (OMNI International TH). La extracción de RNA total se realizó siguiendo el protocolo de RNeasy Plus Mini Kit (Cat. N° 74134, Qiagen, Hilden, Germany). Después, la concentración de RNA de las muestras se cuantificó en un espectrofotómetro (Nanodrop 1000V 3.6, Thermo). Además, se midió la pureza de las muestras analizando la relación de absorbancia 260/280 nm que hace referencia a la presencia de proteínas. En todos los casos, las muestras que presentaban un valor superior o igual a 1.8. Finalmente, se igualaron las concentraciones de RNA total a 100 ng/μl diluyendo en H<sub>2</sub>O libre de RNAasas.

#### 4.4.1.2. Retrotranscripción

Para sintetizar los fragmentos del DNA copia (cDNA) a partir de la purificación de RNA total se siguió el protocolo descrito en el kit de síntesis de cDNA Revert Aid H Minus Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo). Para cada muestra se preparó la siguiente reacción en un volumen total de 20 μl: 100 ng de muestra de RNA, 1 μl de hexámeros de nucleótidos (*random primers*) a 0.2 μg/μl, 2 μl de dNTPs a 10mM, 4 μl de buffer de reacción 4x, 1 μl del inhibidor de ribonucleasa (RiboLock RNase Inhibitor 20 U/μl) y la encima transcriptasa inversa (RevertAid H Minus-MuLV Reverse Transcriptase 200 U/μl). La reacción se realizó en un termociclador My Cycler™ (BioRad) utilizando un protocolo que consistió en una incubación de 10 minutos a 25 °C para el anillamiento de los cebadores, seguido de 60 minutos a 42 °C para la extensión de las cadenas y 10 min a 70 °C para la inactivación del cDNA. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su uso.

#### 4.4.1.3. Diseño de oligonucleótidos

El diseño *primers* se realizó con el software informático Primer – BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se consideraron adecuados los oligonucleótidos cuya longitud se encontrase entre 18 y 22 nucleótidos, que tuvieran un porcentaje aproximado de pares de citosina y guanina (C+G) del 60 % y contuvieran, al menos, un par de G+C en las últimas 5 bases. Además, el producto de la amplificación debía contener entre 70 y 200 pares de bases y evitar que la composición de la pareja de *primers* formase estructuras secundarias que interfiriesen con la eficiencia de la técnica. Una vez seleccionados los oligonucleótidos, se comprobó la especificidad del amplicón (fragmento de ADN amplificado por la qPCR). Para ello, se utilizó la herramienta nBLAST (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool, NCBI*), que permite analizar los productos de la qPCR y comprobar que el producto corresponde únicamente al gen de interés y no a otras secuencias. Los cebadores utilizados para el análisis de la expresión de los diferentes genes de interés se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Secuencias de *primers* utilizados en la técnica RT-qPCR.

Nombre	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
<i>18S pre-rRNA</i>	CGCGCTTCCTACCTGGTTG	GGAGAGGAGCGAGCGACC
<i>18S rRNA</i>	GATGGTAGTCGCCGTGCC	CCAAGGAAGGCAGCAGGC
<i>28S pre-rRNA</i>	CCTCCTCGCTCTCTTCTTCC	CCTGTTCACTCGCCGTTACT
<i>28S rRNA</i>	GTGACGCGCATGAATGGA	TGTGGTTTCGCTGGATAGTAGGT
<i>45S rRNA</i>	GAACGGTGGTGTGTCGTT	GCGTCTCGTCTCGTCTCACT
<i>Coilin</i>	CCGAGGTGGTGAATACGCT	AGGCCAGAGGTCAGATCCAGA
<i>Fbn1</i>	TCTGTTCCCTGGAGAGTCTG	GGGTTCCAGGCTCTGTACTC
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>H1f0</i>	CGCCGACTCCCAGATCAAGT	GACCTTTTGGGCTCATCGCC
<i>H2AX</i>	TCCTGCCACACTCCAGG	TCAGTACTCCTGAGAGGCCTGC
<i>H2AX 3'-end</i>	TCCCCACACCTCCACAAAG	GGAAAGAGAAAGGATGGGGGACG
<i>Mecp-2</i>	GTGAAGGAGTCTTCCATACGGTC	TCTCCTTGCTTTTACGCC
<i>Ncl</i>	ATTGGGGAGGGAAGGGAAGT	TCAGCACTTCGAGTTGAAGCA
<i>Nfe2l2</i>	CCGCTACACCGACTACGATT	TGTTTCCTGTTCTGTTCCCG
<i>Npm</i>	TCGGCTGTGAACTAAAGGCT	GCCCCTGCTCCTAAACTGAC
<i>Pink1</i>	CGACAACATCCTTGTGGAGTGG	CATTGCCACCACGCTCTACACT
<i>Prkn</i>	CCAGAGGAAAGTCACCTGCGAA	GTTTCGAGCAGTGAGTCGCAATC
<i>Ubft</i>	CCGCGCAGCATACAAAGAAT	GTGGTCCGGCTAGACTTGG

#### 4.4.1.4. PCR cuantitativa a tiempo real

Para medir la expresión de los transcritos se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real mediante un juego de dos *primers* que flanquean la región de interés. Para llevar a cabo este ensayo se utilizó la mezcla maestra SYBR™ Select Master Mix (Thermo) que contiene tampón, dNTPs, DNA polimerasa y el fluorocromo SYBR Green. Este reactivo interacciona con la estructura secundaria de la doble hélice del DNA y se acopla energéticamente, aumentando su tasa de emisión fluorescente. Por lo tanto, a mayor cantidad de DNA de doble cadena, mayor intensidad de fluorescencia. A medida que se suceden los ciclos de amplificación, el termociclador recoge la señal fluorescente emitida para poder comparar la cantidad de cDNA entre las diferentes muestras.

Para realizar la RT-qPCR a cada reacción se añadió: 10 µl de SYBR™ Select Master Mix, 9 µl de stock (compuesto por 8.2 µl de agua Milli-Q y 0.4 µl de cada primer, sentido y antisentido, de una dilución a 10 µM) y 1 µl de cDNA. La RT-qPCR se llevó a cabo en un termociclador CFX Connect™ (BioRad) con las siguientes condiciones:

Etapa	Temperatura	Duración	Repeticiones
Desnaturalización	95 °C	10 minutos	1X
Anillamiento	95 °C	30 segundos	40X
	60 °C	1 minuto	
	72 °C	30 segundos	
Curva de disociación	65 °C (+ 0.5 °C)	5 segundos	1X
	hasta 95 °C		

#### 4.4.1.5. Cuantificación y análisis de la expresión génica relativa

El sistema de cuantificación de la RT-qPCR se basa en el umbral de ciclos ( $C_T$ , por sus siglas en inglés *Cycle Threshold*). En los primeros ciclos de la RT-qPCR no se registran apenas variaciones en la intensidad de fluorescencia, lo que sirve para determinar una línea base. Posteriormente, cuando comienzan a generarse los amplicones, se produce un aumento exponencial de la intensidad de fluorescencia que corta esta línea base. Este punto de intersección es el  $C_T$  y establece el número de ciclo fraccional en que la fluorescencia supera el umbral establecido. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de cDNA de la muestra. Es decir, el número de ciclos necesarios para alcanzar el  $C_T$  será menor cuanto mayor sea la cantidad de cDNA de la muestra. Los resultados fueron analizados con el Software Bio-Rad CFX Maestro 1.1.

El método de cuantificación relativa empleado en este trabajo permite analizar cambios en la expresión génica en una muestra (TS) en comparación con otra de referencia (CO). Además, los genes problema se normalizaron frente a un gen de referencia control o *housekeeping*, el gen de la *Gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). El nivel de expresión relativo se calculó usando la ecuación  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  (Livak y Schmittgen, 2001) y se llevó a cabo de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \Delta C_T &= C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T \text{ condición problema} - \Delta C_T \text{ condición control} \\ 2^{-(\Delta\Delta CT)} &= \text{Cambio relativo de expresión} \end{aligned}$$

En el presente trabajo se compararon los niveles de expresión de los diferentes genes de interés en al menos 5 ratones CO y TS de 6 meses de edad ( $n \geq 5$ ) en lisados totales de hipocampo.

#### 4.4.2. Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot (WB)

Para detectar y comparar la expresión proteínas específicas entre ratones CO y TS se utilizó la técnica de Western Blot (WB) siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

##### 4.4.2.1. Preparación de los lisados hipocampales

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y sacrificados mediante decapitación. Inmediatamente, sobre una base de hielo, se extrajeron los cerebros y se aisló el hipocampo, que fue rápidamente congelado y almacenado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento.

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas con un politrón en 200  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH 7.5; EDTA 1mM, SDS 2.5 %, 0.3 % (v/v) de inhibidor de proteasas (P8340, Sigma) y 1 % (v/v) de inhibidor de fosfatasa (P0044, Sigma)), se sonicaron durante 5 ciclos de 30 segundos ON/OFF en un baño frío con ultrasonidos (Bioruptor Plus, Diagenode, Seraing, Bélgica) y se dejaron reposar en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 13,000 r.p.m. durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante en un eppendorf frío. En este momento, las concentraciones de proteína se analizaron siguiendo el método de Lowry et al. (1951).

#### 4.4.2.2. Electroforesis de proteínas

Con el fin de igualar la concentración de proteína de las muestras a analizar, se mezclaron concentraciones idénticas de cada lisado con el buffer de carga Laemmli Sample Buffer 2x (Biorad) con  $\beta$ -mercaptoetanol 5 % y se completaron con PBS-SDS 1 % para obtener una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 minutos, se centrifugaron a 3,000 r.p.m. durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante.

Las proteínas se separaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS con sistemas de tampón discontinuo. La primera parte contiene el gel de concentración en el que se encuentran los pocillos y actúa como concentrador de la muestra, mientras que la segunda zona corresponde con la parte separadora y actúa de tamiz. En este trabajo, se han utilizado geles de separación con un porcentaje de acrilamida del 15 %, adecuado para la separación de proteínas de bajo peso molecular. En la siguiente tabla se detalla la composición para preparar dos geles al 15 % de acrilamida:

Componentes	Gel de separación (15%)	Gel de concentración
H <sub>2</sub> O destilada	3.6 ml	1.562 ml
Acrilamida 40 %	3.75 ml	313 $\mu\text{l}$
Buffer de separación 4X *	2.5 ml	-
Buffer de concentración 4X **	-	625 $\mu\text{l}$
Persulfato amónico (APS)	150 $\mu\text{l}$	42 $\mu\text{l}$
TEMED	7.5 $\mu\text{l}$	7.5 $\mu\text{l}$

\*Buffer de separación 4X: Tris-HCl 1.15 M y SDS 0.4 %, pH 8.8

\*\* Buffer de concentración 4X: Tris-HCl 0.4 M y SDS 0.4 %, pH 6.8

En cada gel de electroforesis se utilizaron 30-50  $\mu\text{g}$  de proteína por pocillo, en función de la proteína específica a analizar, y se cargaron 5  $\mu\text{l}$  del marcador estándar de pesos moleculares (PageRuler™ Plus, Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo en un kit Mini-Protean II (BioRad) en tampón de migración (Tris-base 25mM, glicina 0.2M y SDS 0.1 %). Primero, se aplicó una corriente continua de 100 V durante 15 minutos y, a continuación, se incrementó a 160 V durante 1 hora.

#### 4.4.2.3. Electrotransferencia de proteínas

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF, Amersham, UK) previamente activada con metanol y lavada en agua. La transferencia se realizó en un Mini-ProteanII (BioRad) a 100V durante 90 minutos en tampón de

transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 %). Una vez terminada, la eficiencia de la transferencia se comprobó tiñendo las membranas con colorante rojo Ponceau-S (Sigma).

#### 4.4.2.4. Inmunoblotting

Una vez eliminado el exceso de colorante tras varios lavados en agua, se procedió al bloqueo de los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo a la membrana mediante la incubación con BSA 3 % en TBS-T (Tris-HCl 0.02 % pH 7.6, NaCl 0.15M, Tween-20 0.05 %) durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido en BSA 3 % en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y seguidamente a 4 °C o/n. La tabla de anticuerpos primarios utilizados en el WB se muestra en la Tabla 4:

**Tabla 4.** Relación de anticuerpos utilizados en la técnica Western Blot.

Anticuerpo	Especie	Casa Comercial	Referencia	Peso Molecular
Histona H4 trimetilada (Lys20)	Conejo	Upstate	07-463	10
Histona H2A ubiquitilada(Lys119)	Ratón	Millipore	05-678	25
Proteasoma 20S	Conejo	Enzo Life Sciences	PW8155	25-30
Proteasoma 19S (TBP-1)	Ratón	BioMol	PW8770	50
SOD1	Conejo	Enzo Life Sciences	ADI-SOD-100	19
GAPDH	Ratón	Santa Cruz	sc-32233	37
Cathepsin D	Cabra	Santa Cruz	sc-6486	33-52
Histona H4 acetilada	Conejo	Upstate	06-598	10

Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados de 10 minutos en TBS-T antes de la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, preparados a una dilución 1:10000 en PBS-BSA 3 %, durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. En este trabajo se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: IRDye ® 800CW Cabra anti-ratón IgG (926-322100), IRDye ® 680 LT Cabra anti-conejo IgG (926-68021) e IRDye ® 800CW Burro anti-cabra IgG (626-32214) (Li-Cor). Finalmente, tras 5 lavados de 10 minutos en TBS-T, la detección de la fluorescencia se realizó mediante el sistema Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor).

Para comparar la cantidad de proteína de los ratones TS respecto a los CO, se cuantificó la densidad óptica de cada banda mediante el software Image J. El análisis se llevó a cabo cuantificando el valor de la banda correspondiente a la proteína de interés y normalizando respecto a la proteína de referencia (GAPDH). Los resultados fueron expresados como porcentaje de variación respecto al valor medio de los CO dentro de cada gel. Cada experimento

cuenta con una  $n$  mínima de 6 animales de cada cariotipo y fue repetido en, al menos, 3 geles independientes.

#### **4.4.3. Ensayo de actividad quimotripsina del proteasoma**

Para evaluar la actividad de tipo quimotripsina del proteasoma en lisados hipocampales de ratones trisómicos y euploides se siguieron los protocolos descritos por Casafont et al. (2010) y Keller et al. (2000). Los animales fueron anestesiados y sacrificados por decapitación e, inmediatamente, se aislaron los hipocampos que fueron rápidamente congelados en hielo seco y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso. Las muestras fueron homogeneizadas con un politrón (OMNI International TH) en buffer de lisis (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mM EDTA, 4mM DTT, 2mM ATP, 20 % glicerol). A continuación, se sonicaron las muestras en hielo, se centrifugaron a 13,000 g durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se recogió el sobrenadante. La cuantificación de proteína total de cada muestra se realizó siguiendo el protocolo de Lowry et al. (1951). El ensayo de actividad del proteasoma se realizó en placas de 96 pocillos en la que se cargaron 25  $\mu\text{l}$  del lisado de proteínas a una concentración final de 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 25  $\mu\text{l}$  del buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.5mM EDTA, 40 $\mu\text{M}$  del sustrato fluorogénico de la quimotripsina N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7amido 4-methylcoumatin (Sigma, S-6510). Las muestras se incubaron durante 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y, seguidamente, se paró la reacción añadiendo agua destilada fría.

A continuación, se evaluó la actividad quimotripsina del proteasoma mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las muestras en un lector de placas Synergy HTX Biotek Multimode (Vermont, USA) ( $\lambda_{\text{excitation}}=355\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{emission}}=460\text{nm}$ ). Para comprobar que las variaciones en la intensidad de fluorescencia se debían a cambios en la actividad del proteasoma, como control negativo, las muestras se incubaron con el inhibidor de actividad del proteasoma MG132 (Sigma, C-2211) a una concentración final de 60  $\mu\text{M}$ . Cada una de las muestras se evaluó por triplicado y se emplearon 6 lisados hipocampales de cada grupo experimental.

#### **4.5. Análisis estadístico de los resultados**

En el presente Trabajo de Tesis Doctoral se han comparado los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas de Biología Celular y Molecular entre ratones trisómicos y sus hermanos euploides de 6 meses de edad. Para conocer si existían diferencias significativas entre los dos grupos se utilizó la  $t$  de Student usando el programa SPSS (versión 22.0 para Windows, Armonk, USA). El nivel de significación se estableció de la siguiente manera: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  y \*\*\* $p<0.001$ .

## **5. Resultados**

---

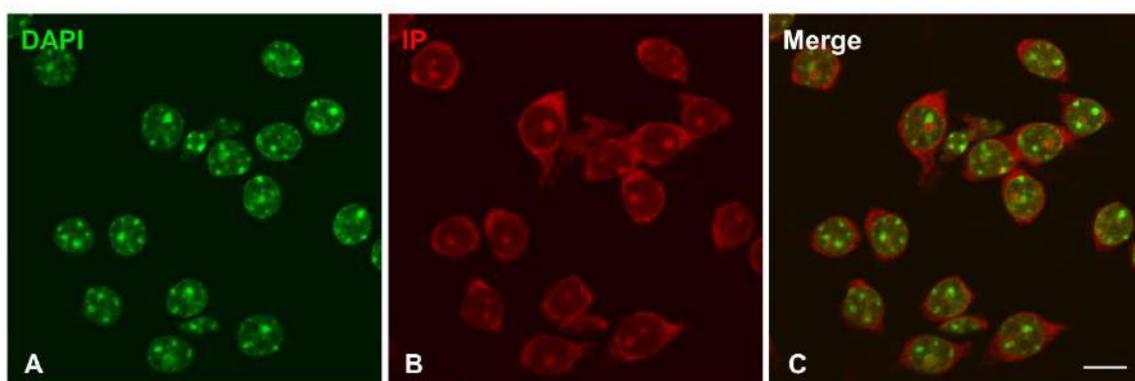


### 5.1. Alteraciones nucleares en las células granulares del hipocampo del ratón Ts65Dn debidas al exceso de dosis génica

Dado que el exceso de dosis génica presente en el ratón TS causa una reorganización tridimensional de los cromosomas dentro del núcleo celular, el primer objetivo del presente Trabajo de Tesis Doctoral consistió en evaluar posibles alteraciones en la arquitectura nuclear y en diferentes compartimentos nucleares esenciales para el correcto funcionamiento de las CG del hipocampo.

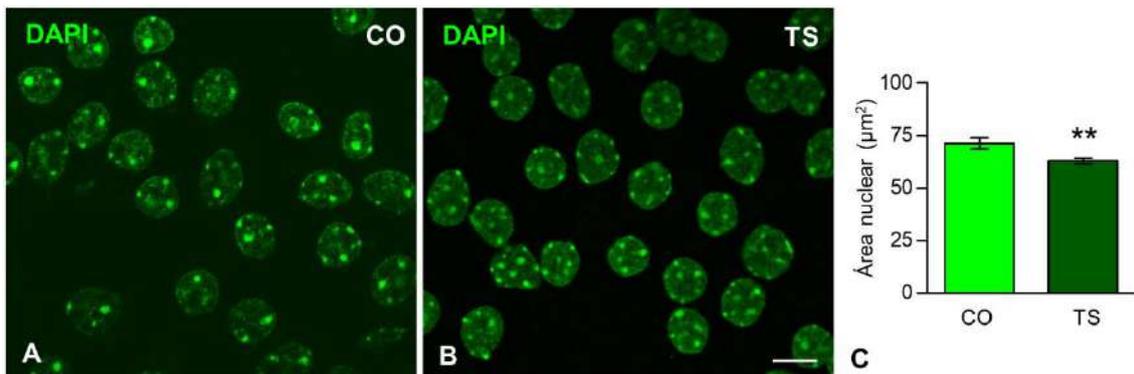
#### 5.1.1. Reducción del tamaño nuclear e incremento de heterocromatinización en las células granulares del hipocampo del ratón TS

En primer lugar, se compararon las características morfológicas de los núcleos de las CG del giro dentado de los ratones CO y el TS. Para llevar a cabo este estudio, se realizó una doble tinción con DAPI y ioduro de propidio (IP), dos marcadores citoquímicos para DNA y RNA, respectivamente, sobre disociados celulares de CG. Este procedimiento, también conocido como *squash*, permite conservar la estructura celular completa y, así, cuantificar con exactitud el número total de estructuras celulares objeto de análisis en cada neurona. En las imágenes (Figura 10) se puede apreciar una buena conservación de los somas neuronales tras realizar la disociación celular. Se utilizó la tinción con DAPI, un marcador con alta afinidad por el DNA, para observar la morfología del núcleo celular, así como los bloques de cromatina altamente compactada (Figura 10A). Además, el marcaje con IP permitió observar una fina zona citoplasmática alrededor de los núcleos de las CG que, al igual que los nucleolos, tienen un alto contenido en RNA (Figura 10B).



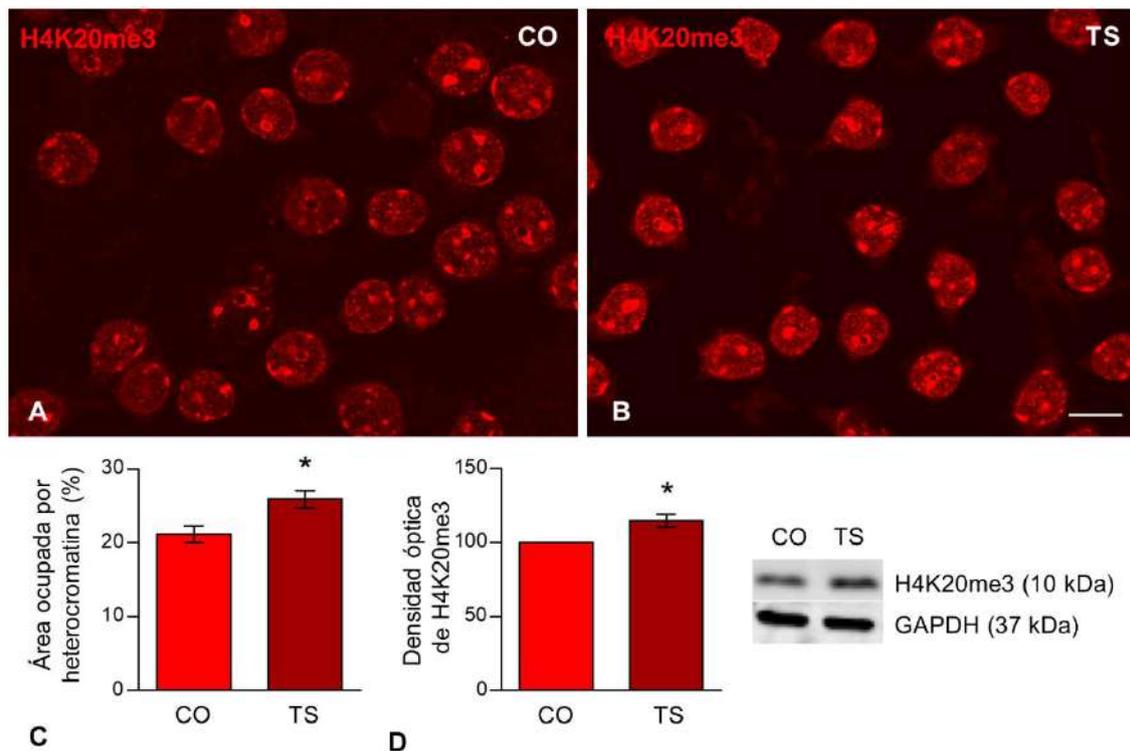
**Figura 10. A-C)** Imagen de un disociado de CG del giro dentado doblemente marcado con DAPI e IP. **A)** CG hipocámpales teñidas con el marcador de DNA DAPI, que muestra una buena conservación del núcleo celular. **B)** CG del hipocampo teñidas con el compuesto de alta afinidad por el RNA IP que se concentra en los nucleolos y el citoplasma celular. Nótese la buena conservación del pericarion tras la disociación de las CG del hipocampo. Escala: 10  $\mu$ m.

Con el fin de analizar si el exceso de dosis génica producía cambios en el tamaño de las CG del hipocampo del ratón TS, se realizó una tinción citoquímica con DAPI sobre los disociados celulares de ratones CO y TS. El análisis morfométrico de los núcleos celulares reveló una disminución significativa del área nuclear de las CG de los ratones trisómicos respecto a sus hermanos euploides (Figura 11C). Además, con esta tinción se puede apreciar que las células del ratón TS presentaban numerosos y grandes parches de heterocromatina altamente condensada, en relación a las del ratón CO (Figura 11B).



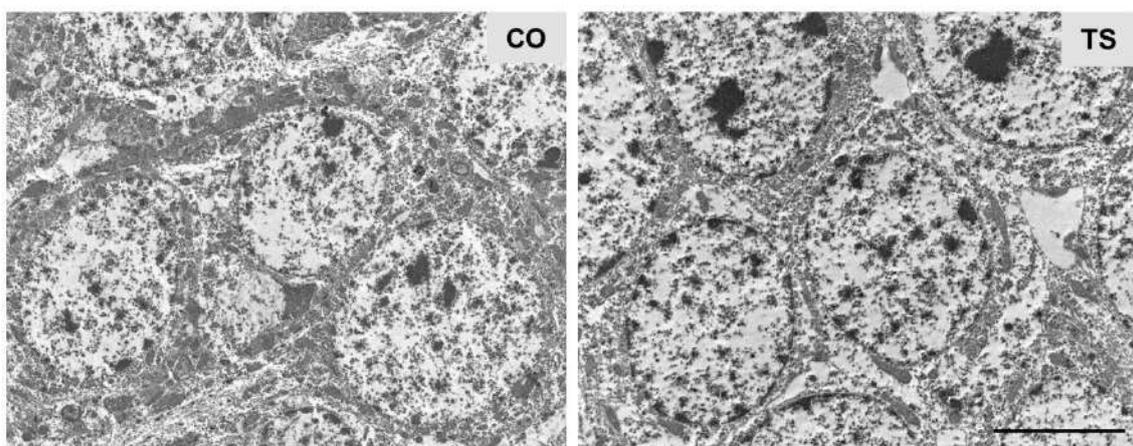
**Figura 11. Las CG del hipocampo del ratón TS presentan una disminución del tamaño nuclear. A)** Imagen representativa de un marcaje citoquímico con DAPI sobre un disociado celular de CG de un ratón CO. **B)** CG de un ratón TS que ilustran una disminución del tamaño nuclear, así como un incremento en el número y tamaño de parches de heterocromatina. **C)** Análisis morfométrico del área nuclear de las CG del hipocampo que demuestra una disminución significativa en dicha área en los animales TS de 6 meses de edad respecto a los CO. La gráfica representa la media  $\pm$  EEM. Escala: 10  $\mu$ m. \*\*  $p < 0.01$ .

A continuación, se evaluó si existían cambios en el patrón de heterocromatina. Para ello se realizó un inmunomarcaje de la histona H4 trimetilada en la lisina 20 (H4K20me3), un marcador de heterocromatina implicado en el silenciamiento génico y relacionado con el programa de senescencia celular. En los disociados de CG del ratón TS se puede apreciar un incremento de las regiones de heterocromatina respecto al CO (Figuras 12A-B). Además, teniendo en cuenta el menor tamaño del núcleo celular del ratón TS, se realizó un análisis morfométrico para cuantificar el porcentaje de área nuclear ocupada por regiones H4K20me3 positivas, que demostró que los ratones TS presentaban un aumento significativo en dicho marcaje respecto a los euploides (Figura 12C). Este incremento en el inmunomarcaje de H4K20me3 en los ratones trisómicos fue validado por Western blot en lisados hipocampales. Ambos resultados sugieren que el ratón TS presenta una sobreexpresión de esta histona trimetilada en comparación con los animales CO (Figura 12D).



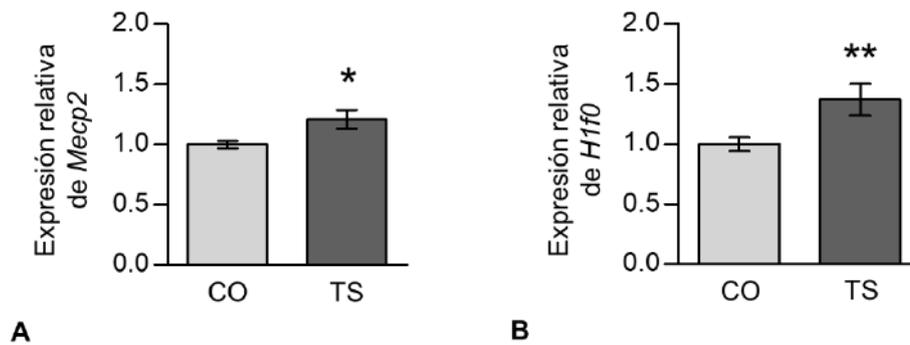
**Figura 12. Aumento en la heterocromatinización en las CG del hipocampo del ratón TS.** A-B) Inmunotinción de la H4K20me3 sobre disociados de CG del hipocampo en la que se aprecia un incremento en el área marcada por el anticuerpo H4K20me3 en el ratón TS respecto al CO. C) Análisis morfométrico del porcentaje de área ocupada por H4K20me3 que revela un incremento significativo de este marcaje en las CG del hipocampo de ratones TS respecto a los CO. D) WB de H4K20me3 en lisados proteicos de hipocampos de ratones CO y TS que demuestra un incremento en la expresión de este marcador en el hipocampo del ratón TS e imágenes representativas del WB. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM. Escala: 10  $\mu$ m. \* $p$ <0.05.

Además, el análisis de la capa granular del giro dentado, utilizando la técnica de microscopía electrónica convencional, confirmó la presencia de grandes masas de heterocromatina en el núcleo de las CG de los ratones trisómicos (Figura 13).



**Figura 13. A-B) Panorámica del giro dentado del hipocampo en la que se muestra el corte transversal de las CG de un ratón CO y un TS.** Nótese los prominentes parches de heterocromatina presentes en las CG del ratón TS. Escala: 5  $\mu$ m.

Una vez comprobado el incremento en la heterocromatinización en el núcleo de las CG del ratón TS, se procedió a analizar la expresión de *Mecp2* y *H1f0* en lisados hipocampales totales. Estos genes codifican para proteínas implicadas en el remodelado de la estructura de la cromatina, especialmente, de los dominios de heterocromatina y se encuentran estrechamente relacionados con el silenciamiento génico. *Mecp2* codifica para la proteína MECP2 (*methyl-CpG-binding protein*) que tiene gran afinidad por los islotes CpG metilados y, en consecuencia, inhibe la transcripción génica. Por otro lado, el gen *H1f0* codifica para la histona H1.0 (*H1.0 linker histone*) cuya interacción con el DNA sirve para promover un estado más compactado de la cromatina y transcripcionalmente inactivo. En ambos casos, los ratones TS mostraron un incremento en la expresión de estos genes en lisados de RNA hipocampales respecto a los mostrados por los ratones CO (Figura 14).

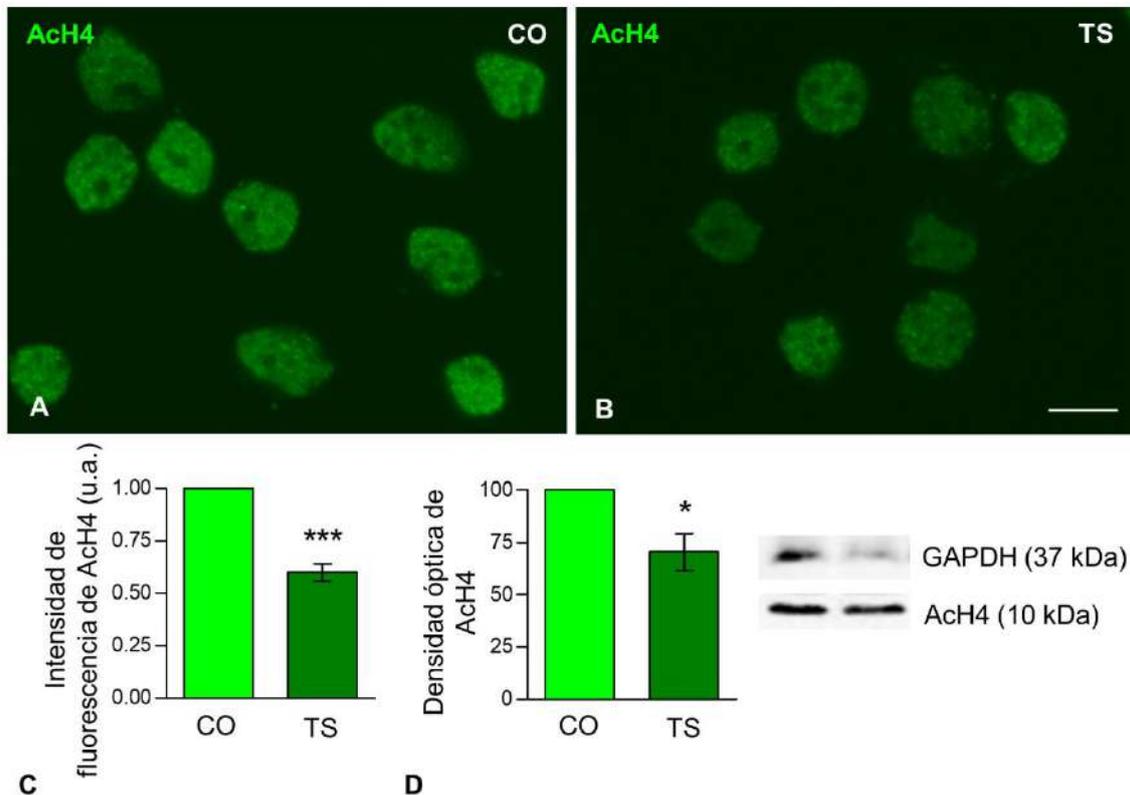


**Figura 14. Incremento en la expresión génica de *Mecp2* y *H1f0* en lisados hipocampales del ratón TS. A-B)** Análisis de RT-qPCR de *Mecp2* y *H1f0* en extractos de mRNA hipocampales de ratones CO y TS. Nótese un aumento significativo de la expresión de ambos marcadores de represión génica en el ratón TS. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### 5.1.2. La alteración en el patrón de cromatina de las CG del ratón TS induce un descenso en la transcripción global

Tras demostrar que existe un aumento en el porcentaje de heterocromatina en las CG del ratón TS, se procedió a evaluar si esta alteración estaba acompañada de cambios en la actividad transcripcional. Para ello, sobre disociados de CG se realizó una inmunotinción de la histona H4 acetilada (AcH4), un marcador de cromatina que se encuentra en conformación abierta y es transcripcionalmente activa. En la imagen (Figura 15A-B) se aprecia una distribución difusa de esta histona por el núcleo celular, dejando el nucleolo excluido. De manera general, se puede observar que las CG de los ratones CO se presentan un marcaje de mayor intensidad que las del TS. El análisis densitométrico de intensidad de fluorescencia de la histona AcH4, realizado con el software Image J, confirmó un descenso significativo de dicho marcaje en las CG del animal TS en comparación con el de sus hermanos euploides (Figura 15C). A continuación,

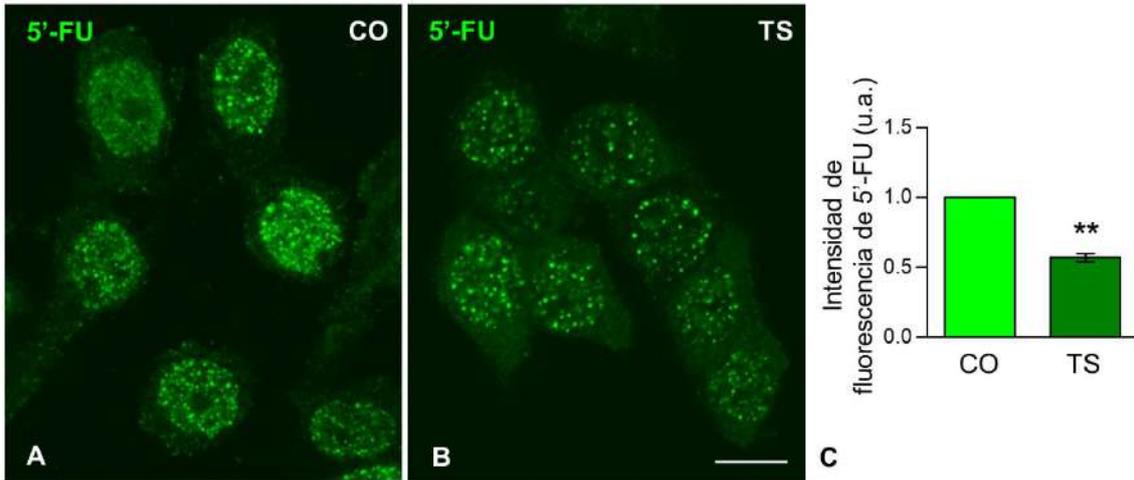
utilizando la técnica de Western blot en lisados hipocampales totales, se confirmó que el ratón TS presentaba menores niveles de la histona H4 que los ratones CO (Figura 15D).



**Figura 15. Las CG del ratón TS presentan una reducción en la expresión de AcH4. A-B)** Inmunomarcaje de histona H4 acetilada (AcH4) sobre disociados celulares de CG de un ratón CO y un TS que muestra la menor intensidad de fluorescencia del ratón TS respecto al CO. **C)** El análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia de la histona AcH4 sobre *squashes* de CG demuestra una reducción significativa en la señal de este marcador de actividad transcripcional en los animales TS en comparación a los CO. **D)** WB de AcH4 en lisados hipocampales totales que confirma la disminución significativa de expresión en el ratón TS respecto al CO. A su lado, se muestra una imagen representativa del western blot. En las gráficas se representan las medias  $\pm$  EEM. Escala: 10  $\mu$ m. \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001.

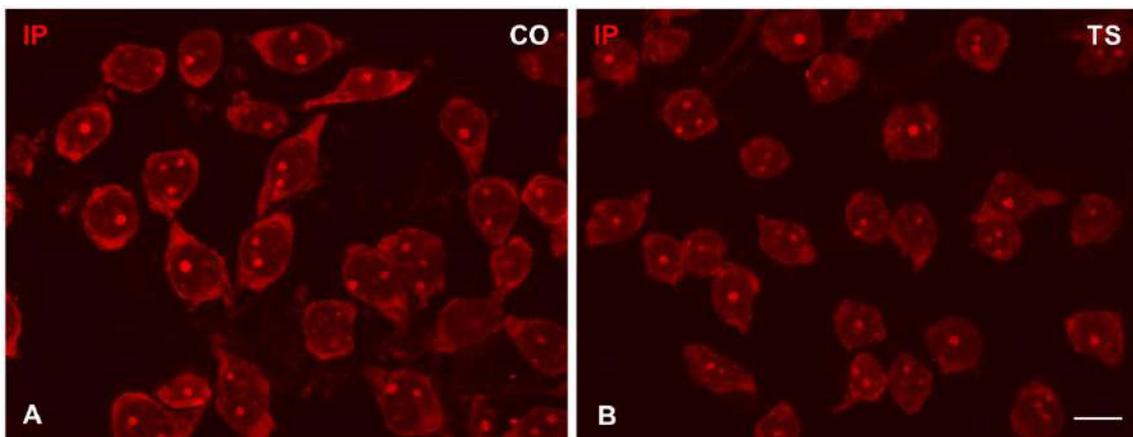
Con el objetivo de evaluar si el ratón TS presenta alteraciones en la actividad transcripcional global de las CG hipocampales se realizó un ensayo basado en la incorporación del nucleótido 5'-fluorouridina (5'-FU) en el RNA naciente, tanto a nivel nucleolar (rRNA) como extranucleolar (mRNA). Para ello, el compuesto fue inyectado intraperitonealmente a los ratones, que fueron sacrificados tras 45 minutos de exposición al nucleótido halogenado. Como se puede observar en la figura 16A-B, la incorporación de 5'-FU en el RNA naciente presenta un patrón difuso por el nucleoplasma con un punteado más brillante que corresponde a las factorías de transcripción. Mediante un análisis densitométrico se cuantificó la intensidad de fluorescencia de cada núcleo celular rodeando cada perímetro individualmente. La cuantificación de la fluorescencia en cada caso reveló una reducción significativa de la incorporación de 5'-FU en las

CG del ratón TS respecto al CO, sugiriendo que el primero presenta una marcada disminución de la actividad transcripcional global (Figura 16C).



**Figura 16. Disminución de la tasa de transcripción global en las CG del ratón TS. A-B)** Imágenes del ensayo de transcripción *in situ* basado en la incorporación de 5'-FU en el RNA nascente. Nótese una disminución de la señal fluorescente en las CG del ratón TS (**B**) respecto a las del ratón CO (**A**). **C)** Análisis densitométrico de intensidad de fluorescencia de la 5'-FU sobre disociados de CG del hipocampo que demuestra una disminución significativa de la actividad transcripcional del ratón TS respecto al CO. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM. Escala: 10  $\mu$ m. \*\* $p < 0.01$ .

Posteriormente, se evaluó si esta reducción en la actividad transcripcional del ratón TS estaba acompañada por alteraciones en la organización de la maquinaria de traducción en el citoplasma de las CG. Mediante una tinción citoquímica con IP se observó que la intensidad de la señal citoplasmática, que corresponde a los RNA, era menor en las CG del ratón TS, lo que sugiere una reducción en la disponibilidad de mRNAs para ser traducidos (Figura 17).

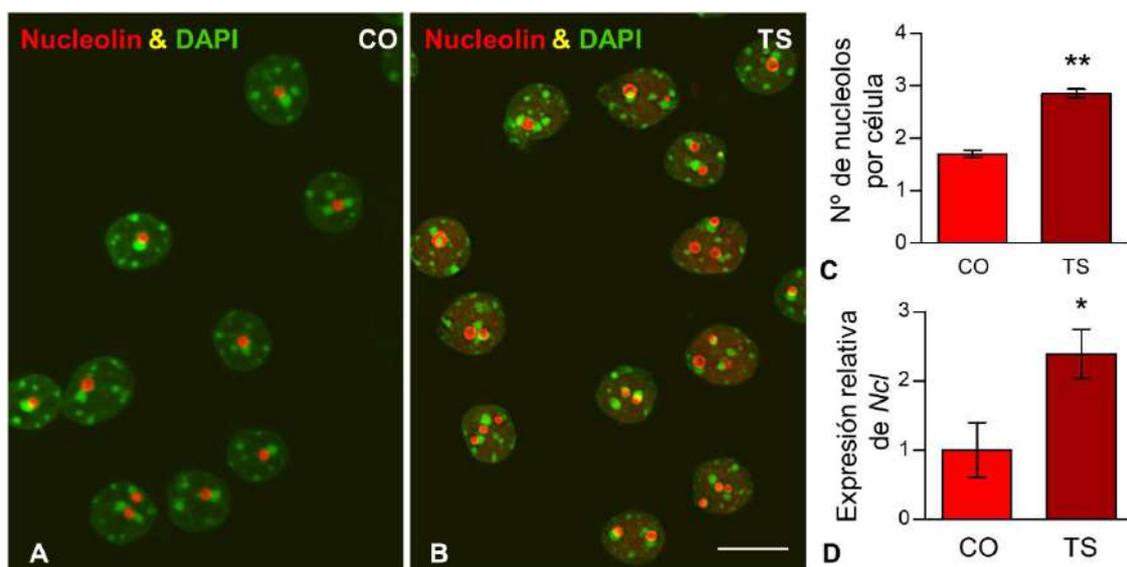


**Figura 17. Disminución en la cantidad de RNA en las CG del hipocampo del ratón TS. A-B)** *Squashes* de CG del hipocampo de un ratón CO (**A**) y TS (**B**) teñido con IP, un marcador de RNA. Nótese que el disociado de CG del hipocampo del ratón TS muestra una disminución en la intensidad de fluorescencia del IP.

### 5.1.3 La reorganización cromosómica en el ratón TS se asocia con una reducción en el patrón de fusión nucleolar

Dado que el exceso de dosis génica presente en este modelo animal se encuentra asociado con cambios en la posición cromosómica dentro del núcleo celular, a continuación, se analizó si el ratón TS presentaba alteraciones nucleolares relacionadas con una posible reorganización de las regiones organizadoras de nucleolos (NOR).

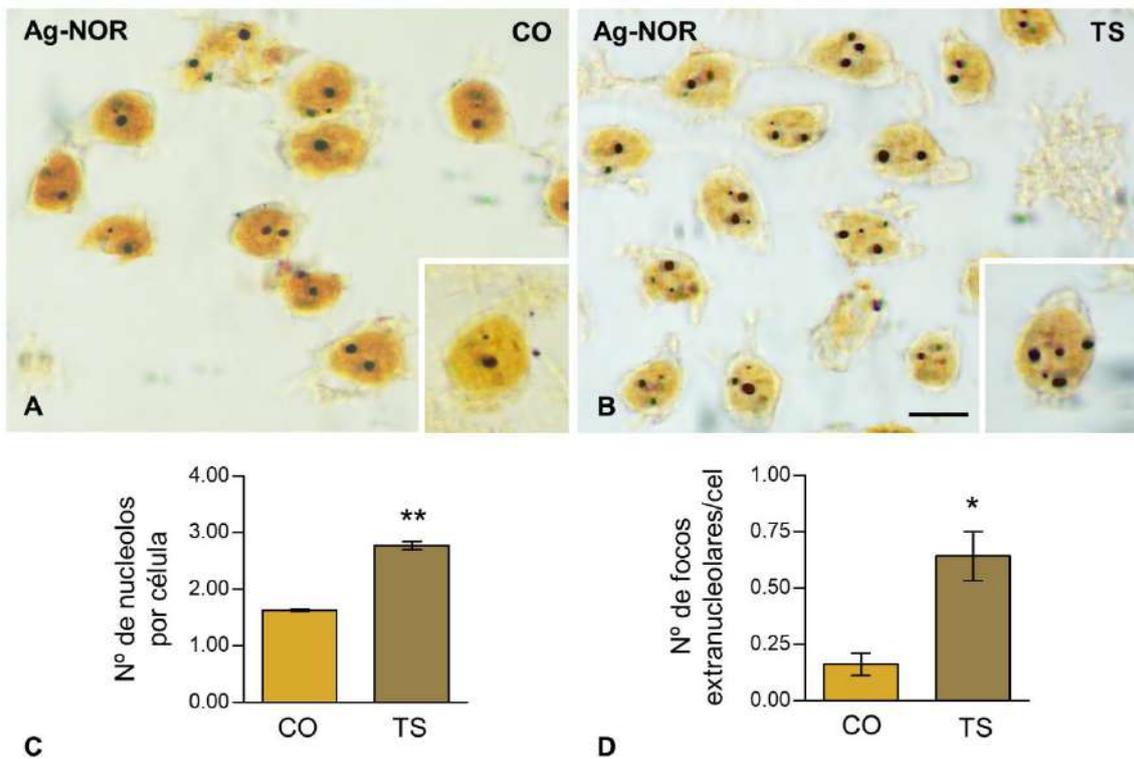
En primer lugar, se determinó si el ratón TS presentaba variaciones en el número de nucleolos en las CG del hipocampo, se realizó una inmunotinción con nucleolina, una proteína nucleolar que interacciona con el rDNA y pre-rRNA y tiene un papel fundamental en la organización espacial del rDNA. La inmunotinción muestra nucleolos de forma redondeada que se encuentran frecuentemente asociados a masas de heterocromatina, teñida con DAPI, tanto en las muestras de los animales CO como de los TS (Figura 18A-B). Con el objetivo de preservar la estructura celular completa, la cuantificación del número de nucleolos por CG se llevó a cabo sobre disociados celulares y reveló un incremento significativo en el número de nucleolos por célula en el ratón TS respecto a sus hermanos euploides (Figura 18C). Además, mediante RT-qPCR se analizó la expresión del gen *Ncl*, que codifica para la nucleolina, en lisados hipocámpales de ratones de ambos cariotipos. El análisis estadístico demostró que los ratones TS presentaban mayores niveles de expresión de este gen que los animales CO (Figura 18D).



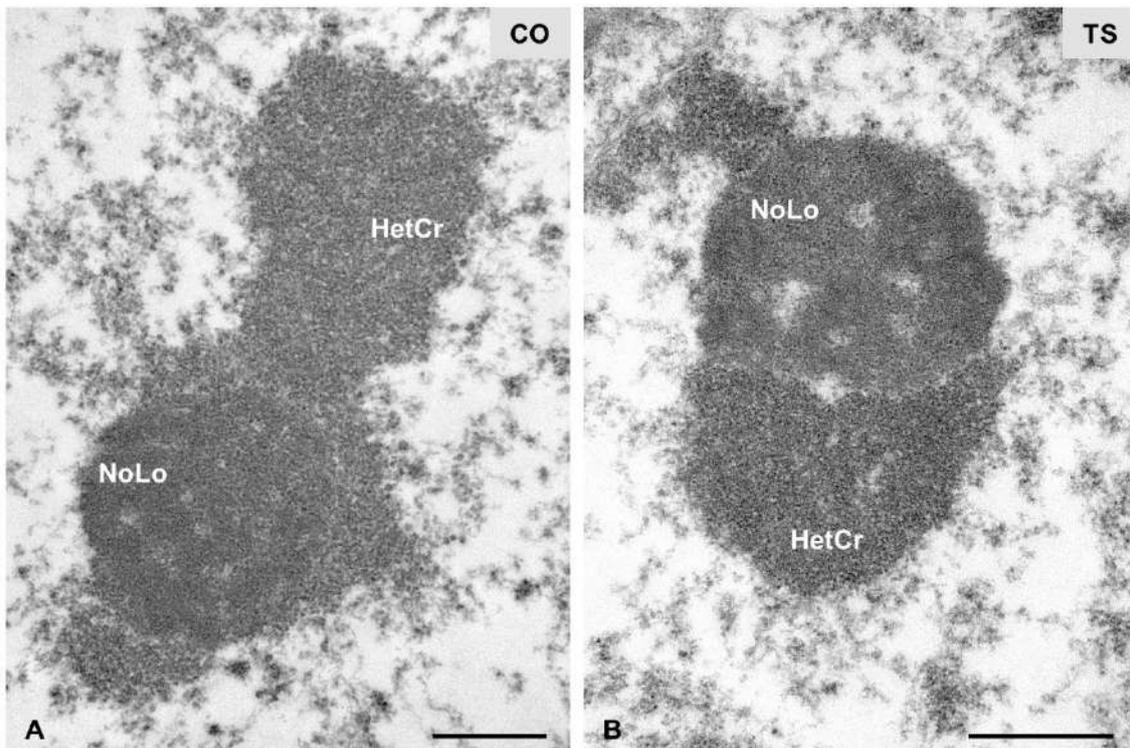
**Figura 18. Incremento en el número de nucleolos en las CG del giro dentado del ratón TS.** A-B) Inmunotinción de nucleolina contrastada con DAPI sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS, C) Análisis cuantitativo del número de nucleolos por célula que demuestra un incremento significativo en las CG del hipocampo de ratones TS respecto a los CO. D) Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de nucleolina (*Ncl*) obtenidos a partir de lisados hipocámpales totales que revela un aumento significativo en ratones TS respecto a los CO. Los datos representan la media  $\pm$  EEM. Escala: 10  $\mu$ m. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

## Resultados

Posteriormente, para analizar el número y la disposición de las NOR se realizó una tinción de plata. Las NOR se encuentran asociadas a proteínas nucleolares con gran afinidad por la plata (AgNOR) y pueden identificarse como pequeños puntos negros dentro del núcleo celular. Al realizar esta tinción, tanto en las muestras de ratones CO como de TS, se podían distinguir dos tipos de cuerpos nucleares: unos puntos más grandes, con un borde bien definido, que corresponden a los nucleolos en los que se concentran varias NOR activas y otros focos argirófilos más pequeños en los que se encuentran regiones de rDNA extranucleolar, que no se han fusionado en nucleolos activos (Figura 19A-B). El análisis cuantitativo de los cuerpos argirófilos más grandes corroboró el resultado obtenido en los ensayos de inmunofluorescencia de nucleolina, que mostraban un incremento significativo en el número de nucleolos en las CG del ratón TS en comparación con los del CO (Figura 19C). Además, la cuantificación de cuerpos argirófilos pequeños reveló un aumento significativo en el ratón TS respecto al CO (Figura 19D). Estos resultados apoyan la hipótesis de que este modelo animal de SD muestra una alteración en el patrón de fusión nucleolar debido al exceso de dosis génica que presentan.



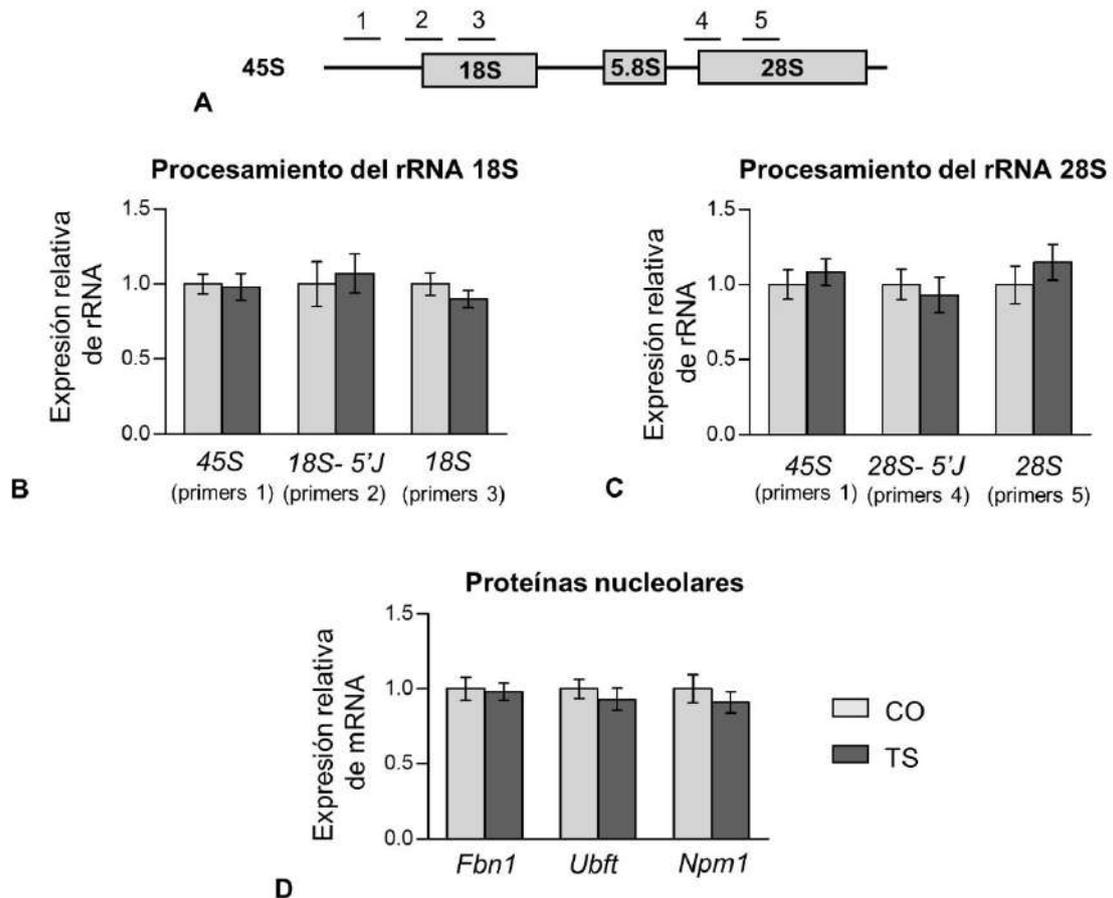
El análisis ultraestructural llevado a cabo mediante microscopía electrónica convencional de la capa de CG mostró, tanto en el ratón CO como en el TS, nucleolos pequeños, de morfología redondeada y con una configuración muy compacta en los que predominaba el componente granular (Figura 20). Además, alrededor de los nucleolos era frecuente encontrar grandes dominios de cromatina asociada al nucleolo (NAD, *nucleolus-associated domains*).



**Figura 20. A-B)** Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía electrónica convencional de nucleolos (NoLo) de CG del hipocampo de ratones CO y TS que aparecen asociados a grandes bloques de heterocromatina (HetCr). Escala: 500 nm

Finalmente, se comprobó si el aumento en el número de nucleolos en el ratón TS podría estar acompañado de variaciones en la actividad transcripcional de rDNA y en la expresión de los genes que codifican para proteínas nucleolares. Para ello, se llevó a cabo una RT-qPCR con extractos hipocampales totales de RNA de ratones CO y TS. En primer lugar, se evaluó la expresión de los genes ribosomales *45S*, *18S* y *28S* (Figura 21A). El precursor *45S* es un indicador de actividad transcripcional dependiente de la RNA polimerasa I, mientras que el *18S* y el *28S* corresponden a las formas maduras de rRNA que formarán las partículas ribosomales. El procesamiento de estos rRNA maduros cuenta con varios precursores. En este trabajo también se evaluaron los intermediarios *18S-5'junction (18S-5'J)* y *28S-5'junction (28S-5'J)* que presentan un fragmento de rRNA en el extremo 5' que ha de ser eliminado para llegar a la forma madura *18S* y *28S*, respectivamente. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas

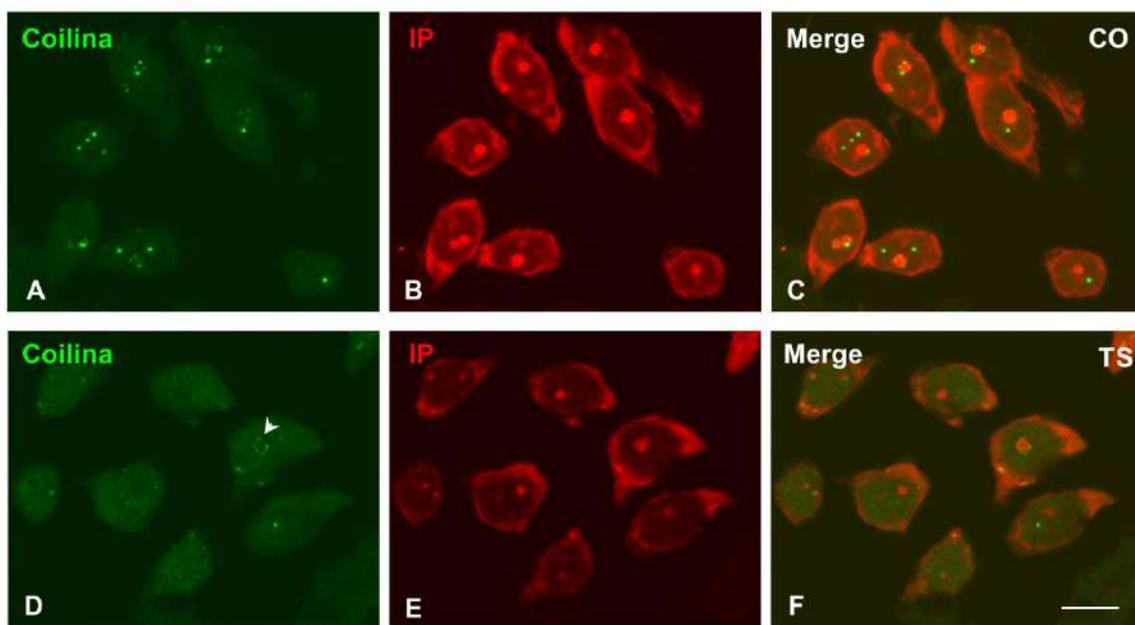
en la expresión del pre-rRNA 45S, en los precursores 18S 5'-junction y 28S 5'-junction, ni en las formas maduras 18S y 28S (Figura 21B-C). Estos resultados sugieren que el ratón TS no presenta alteraciones en la actividad transcripcional nucleolar ni en el procesamiento del rRNA. A continuación, se evaluó la expresión de genes que codifican para proteínas nucleolares como la fibrilarina (*Fbn1*), nucleofosmina/B23 (*Npm1*) y UBF (*Ubt*). Estas proteínas tienen un papel fundamental en la síntesis y procesamiento del rRNA y en su ensamblaje para formar las partículas pre-ribosomales. De manera consistente con los resultados obtenidos en el análisis del pre-rRNA 45S, no se observaron diferencias significativas entre los animales CO y TS en la expresión de *Ubt*, que codifica para un factor transcripcional de genes ribosómicos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre ratones CO y TS en la expresión de los genes *Fbn1* y *Npm1* (Figura 21D).



**Figura 21. La expresión de genes ribosomales y de genes que codifican para proteínas nucleolares se encuentra preservada en el hipocampo del ratón TS.** A) Esquema de los pares de primers utilizados en las siguientes RT-qPCR de rRNA. B) RT-qPCR de los niveles de expresión de los rRNA 45S, 18S-5'junction y 18S maduro C) de los rRNA 45S, 28S-5'junction y 28S maduro y D) de componentes nucleolares fibrilarina (*Fbn1*), UBF (*Ubt*) y nucleofosmina/B23 (*Npm1*). Ninguno de los análisis mostró diferencias significativas entre ratones CO y TS. Datos representados como media  $\pm$  EEM.

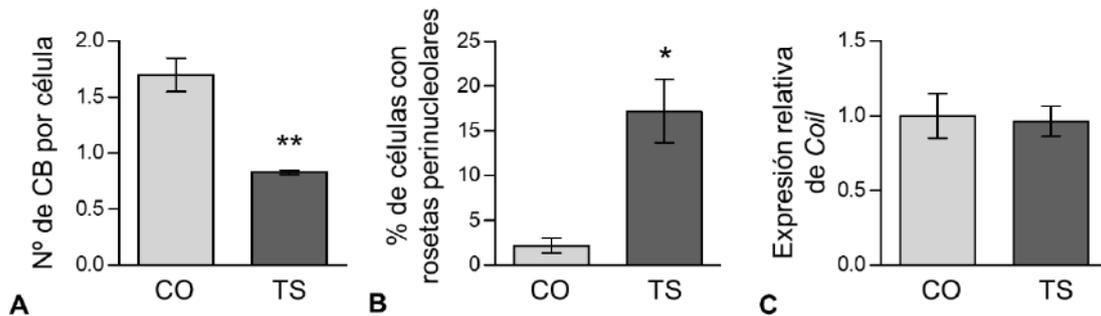
#### 5.1.4 La reorganización nuclear presente en las CG del ratón TS produce una reducción del número de cuerpos nucleares de Cajal y la redistribución de la coilina

Los cuerpos nucleares de Cajal (CB, *Cajal Bodies*) son organelas nucleares cuyo tamaño y número se relaciona directamente con la actividad transcripcional. Esta organela cumple un papel importante en el mantenimiento de la proteostasis celular, particularmente, de la biogénesis de ribonucleoproteínas implicadas en el metabolismo los mRNA y rRNA. Sobre esta base, nos planteamos si el exceso de dosis génica del ratón TS podía producir alteraciones en el comportamiento de CB en las CG del hipocampo de estos animales. En primer lugar, se analizó si existían variaciones en el número de CB en las CG del giro dentado del ratón TS. Para ello, se realizó un inmunomarcaje con coilina, una proteína estructural de los CB, sobre *squashes* de CG de ratones CO y TS. En las imágenes se puede apreciar que las CG del ratón euploide presentan mayoritariamente unos cuerpos de morfología esférica y pequeño tamaño que corresponden a los CB canónicos y que frecuentemente se encuentran asociados al nucleolo (Figura 22A-C). Sin embargo, las CG del ratón TS presentan un menor número de CB canónicos y muestran con mayor frecuencia rosetas de coilina perinucleolar (Figura 22D-F).



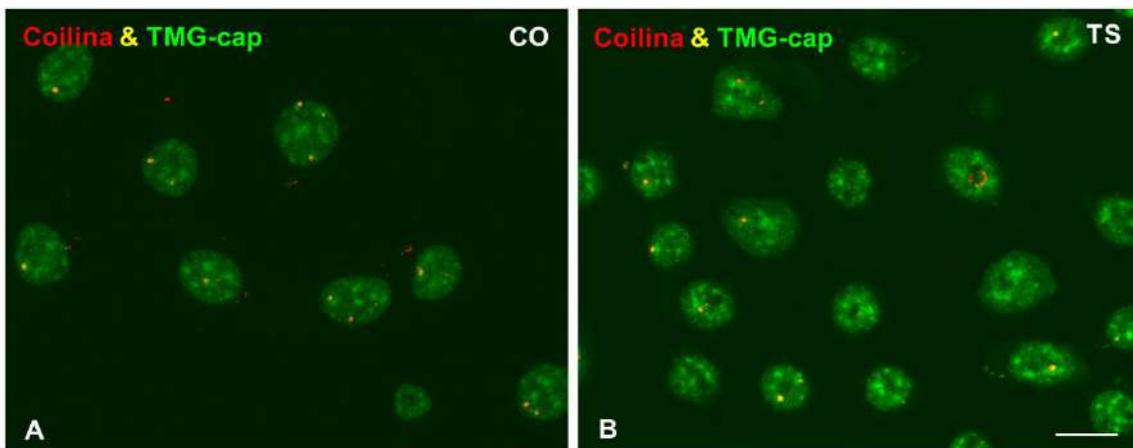
**Figura 22. A-F)** Imágenes representativas de una inmunofluorescencia con coilina contrastada con IP sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO (A-C) y TS (D-F). Nótese la reducción en el número de CB, así como la presencia de rosetas perinucleolares de coilina en las CG del ratón TS (punta de flecha en la imagen D).

Los análisis cuantitativos realizados sobre los experimentos de inmunofluorescencia con coilina en disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS demostraron una disminución significativa del número de CB canónicos por célula (Figura 23A) y un incremento significativo en el porcentaje de células que presentaban rosetas de coilina perinucleolar (Figura 23B) en los ratones TS respecto a los CO. Además, el análisis de los niveles de expresión de coilina mediante RT-qPCR en lisados de mRNA de hipocampos no reveló diferencias significativas entre los ratones CO y TS, indicando una redistribución de la coilina en el núcleo de las CG del hipocampo del ratón trisómico (Figura 23C).



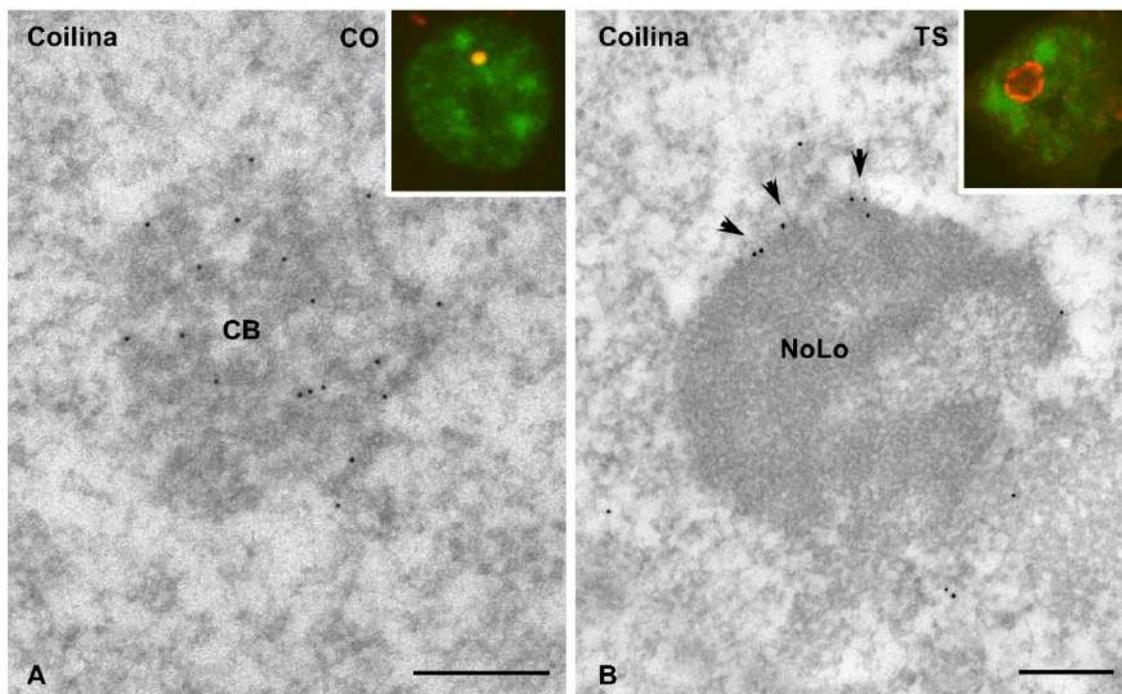
**Figura 23. Las CG del ratón TS presentan una reducción en el número de CB y redistribución de la coilina. A)** Análisis cuantitativo del número de CB canónicos por célula realizado en un ensayo de inmunofluorescencia de coilina sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS. **B)** Cuantificación del porcentaje de CG que contenían rosetas de coilina perinuclear. **C)** RT-qPCR de coilina que no muestra diferencias significativas en los niveles de expresión de este gen entre los ratones CO y TS. Datos representados como media  $\pm$  EEM. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

A continuación, para detectar la presencia de snRNP en los CB se llevó a cabo un doble inmunomarcaje de coilina y TMG-cap, que reconoce el extremo 5' de las snRNA espliceosomales. Mientras que en los CB canónicos se observaba una colocalización de ambos marcajes (Figura 24A), las rosetas perinucleolares mostraban una señal prácticamente indetectable de TMG-cap (Figura 24B).



**Figura 24. A-B)** Imágenes representativas de un doble inmunomarcaje con coilina y TMG-cap sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS. **A)** Nótese la colocalización típica de coilina con los factores de *splicing* en los CB canónicos. **B)** Las rosetas perinucleolares marcadas con coilina no concentran TMG-cap. Escala: 10 µm.

Finalmente, se evaluó la existencia de estas alteraciones en la distribución de la coilina nuclear mediante su inmunomarcaje y posterior observación en el microscopio electrónico. En las imágenes (Figura 25) se puede observar que la coilina de los CB del ratón CO aparece homogéneamente distribuida en las hebras densas dentro de la organela. Sin embargo, los ratones TS presentaban frecuentemente una acumulación de coilina alrededor del nucleolo que corresponde a las rosetas perinucleolares que se observan mediante microscopía confocal.



**Figura 25. Alteración en la distribución de coilina en las CG del hipocampo del ratón TS. A-B,** Imágenes inmuno electrónicas de coilina marcadas con oro coloidal en las CG del hipocampo de ratones CO y TS. **A)** Imagen representativa de un CB canónico de un ratón CO marcado con coilina. Obsérvese la distribución homogénea de coilina dentro del CB. **B)** Roseta de coilina perinucleolar que ilustra los agregados de coilina (señalados con flechas negras) alrededor del nucleolo (NoLo) en una CG del ratón TS. Las imágenes ampliadas en la esquina superior derecha de cada fotografía muestran imágenes de microscopía confocal de una doble inmunofluorescencia de coilina (rojo) y TMG-cap (verde). Escala: 250 nm.

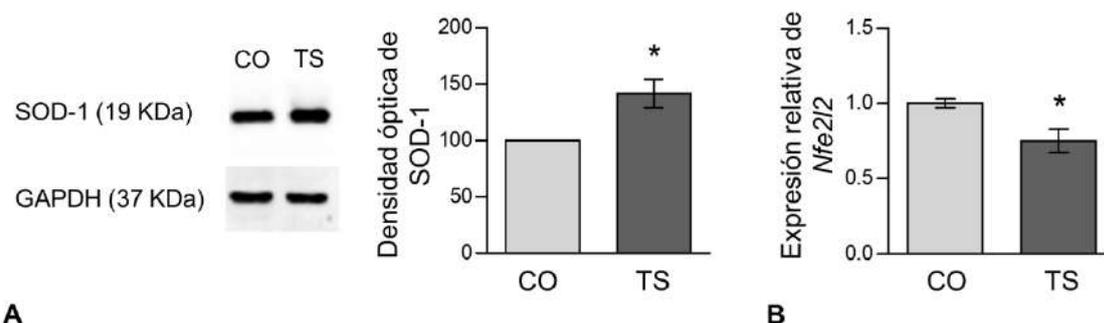
## **5.2. Alteraciones celulares asociadas al exceso de estrés oxidativo en las CG del hipocampo del ratón Ts65Dn**

Como se ha mencionado anteriormente, los déficits cognitivos característicos de las personas con SD y del ratón TS se deben a anomalías neuromorfológicas que ocurren durante el neurodesarrollo y a la aparición de diversos procesos neuropatológicos, entre los que destaca el incremento de estrés oxidativo. En el SD, el exceso de estrés oxidativo está presente desde etapas tempranas y se agrava progresivamente a lo largo de la vida. Así, el daño oxidativo crónico en biomoléculas, organelas y sistemas de degradación intracelular causa múltiples alteraciones celulares acelerando el envejecimiento cerebral y la neurodegeneración y, por tanto, contribuyendo al deterioro cognitivo. Por ello, el segundo objetivo de esta Tesis consistió en profundizar en el estudio del estado oxidativo del hipocampo de nuestro modelo animal y en analizar su efecto sobre componentes celulares esenciales para el correcto funcionamiento de las CG hipocampales.

### **5.2.1. El incremento de estrés oxidativo en el hipocampo del ratón TS se asocia con una respuesta antioxidante alterada, altos niveles de peroxidación lipídica y alteraciones mitocondriales en las CG**

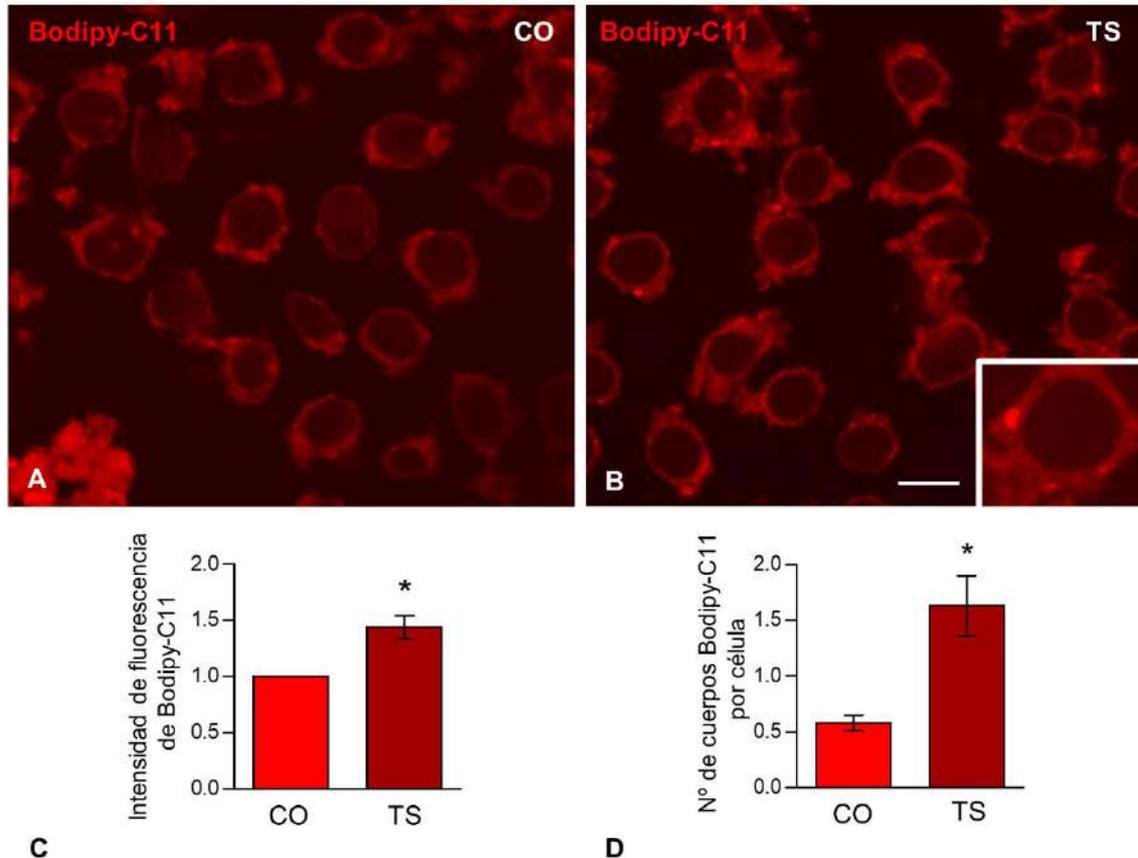
Estudios previos de éste y otros laboratorios han demostrado que el hipocampo del ratón TS es particularmente vulnerable al estrés oxidativo (Corrales et al., 2017; Parisotto et al., 2016). Para comprender mejor el estado oxidativo del hipocampo del ratón TS a los 6 meses de edad, se evaluaron los niveles de expresión de algunos componentes del sistema antioxidante. En primer lugar, se analizó la expresión de la proteína SOD-1, que cataliza la conversión del radical superóxido a  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Para ello, se realizó un Western blot utilizando lisados proteicos de hipocampo de ratones CO y TS. Este experimento mostró que el hipocampo de los ratones TS presentaba un incremento significativo en los niveles de expresión de SOD-1 respecto a sus hermanos euploides (Figura 26A). Este incremento podría suponer un aumento de ROS en el hipocampo de los animales TS. En segundo lugar, se evaluó la expresión del gen *Nfe2l2*, que codifica para el factor de transcripción Nrf2, implicado en la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes y protegen contra el daño oxidativo cuando los niveles de estrés oxidativo son elevados. El análisis mediante RT-qPCR de los niveles de expresión del gen *Nfe2l2*, reveló una reducción significativa de la expresión de este gen en el hipocampo de ratones TS en comparación con los CO (Figura 26B). Este resultado sugiere que esta respuesta antioxidante no funciona correctamente en el hipocampo de los animales TS, manteniendo altos niveles de ROS en esta estructura. En conjunto, la expresión alterada de la proteína SOD-1 y del

gen *Nfe2l2*, podría afectar a la homeostasis redox favoreciendo el incremento de estrés oxidativo en el hipocampo del ratón TS.



**Figura 26. Alteraciones en la homeostasis redox en el hipocampo del ratón TS. A)** Imagen representativa y análisis cuantitativo de un WB de SOD-1 que reveló un incremento significativo de su expresión en lisados proteicos hipocámpales de ratones TS vs. CO. **B)** Análisis mediante RT-qPCR del gen *Nfe2l2* que demostró una reducción significativa en sus niveles de expresión en hipocámpos de ratones TS respecto a los animales CO. Los datos se representan como media  $\pm$  EEM de 6 animales independientes. \* $p < 0.05$

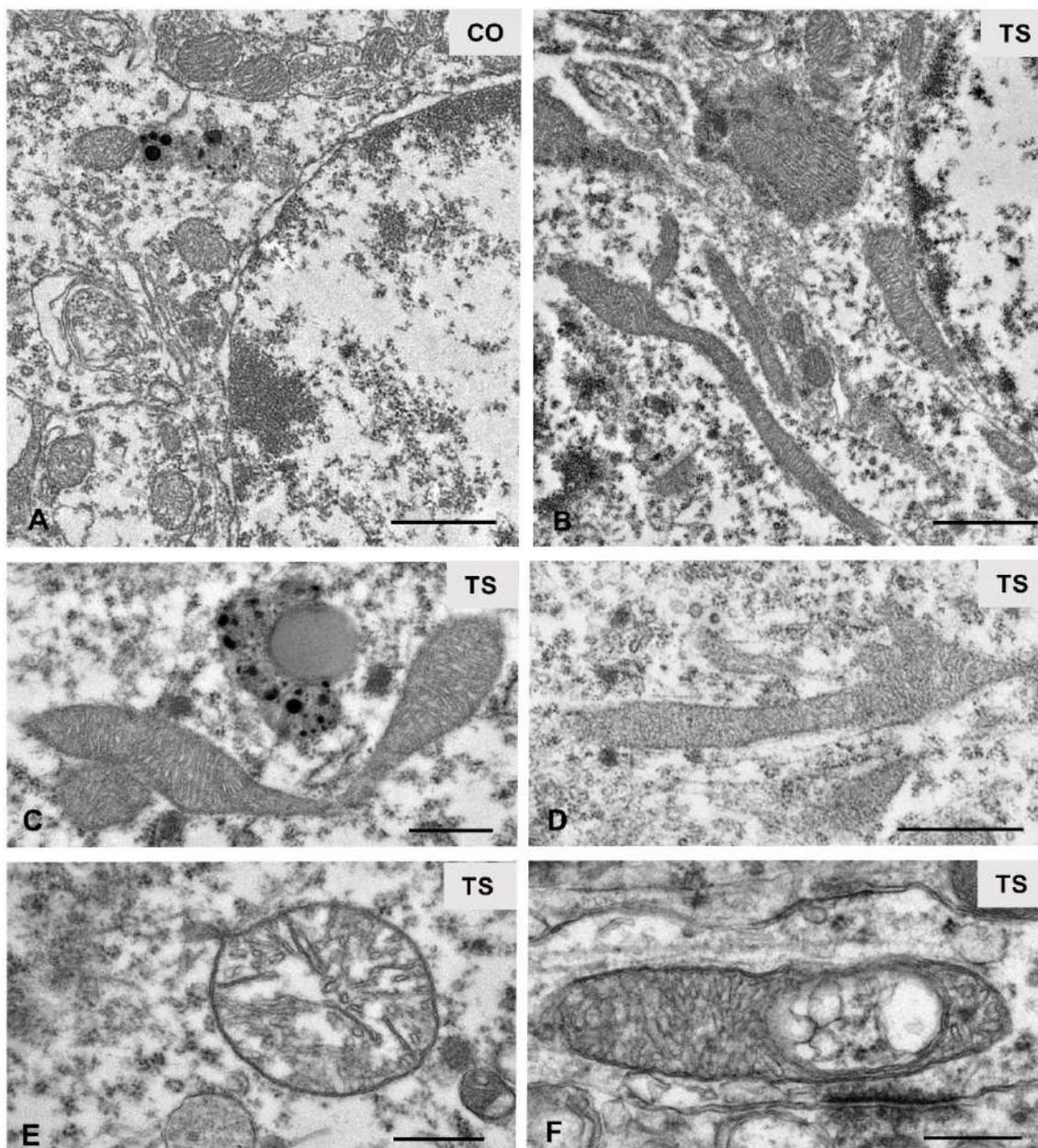
Debido a que los lípidos son biomoléculas especialmente propensas a sufrir daño oxidativo, a continuación, se analizó la presencia de lípidos peroxidados, un marcador celular del desequilibrio de ROS y de daño oxidativo a lípidos, en las CG de animales CO y TS. Para ello, se llevó a cabo un ensayo *in situ* con la sonda fluorescente Bodipy-C11, un marcador liposoluble que detecta lípidos peroxidados presentes en las membranas de diferentes orgánulos celulares, sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS. En las imágenes se puede apreciar que las CG del ratón TS marcadas con Bodipy-C11 mostraban niveles superiores de lípidos peroxidados a los encontrados en el ratón euploide (Figura 27AB). Esta observación fue validada mediante el análisis densitométrico de intensidad de fluorescencia, que demostró un aumento significativo en la señal de Bodipy-C11 en el citoplasma de las CG del ratón TS frente a las del CO (Figura 27C). Por otra parte, en las CG del ratón TS destacaba la presencia de numerosos cuerpos de inclusión, de diferente tamaño y morfología, muy positivos para el marcador Bodipy-C11. El análisis cuantitativo reveló un incremento significativo en el número de cuerpos positivos de Bodipy-C11 que, presumiblemente, corresponden con acúmulos de organelas citoplasmáticas cuyas membranas tienen altos niveles de peroxidación lipídica y pueden incluir mitocondrias, retículo endoplásmico, lisosomas o gotas lipídicas. (Figura 27D).



**Figura 27. Incremento de la peroxidación lipídica en las CG del hipocampo del ratón TS.** A-B) Imágenes representativas del ensayo *in situ* con Bodipy-C11 sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS. Nótese el incremento en el marcaje de Bodipy-C11 en las CG del hipocampo en el ratón trisómico. C) Análisis densitométrico de intensidad de fluorescencia de Bodipy-C11, que demuestra un incremento significativo de lipoperoxidación en el citoplasma de las CG del hipocampo del ratón TS. D) La cuantificación del número de focos Bodipy-C11 positivos revela un incremento significativo en las CG del ratón TS vs. el CO. Escala: 10  $\mu$ m. Las gráficas representan medias  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ .

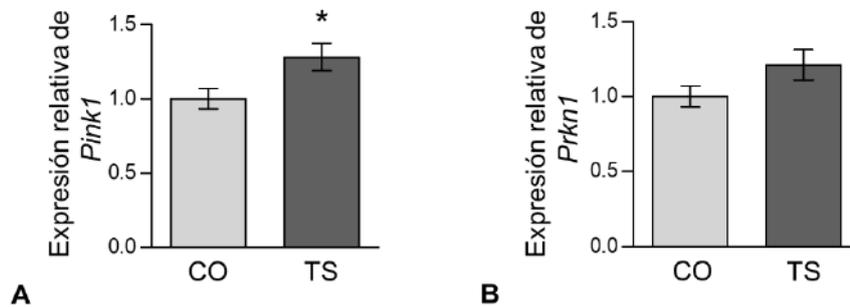
Las membranas de las mitocondrias son una de las principales dianas de los radicales libres y su alteración se encuentra estrechamente relacionada con la producción de ROS y un déficit en la producción energética celular. En el SD y en el ratón TS, las alteraciones estructurales y funcionales de las mitocondrias se han relacionado con un exceso en el contenido de ROS (Bayona-Bafaluy et al., 2021; Bordi et al., 2019; Mollo et al., 2020). Por ello, a continuación, se analizó si en las CG del ratón TS se había producido una alteración de la organización e integridad mitocondrial. Para ello se llevó a cabo un análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica convencional. Por un lado, las mitocondrias de las CG de los ratones CO exhibían una morfología redondeada u ovalada y conservaban una estructura interna ordenada (Figura 28A). Sin embargo, las CG de los ratones TS mostraban mitocondrias polimórficas o muy elongadas (Figura 28B-D), indicando una posible alteración en el patrón de fusión/fisión mitocondrial. Además, en las CG del ratón TS se encontraban, con frecuencia,

anomalías estructurales como dilataciones en la matriz y vacuolizaciones internas, así como alteraciones en la morfología y disposición de las crestas mitocondriales (Figura 28E-F). Estas anomalías estructurales encontradas en las mitocondrias de las CG del ratón TS son consistentes con alteraciones funcionales causadas por el incremento del estrés oxidativo.



**Figura 28. Anomalías morfológicas en las mitocondrias de las CG del hipocampo de ratones TS.** A) Panorámica del citoplasma de una CG del hipocampo de un ratón CO que muestra numerosas mitocondrias con la típica morfología redondeada y crestas mitocondriales ordenadas. B-D) Mitocondrias polimórficas y multilobuladas presentes en las CG del hipocampo del ratón TS. E-F) Imágenes representativas de alteraciones en la estructura interna en las mitocondrias de CG del hipocampo del ratón TS. Obsérvese la desorganización de las crestas mitocondriales (E) y la vacuolización interna (F). Escala A-D: 1  $\mu$ m. Escala E-F: 500 nm.

La presencia de mitocondrias anómalas y dañadas en las CG del ratón TS, nos llevó a pensar que tal vez pudiera estar ocurriendo un defecto en la activación del mecanismo neuroprotector que activa la eliminación de estas organelas, también denominado mitofagia. Para ello, se analizó mediante RT-qPCR la vía de señalización Pink1/Parkina en lisados de RNA de hipocampos de ratones CO y TS. Pink1 es una serina/treonina quinasa que sirve como un marcador molecular de daño mitocondrial. Esta enzima actúa fosforilando a la parkina, una ubiquitina ligasa E3 encargada de poliubiquitinar diversas proteínas de la superficie mitocondrial y activar la cascada de señalización de la mitofagia para degradar las mitocondrias dañadas. Los resultados demuestran un incremento significativo en los niveles de expresión del gen que codifica para Pink1 (*Pink1*) en lisados de RNA hipocampales del ratón TS, indicando un aumento del daño mitocondrial (Figura 29A). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión del gen que codifica para la parkina (*Prkn1*) entre ratones CO y TS (Figura 29B), lo que podría indicar un defecto en la activación de la cascada de señalización para la degradación de mitocondrias disfuncionales.



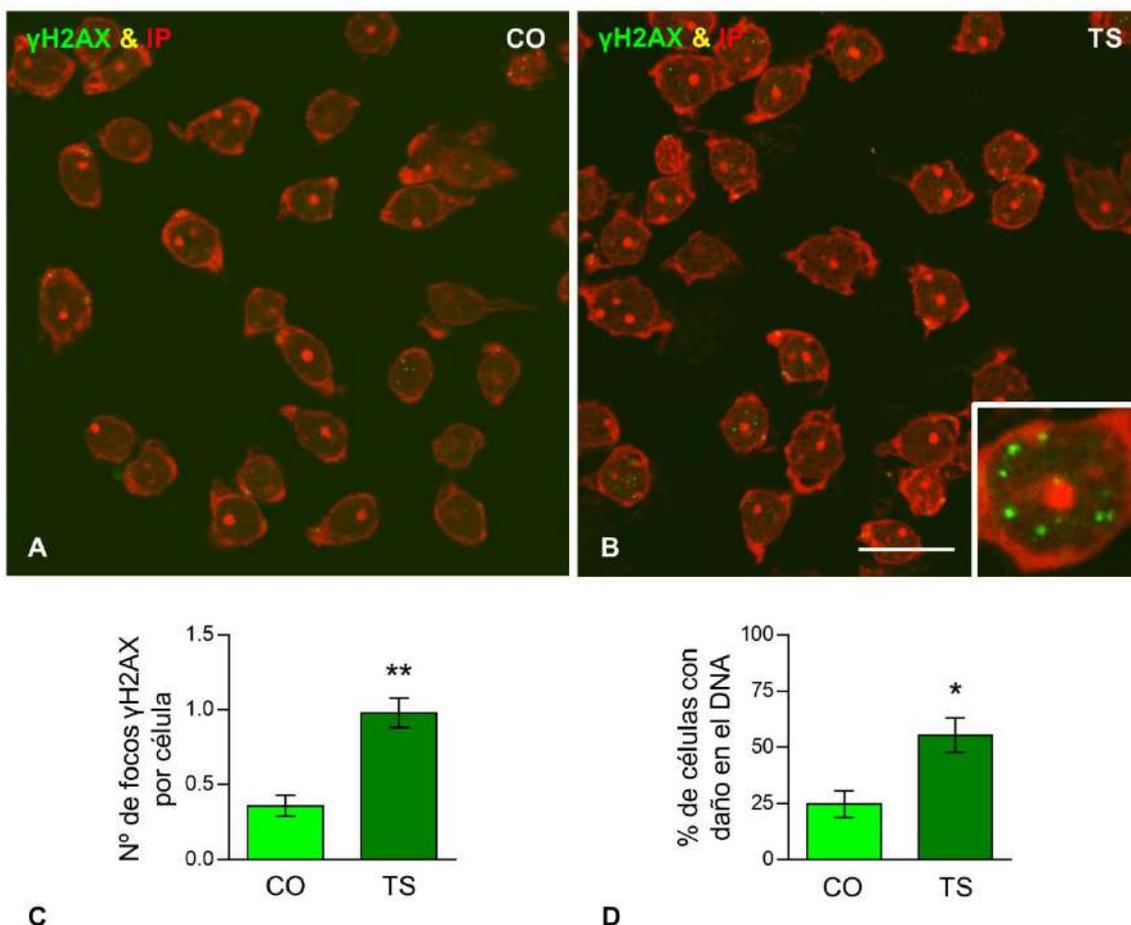
**Figura 29. El hipocampo del ratón TS presenta alteraciones en la vía de señalización Pink1/Parkina. A)** Análisis de expresión mediante RT-qPCR que demuestra un incremento significativo en los niveles de *Pink1* en lisados de RNA de hipocampo de ratones TS frente a los CO. **B)** RT-qPCR de *Prkn1* en el que no se detectan diferencias significativas entre lisados hipocampales de ratones CO y TS. Las gráficas representan medias  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ .

### 5.2.2. El estrés oxidativo presente en las CG del hipocampo del ratón TS induce daño en el DNA

El daño oxidativo al DNA es un evento celular que induce neurodegeneración. El incremento en la producción de ROS causa daño en el DNA mediante la generación de roturas en el DNA de doble cadena (Double Strand Breaks, DSB), la forma más dañina de producir lesiones en el DNA, y alterando los mecanismos de reparación de daño en el DNA (Coppedè y Migliore, 2015; Sedelnikova et al., 2004).

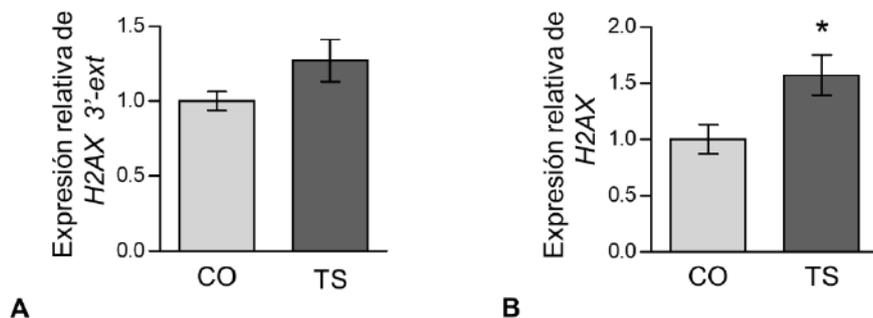
Para determinar si el exceso de estrés oxidativo, a los 6 meses de edad, causa un incremento en la generación de DSB se realizó una inmunotinción frente a la histona H2AX

fosforilada ( $\gamma$ H2AX), un marcador específico de daño en el DNA, y se contrastó con IP. Utilizando esta técnica se pudieron observar focos de  $\gamma$ H2AX pequeños y bien definidos dentro del núcleo de las CG de ratones CO y TS que, presumiblemente, se mantienen mediante un mecanismo de separación de fases líquido-líquido donde se inicia la cascada de señalización de daño en el DNA y se concentran los factores de reparación. Además, ninguno de los grupos experimentales mostraba grandes focos de  $\gamma$ H2AX correspondientes a sitios de daño persistente, que no pueden ser corregidos por los sistemas de reparación de daño en el DNA (Figura 30A-B). El análisis cuantitativo del número de focos de daño por núcleo reveló un incremento significativo de dichos focos en las CG del ratón TS respecto a sus hermanos euploides (0.98 % vs. 0.36 %; Figura 30C). Además, de manera consistente con este resultado, los animales TS mostraron un incremento en el porcentaje de CG que presentan focos de daño respecto a los ratones CO (55.4 % vs. 24.6 %; Figura 30D).



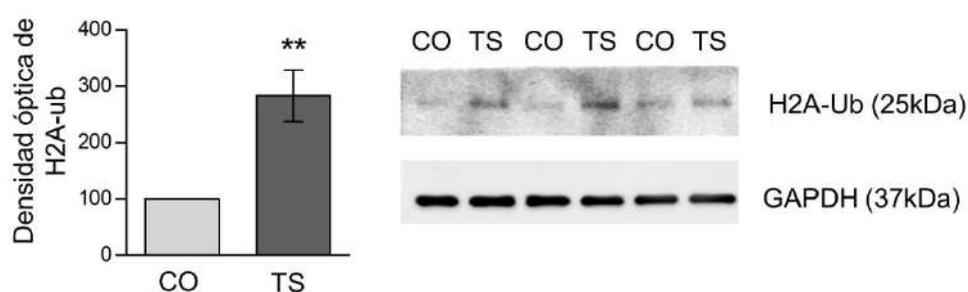
**Figura 30. Las CG del hipocampo acumulan daño en el DNA de doble cadena. A-B)** Inmunomarcaje de  $\gamma$ H2AX sobre disociados de CG del hipocampo de un ratón CO y TS. **C-D)** Cuantificación del número de focos de  $\gamma$ H2AX por CG del hipocampo (**C**) y del porcentaje de CG que contienen focos  $\gamma$ H2AX positivos (**D**). Nótese el incremento significativo de ambos parámetros en las CG del ratón TS. En las gráficas se representan las medias  $\pm$  EEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

Dado el importante papel que tiene la H2AX para iniciar la respuesta celular frente al estrés genotóxico, a continuación, se evaluó si el incremento en el daño en el DNA en las CG del ratón TS inducía cambios en los niveles de expresión de su mRNA. El procesamiento de la H2AX cuenta con un único precursor que tiene un fragmento de mRNA en el extremo 3' (*H2AX-3'extended*), cuya acumulación podría sugerir un procesamiento incorrecto de esta histona. Los datos obtenidos mediante RT-qPCR sobre lisados de mRNA hipocampales revelaron un ligero incremento, aunque no significativo, en el intermediario *H2AX-3'extended* en los ratones TS en comparación con los CO (Figura 31A). Además, los animales TS mostraron un incremento significativo en la expresión génica de la histona H2AX (Figura 31B), lo que sugiere un incremento en la biosíntesis de esta histona necesario para reformar los nucleosomas en los sitios de daño en el DNA.



**Figura 31. Incremento de los niveles de expresión del gen que codifica para la histona H2AX en el hipocampo de ratones TS. A-B)** RT-qPCR del precursor *H2AX 3'-ext* (A) y la forma madura *H2AX* (B) en lisados hipocampales de ratones CO y TS. Mientras que no se detectan cambios significativos en la expresión del intermediario *H2AX 3'-ext*, la forma madura H2AX incrementa significativamente en lisados de RNA de hipocampo de ratones TS frente a los CO. En las gráficas se representan las medias  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ .

Siguiendo la cascada de señalización de respuesta al daño en el DNA, la histona H2A también puede ser modificada por poliubiquitinación (H2A-ub). Esta modificación post-traducciona en la histona H2A es esencial para el remodelamiento de la cromatina y el acceso de la maquinaria de reparación de daño en los focos de rotura del DNA de doble cadena. Por ello, analizamos si el incremento de daño en el DNA se correlacionaba con un aumento en los niveles proteicos de H2A-ub. Tal y como se esperaba, el análisis de la expresión proteica mediante *Western blot* reveló un incremento significativo de H2A-ub en extractos hipocampales del ratón TS en comparación con los CO, indicando una activación de la DDR en las CG del giro dentado en los ratones trisómicos (Figura 32).



**Figura 32. El hipocampo del ratón TS presenta un aumento en la expresión de H2A ubiquitinada.** Análisis de la expresión de H2A-ub mediante WB que muestra un incremento significativo en su expresión en lisados de proteínas hipocampales del ratón TS respecto al CO. La gráfica representa las medias  $\pm$  EEM normalizado  $**p < 0.01$ . A la derecha de la figura se muestra una imagen representativa del WB.

En su conjunto, estos resultados sugieren que las CG del giro dentado del ratón TS sufren un incremento del daño en el DNA prematuro, probablemente debido al exceso de estrés oxidativo.

### 5.2.3. El estrés oxidativo se asocia con alteraciones en la proteostasis en las CG del ratón TS

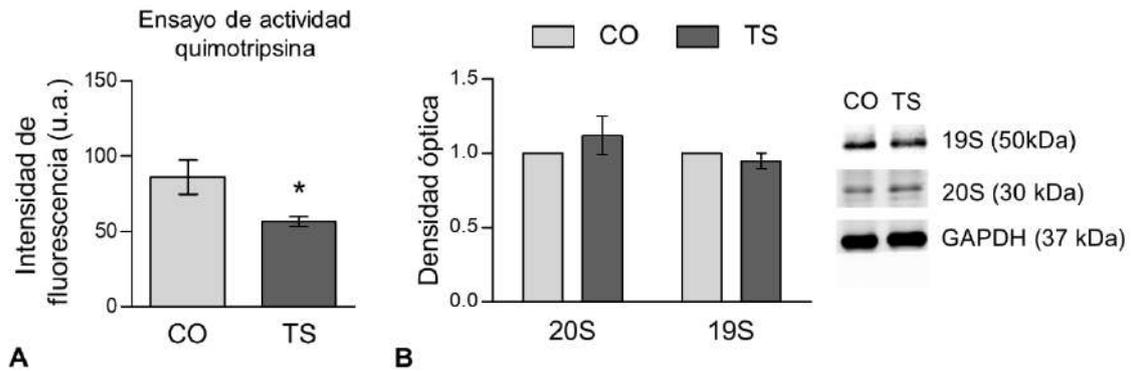
Una gran cantidad de estudios en el SD indican que la formación excesiva de ROS puede dañar o alterar los sistemas de degradación intracelulares como el proteasoma (UPS) o el sistema autofágico-lisosomal, que están estrechamente interconectados, provocando la formación de agregados proteicos o la acumulación de productos tóxicos no deseados (Di Domenico et al., 2013; Lanzillotta y Di Domenico, 2021).

#### 5.2.3.1. Disfunción del proteasoma

La eliminación de proteínas por la vía del proteasoma requiere la poliubiquitinación de las mismas, mediada por la actividad secuencial de la enzima activadora de la ubiquitina (E1), la enzima de conjugación de la ubiquitina (E2) y la ubiquitina ligasa (E3). A continuación, la subunidad reguladora del proteasoma 19S reconoce las proteínas ubiquitinadas, que se degradan por la subunidad catalítica del proteasoma 20S (Ciechanover y Kwon, 2015). Se ha relacionado el incremento del estrés oxidativo con alteraciones y reducción de la funcionalidad del proteasoma en el cortex frontal humano y en cultivos de líneas celulares obtenidos de personas con SD, así como en el cerebelo de los ratones TS (Aivazidis et al., 2017; Di Domenico et al., 2013; Necchi et al., 2011).

Para evaluar si el exceso de estrés oxidativo podría afectar a la actividad proteolítica del proteasoma en las CG del ratón TS, se realizó un ensayo enzimático basado en la actividad

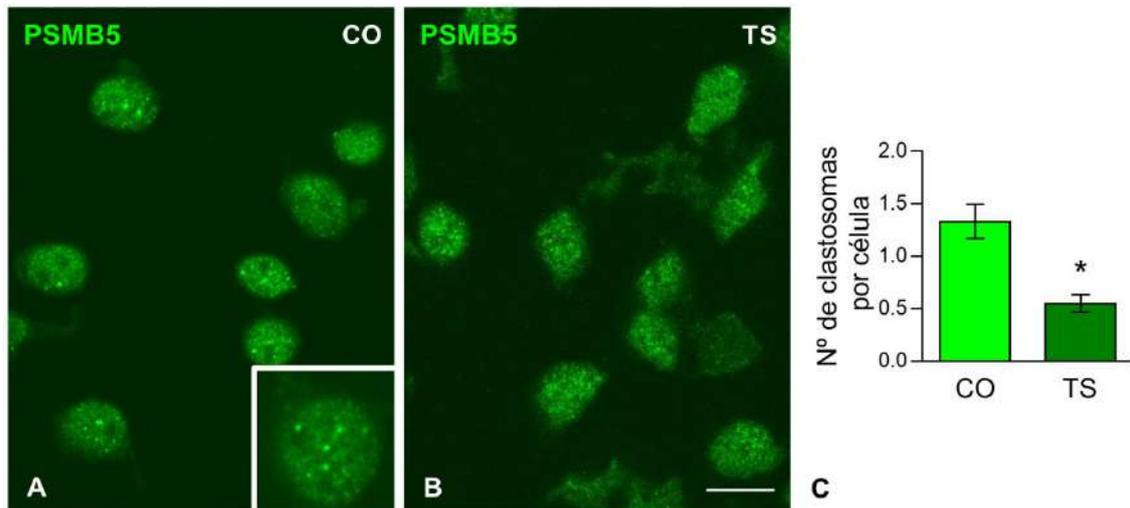
quimotripsina, una de las enzimas proteolíticas situadas en la subunidad 20S del proteasoma. Los resultados revelaron una disminución significativa (del 35 % aproximadamente) en la actividad proteolítica de esta enzima en el hipocampo de los ratones TS en comparación con los CO (Figura 33A), que podía sugerir una reducción en la funcionalidad del proteasoma en el hipocampo de ratones trisómicos. A continuación, se evaluó si esta reducción en la actividad proteolítica podía deberse a cambios en la expresión de las diferentes subunidades que componen el proteasoma. Los resultados obtenidos mediante WB en extractos proteicos de hipocampo no revelaron diferencias significativas en la expresión de la subunidad reguladora 19S ni en la subunidad catalítica 20S del proteasoma en ratones TS frente a los CO (Figura 33B). Estos resultados sugieren que la caída en la actividad del proteasoma en el hipocampo de los ratones TS no se debe a cambios en la expresión de las subunidades que lo componen.



**Figura 33. La disminución en la actividad del proteasoma en el hipocampo del ratón TS no está causada por cambios en la expresión de las subunidades.** **A)** Ensayo de actividad quimotripsina que revela una disminución significativa en la actividad proteolítica de esta enzima en el hipocampo del ratón TS. **B)** WB de lisados hipocampales que muestra la cuantificación de los niveles de expresión de las subunidades 20S y 19S en las que no se encuentran diferencias significativas entre animales TS vs. CO. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ . A la derecha de la figura B se muestran imágenes representativas del WB.

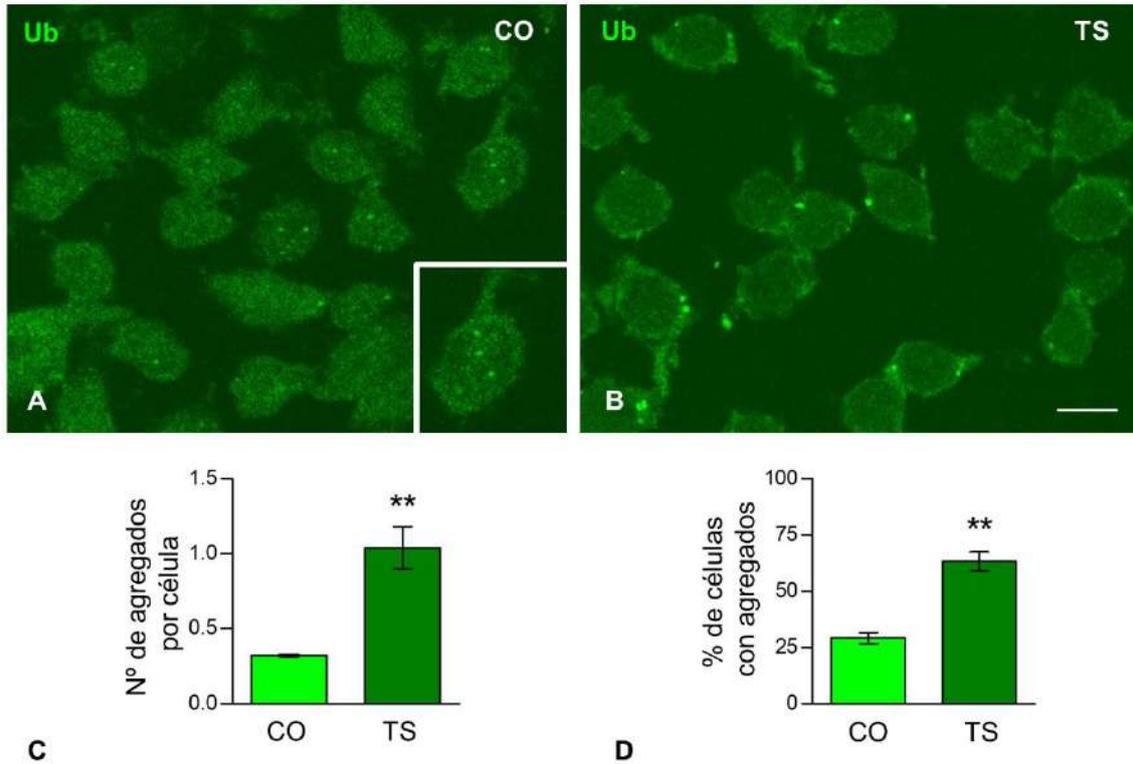
Posteriormente, con el fin de analizar posibles alteraciones en la distribución de la subunidad catalítica 20S del proteasoma, se realizó una inmunofluorescencia sobre *squashes* de CG del hipocampo de ratones CO y TS utilizando el anticuerpo PSMB5 que reconoce la subunidad  $\beta$  tipo 5 del proteasoma. Las imágenes revelaron una tinción preferentemente nuclear, que excluía el nucleolo, en los ratones de ambos cariotipos (Figura 34). En las CG del ratón CO se podían apreciar abundantes focos muy positivos para la subunidad 20S del proteasoma (Figura 34A). Estos focos se corresponden con factorías proteolíticas del sistema UPS denominadas “clastosomas”, que concentran proteasomas activos y proteínas ubiquitinadas que serán sustrato del proteasoma. Sin embargo, estos focos aparecían con menor frecuencia en las CG del hipocampo del ratón TS (Figura 34B). De acuerdo con estas observaciones, el análisis

cuantitativo del número de clastosomas por célula demostró una disminución significativa en las CG de los ratones TS en comparación con los euploides (Figura 34C).



**Figura 34. Las CG del hipocampo del ratón TS presentan una reducción en el número de factorías de degradación proteica dependientes del proteasoma. A-B)** Imágenes representativas del inmunomarcaje con PSMB5, que reconoce la subunidad 20S del proteasoma. Nótese la mayor frecuencia de focos positivos de PSMB5 en las CG del ratón CO. **C)** El análisis cuantitativo del número de clastosomas por célula demostró una reducción significativa de estas factorías de degradación proteica en las CG del hipocampo del ratón TS. Escala: 10 μm. Los datos representan las medias ± EEM. \* $p < 0.05$ .

Dado que la proteólisis a través del UPS es principalmente, pero no exclusivamente, de proteínas poliubiquitinadas, se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconoce complejos proteína-ubiquitina en disociados de CG del giro dentado de animales de ambos cariotipos. Como se ilustra en la figura 35AB, las CG de ratones CO y TS presentan una señal difusa tanto en el núcleo como en citoplasma celular. Además, las CG del ratón CO presentan con más frecuencia focos nucleares de proteínas ubiquitinadas, que se corresponden con clastosomas en los que estos complejos de proteínas ubiquitinadas se acumulan para ser degradados por las factorías proteolíticas. Sin embargo, la inmunotinción de proteínas ubiquitinadas en las CG de los ratones trisómicos muestra abundantes focos muy brillantes y bien definidos, pero en el citoplasma celular. Estos agregados o inclusiones citoplasmáticas de proteínas ubiquitinadas podrían corresponder a “agresomas”, agregados de proteínas dañadas o mal plegadas, que se encuentran poliubiquitinadas pero no pueden ser degradados por la vía proteasomal. La cuantificación del marcaje reveló un incremento significativo del número de estos agregados o inclusiones por célula (Figura 35C), así como del porcentaje de CG que presentaban estos agregados (Figura 35D), en el giro dentado del ratón trisómico en comparación con el ratón CO, lo que sugiere una disfunción en el UPS del ratón TS.



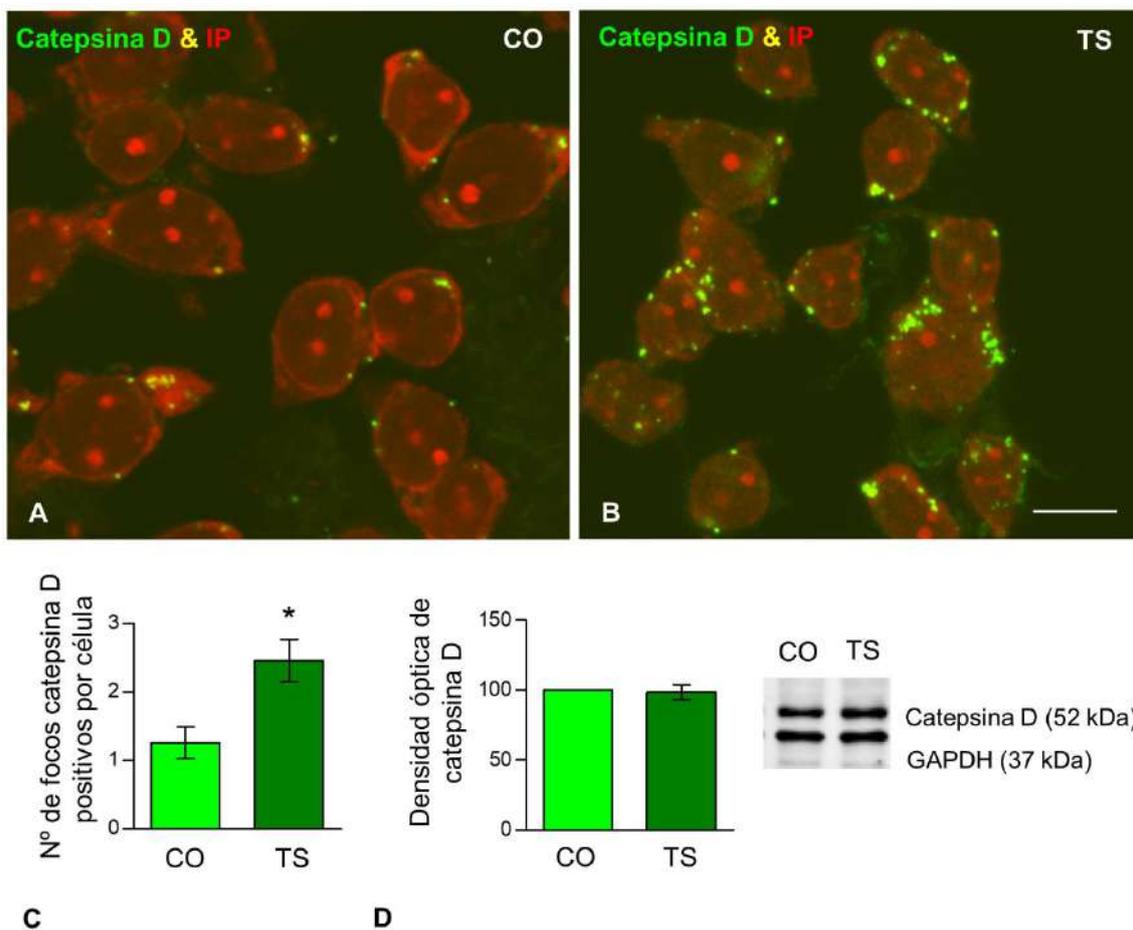
**Figura 35. Acumulación de agregados de proteínas ubiquitinadas en el citoplasma de las CG del hipocampo del ratón TS. A-B)** Inmunomarcaje de complejos proteína-ubiquitina en *squashes* de CG del hipocampo de ratones CO y TS. Nótese la presencia de focos Ub positivos nucleares en las CG de ratones euploides, mientras que son predominantemente citoplasmáticos en las CG de los ratones TS. **C-D)** Análisis cuantitativo del número de agregados por célula (**C**) y del porcentaje de CG que presentan estos agregados (**D**) que revela un incremento significativo de ambos parámetros en disociados celulares de ratones TS. Escala: 10  $\mu$ m. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM. \*\* $p < 0.01$ .

### 5.2.3.2. Disfunción del sistema lisosomal

Estudios en el SD también sugieren que el exceso de estrés oxidativo produce la oxidación de componentes específicos del sistema autofágico-lisosomal alterando su funcionalidad, agravando su inhibición y favoreciendo la disfunción de la proteostasis celular (Lanzillotta y Di Domenico, 2021).

Para evaluar la respuesta lisosomal temprana al exceso de estrés oxidativo y de peroxidación lipídica en las CG del ratón TS, en primer lugar, se evaluó la expresión de catepsina D, un marcador molecular de lisosomas. Para ello, sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS, se combinó un inmunomarcaje con un anticuerpo que reconoce catepsina D con la tinción con IP. En las imágenes se puede observar cuerpos catepsina D positivos en el citoplasma de las CG, tanto del ratón CO como del TS (Figura 36AB). Mientras que el ratón euploide presentaba cuerpos pequeños y redondeados, en las CG del ratón TS aparecían

frecuentemente focos más grandes y polimorfos. El análisis cuantitativo del número de cuerpos lisosomales catepsina D positivos reveló un incremento significativo de estos focos en el citoplasma de las CG del hipocampo de ratones TS respecto a los CO (Figura 36C). Sin embargo, al evaluar los niveles de expresión de catepsina D mediante Western blot, no se detectaron diferencias significativas entre los lisados proteicos de hipocampos de ratones CO y TS (Figura 36D). Estos resultados sugieren una acumulación anormal de estructuras lisosomales no funcionales en las CG del hipocampo del ratón TS sin un aumento paralelo en la degradación de proteínas dependiente de catepsina D.

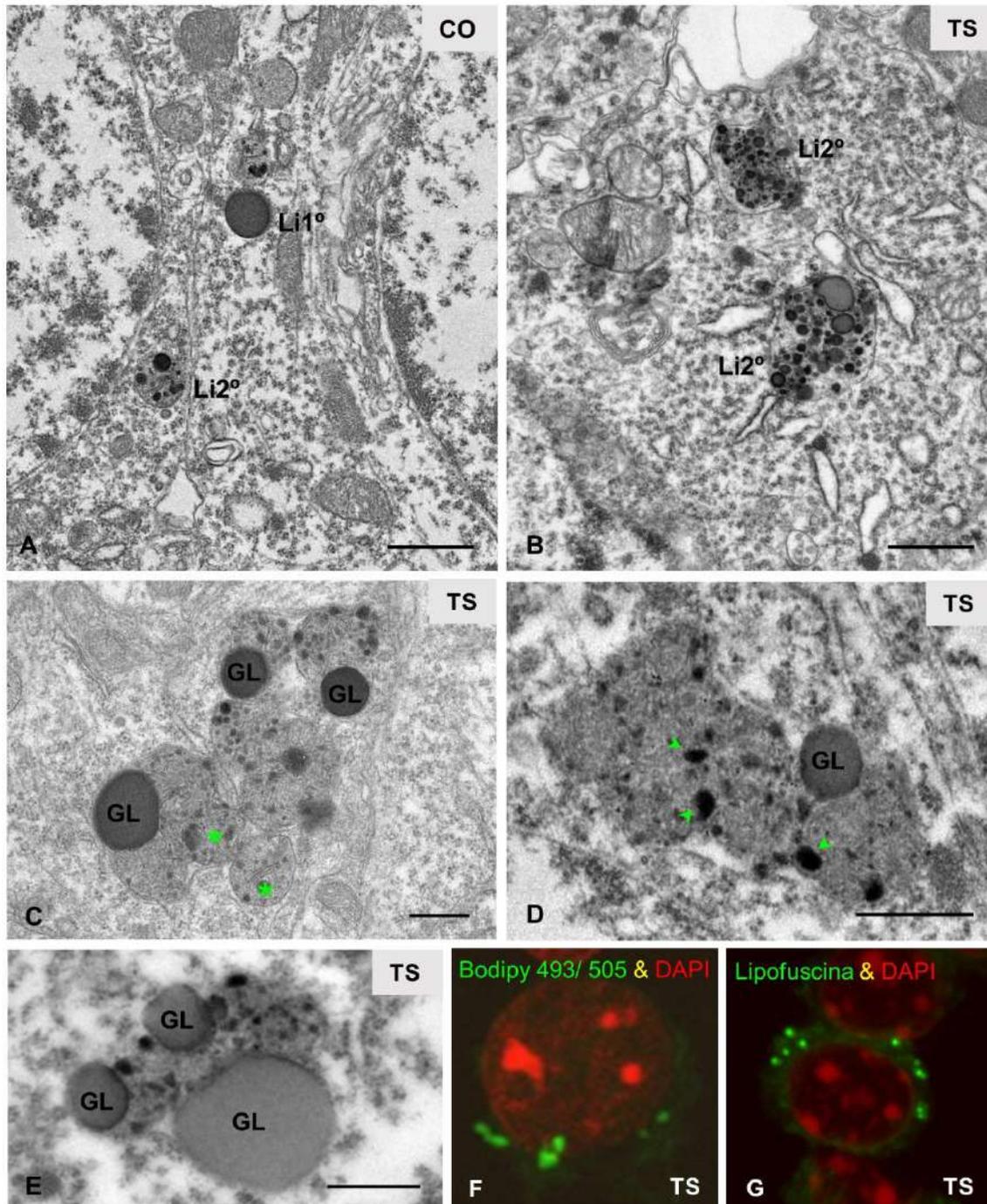


**Figura 36. Las CG del hipocampo del ratón TS presentan un incremento en el número de lisosomas catepsina D positivos que no se correlaciona con cambios en la expresión proteica de esta enzima en lisados hipocampales totales. A-B)** Imágenes representativas de una inmunofluorescencia de catepsina D sobre disociados de CG del hipocampo de ratones CO y TS. Nótese la presencia de lisosomas catepsina D positivos de mayor tamaño y polimorfos en los animales TS. **C)** Análisis cuantitativo del número de focos catepsina D positivos que demuestra un incremento significativo en las CG del hipocampo del ratón TS respecto al CO. **D)** El Western blot de catepsina D de lisados proteicos totales de hipocampo no revela cambios significativos en la expresión de esta proteína en ratones CO respecto a los TS. Escala: 10  $\mu$ m. Los datos representan las medias  $\pm$  EEM. \* $p < 0.05$ . A la derecha de la figura D se muestra una imagen representativa del WB.

Para investigar esta hipótesis evaluamos el fenotipo estructural de los lisosomas, un parámetro muy relacionado con su actividad funcional, mediante microscopía electrónica convencional. A los 6 meses de edad, las CG del ratón CO presentaban mayoritariamente estructuras lisosomales redondeadas y de electrodensidad homogénea, que corresponden a lisosomas primarios que no contienen material en degradación. Ocasionalmente, en los ratones CO también se observaban lisosomas secundarios pequeños que contenían pocos gránulos electrodensos de condensados proteicos en degradación. Sin embargo, las CG del ratón TS mostraban, mayoritariamente, lisosomas secundarios grandes y polimorfos (Figura 37B), también denominados cuerpos residuales. Estos lisosomas presentan una estructura interna heterogénea y que contenía cuerpos muy electrodensos de diferente forma y tamaño que corresponden a agregados de proteínas condensadas (Figura 37A). Además, estos lisosomas se agrupaban frecuentemente formando *clusters*. Estos cuerpos intra-lisosomales observados en las CG del ratón TS incluían: i) dominios redondeados electrolúcidos que corresponden a gotas lipídicas (Figura 37C-E), ii) gránulos muy electrodensos de tamaño y forma variable que se corresponden con agregados proteicos (Figura 37C-E) y iii) estructuras membranosas (Figura 37C).

Para corroborar la existencia de gotas lipídicas en el citoplasma de las CG del hipocampo del ratón TS se llevó a cabo una tinción *in situ* con Bodipy 493/505, un marcador específico de cuerpos lipídicos, sobre disociados celulares. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran una abundante presencia de cuerpos lipídicos en el citoplasma de las CG del ratón TS (Figura 37F). Además, una fracción de estas gotas lipídicas intralisosomales encontradas en las CG de los ratones TS podría corresponder al almacenamiento de lípidos peroxidados teñidos con el Bodipy C11 (Figura 27). Además, alguno de los cuerpos grandes que presentan varias gotitas de lípidos encontrados en las CG del hipocampo del ratón TS podrían corresponderse con gránulos residuales de lipofuscina que contienen lípidos y proteínas oxidados no digeribles que resultan altamente tóxicos para la célula. De hecho, algunos cuerpos citoplasmáticos en las CG del ratón TS mostraron una fuerte autofluorescencia con microscopía confocal (Figura 37G), una característica típica de los gránulos de lipofuscina (Ruiz-Soto et al., 2020).

En su conjunto, la acumulación temprana de estos lisosomales aberrantes o cuerpos residuales llenos de lípidos peroxidados es consistente con la disfunción lisosomal descrita en el SD que podría contribuir a alteraciones en la proteostasis en las CG del giro dentado del ratón TS.



**Figura 37. Alteraciones morfológicas relacionadas con el sistema lisosomal en las CG del hipocampo del ratón TS.** **A)** Panorámica del citoplasma de una CG del hipocampo de un ratón euploide que muestra la presencia de lisosomas primarios (Li1°) y lisosomas secundarios (Li2°). **B)** Imagen representativa del citoplasma de una CG del ratón TS en la que se observa el predominio de lisosomas secundarios. **C-E)** Agregados de estructuras lisosomales de gran tamaño y aspecto polimorfo. Nótese la presencia de estructuras intralisosomales: gotas lipídicas (GL), estructuras membranosas (asterisco) y cuerpos electrodensos (punta de flecha). **F)** Combinación de la tinción con Bodipy 493/503 con DAPI, que confirma la presencia de gotas lipídicas en las CG del hipocampo del TS. **G)** Focos autofluorescentes de lipofuscina contrastado con DAPI que demuestra el aumento de este pigmento en las CG del hipocampo del ratón TS. Escala de A-B: 1 µm C-E: 500 nm.



## **6. Discusión**

---



La disfunción cognitiva es el rasgo más sobresaliente tanto del SD como del ratón TS y, en concreto, la memoria y el aprendizaje dependientes del hipocampo están particularmente afectados (Antonarakis et al., 2020; Bartesaghi et al., 2011; Gupta et al., 2016). Desde etapas tempranas del neurodesarrollo el hipocampo de las personas con SD presenta alteraciones anatómicas, morfológicas, fisiológicas y neuroquímicas que afectan a diversas poblaciones neuronales y alteran el correcto funcionamiento de esta estructura (Antonarakis et al., 2020; Bartesaghi et al., 2011; Rueda et al., 2012). Entre estas alteraciones destacan la hipocelularidad, causada principalmente por defectos en el proceso de neurogénesis, así como las anomalías en la conectividad sináptica ocasionadas por alteraciones en espinas, dendritas y en diversos componentes de las sinapsis (Contestabile et al., 2009; Rueda et al., 2020). Además, tanto en las personas con SD como en el ratón TS, todas estas alteraciones se agravan con el envejecimiento, debido a la aparición de diversos procesos neuropatológicos, como el estrés oxidativo, el desarrollo de una neuropatología de tipo EA y la neuroinflamación que deterioran aún más la cognición (Lott, 2012; Lott y Dierssen, 2010; Wilcock y Griffin, 2013).

Por lo tanto, los déficits cognitivos encontrados en el SD y en el ratón TS se deben a dos factores: i) El **exceso de dosis génica**, que implica alteraciones en los patrones de expresión de múltiples genes que se encuentran tanto en triple como en doble dosis, produciendo la alteración de procesos celulares esenciales implicados en el correcto mantenimiento de la homeostasis celular (Kahlem et al., 2004; Maass et al., 2019b). ii) El desarrollo de procesos neuropatológicos como el **estrés oxidativo**, que está presente desde etapas tempranas del neurodesarrollo y daña elementos celulares, acelera la neurodegeneración y el desarrollo de la neuropatología de tipo EA contribuyendo al deterioro cognitivo característico del SD (Martínez-Cué y Rueda, 2020b; Perluigi et al., 2014; Piccoli et al., 2013).

Por ello esta Tesis Doctoral está dividida en dos estudios:

i) En el primer estudio hemos evaluado alteraciones causadas por el exceso de dosis génica sobre diversos compartimentos nucleares (nucleolos, cromatina, cuerpos nucleares de Cajal) que son esenciales para mantener la homeostasis neuronal en las CG del hipocampo de los animales TS (apartado 5.1).

ii) En el segundo estudio hemos evaluado alteraciones asociadas al exceso de estrés oxidativo sobre componentes celulares (daño en el DNA, proteasoma y sistema autofágico-lisosomal) que son esenciales para mantener la homeostasis neuronal en las CG del hipocampo de los animales TS (apartado 5.2).

### **6.1. Alteraciones en la arquitectura nuclear de las CG del ratón TS causadas por el exceso de dosis génica**

Los resultados obtenidos en el primer estudio del presente trabajo de Tesis Doctoral indican que la triplicación de un segmento del Mmu16 presente en el ratón TS produce alteraciones en la arquitectura nuclear de las CG del hipocampo, particularmente en los compartimentos nucleares encargados de la transcripción y procesamiento de pre-rRNA y pre-mRNA. Esta reorganización nuclear de las CG implica alteraciones en: i) la regulación epigenética de la cromatina, tanto de su estructura como de su función, produciendo un incremento de la heterocromatina y una reducción global de la transcripción, ii) el patrón de fusión nucleolar, que conlleva un incremento en el número de nucleolos, iii) el ensamblaje de los CB, que están involucrados en el *splicing* de pre-mRNAs.

Además de la desregulación en la expresión génica causada por la trisomía de algunos genes en este modelo de SD (Sheltzer et al., 2012), estos resultados indican que la copia extra del segmento del Mmu16 produce, por sí misma, la reorganización tridimensional del genoma dentro del núcleo de las CG del hipocampo del ratón TS. Las modificaciones en la arquitectura nuclear producen alteraciones en la posición de los cromosomas, así como en las interacciones intra- e intercromosómicas. Dada la estrecha relación que existe entre la disposición del genoma y su regulación, los cambios en la posición cromosómica o en sus interacciones podrían causar alteraciones en la expresión génica, resultando en una disminución de la transcripción global, como la observada en las CG de nuestro modelo. De esta manera, los cambios en la distribución tridimensional del genoma podrían contribuir a las alteraciones neuromorfológicas y funcionales presentes en las CG del hipocampo de este modelo de SD. Las alteraciones en la arquitectura nuclear de las CG del ratón TS se producen durante la maduración. En esta etapa, las neuronas postmitóticas sufren una reorganización espacial de los cromosomas para llegar a la disposición tridimensional específica y característica de las neuronas maduras diferenciadas (Ito y Takizawa, 2018). Por tanto, el establecimiento y mantenimiento de esta organización espacial y de los programas de expresión génica característicos de las CG del hipocampo son procesos esenciales para asegurar sus funciones específicas, entre las que destacan el procesamiento de información y la formación de nuevas memorias declarativas (Contestabile et al., 2007b; Giacomini et al., 2018; Kleschevnikov et al., 2017).

### **6.1.1. Reducción del tamaño nuclear e incremento de la heterocromatinización en las CG del ratón TS**

En este estudio, observamos que las CG del giro dentado, tanto del ratón CO como del TS, tienen una morfología normal, típica de esta población neuronal, con un núcleo pequeño con masas prominentes de heterocromatina, correspondiente a la cromatina transcripcionalmente inactiva, y un nucleolo pequeño y compacto. El tamaño nuclear se ha correlacionado positivamente con el contenido de DNA y la ratio de transcripción global (Pena et al., 2001a; Webster et al., 2009; Yazdani et al., 2012a). Por tanto, la reducción del tamaño nuclear encontrada en las CG del hipocampo del ratón TS es consistente con los grandes bloques de heterocromatina y con la reducción global de la transcripción que presenta esta población neuronal en nuestro modelo animal. Además, Yazdani et al. (2012) describieron una reducción del tamaño nuclear y de la síntesis de RNA en ausencia de methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) en progenitores neurales diferenciados (Yazdani et al., 2012a). Esta proteína reconoce regiones metiladas y no metiladas en el genoma y actúa como un regulador epigenético de la expresión génica, reprimiendo o activando genes específicamente en función del contexto en el que se encuentre la célula (Hansen et al., 2010). De acuerdo con la estrecha relación entre la regulación epigenética de la cromatina y el tamaño nuclear, en las CG del ratón TS encontramos un incremento significativo de la histona H4 trimetilada, un marcador de dominios de cromatina transcripcionalmente inactivos (Karachentsev et al., 2005; Shoaib et al., 2018), y una disminución de la histona H4 acetilada, que marca cromatina transcripcionalmente activa, que correlaciona con el menor tamaño nuclear encontrado en las GC de nuestro modelo. Además, las CG del ratón TS presentaban un incremento en la expresión de dos genes relacionados con la organización de la cromatina, *Mecp2* y *H1f0* (Flanagan y Brown, 2016; Singleton et al., 2011; Zhang et al., 2015). En este contexto, la compactación de la cromatina en forma de heterocromatina encontrada en las CG del ratón TS podría producir una disminución de la porción del volumen nuclear ocupado por el territorio cromosómico, dando lugar a una reducción del tamaño nuclear, tal y como se ha descrito en otras enfermedades neurodegenerativas (Castillo-Iglesias et al., 2019).

### **6.1.2. Descenso de la transcripción global en las CG del hipocampo del ratón TS**

Dado que las CG del hipocampo del TS presentaban una reducción en su tamaño nuclear, así como un incremento en el patrón de heterocromatinización, parecía razonable pensar que estas alteraciones podrían inducir cambios en la actividad transcripcional de esta población neuronal. Para evaluar la transcripción global se llevó a cabo un ensayo basado en la incorporación de 5'-FU en el RNA naciente y se comprobó que las CG del hipocampo presentaban una reducción en

esta ratio. Como la incorporación de 5'-FU ocurre en los dominios de cromatina transcripcionalmente activa, parece razonable pensar que la disminución de la expresión génica corresponde principalmente a genes que codifican para proteínas. Sin embargo, una pequeña contribución a la caída de la transcripción también podría deberse a genes no codificantes. Además, de acuerdo con la reducción de la transcripción global en las CG del ratón TS, también se detectó una disminución de la histona H4 acetilada, un marcador de cromatina transcripcionalmente activa (Zhang et al., 2015), mediante estudios de inmunofluorescencia y Western blot. En su conjunto, estos datos indican una reducción en la transcripción global de las CG del hipocampo del ratón TS.

Las células aneuploides, además de presentar una gran complejidad en la regulación de la expresión génica, suelen mostrar un descenso en la capacidad de proliferación celular (Sheltzer et al., 2012). Así, los fibroblastos de embriones de ratones con una porción triplicada del Mmu16 muestran una sobreexpresión de genes con un papel fundamental en la respuesta al estrés celular y una disminución en la expresión de genes implicados en el ciclo celular, la replicación del DNA y la segregación cromosómica (Sheltzer et al., 2012). Estas modificaciones transcripcionales podrían alterar la neurogénesis de las CG del hipocampo, produciendo una reducción en el número de neuronas maduras, una característica que ha sido ampliamente descrita en el ratón TS (Contestabile et al., 2007; García-Cerro et al., 2017; Stagni et al., 2018).

En relación con el impacto que produce la triplicación del cromosoma Mmu16 sobre la transcripción global en el SNC, Kahlem et al. (2004) describieron un incremento de los transcritos en la mayoría de los genes triplicados en el cortex cerebral y en el cerebelo del ratón TS, indicando una sobreexpresión proporcional al número de copias del gen. Sin embargo, algunos de estos genes triplicados presentaban un descenso en su expresión, lo que sugiere la participación de mecanismos de regulación génica adicionales (Kahlem et al., 2004). Dado que en el SD y en el ratón TS, los genes triplicados representan una pequeña fracción del genoma, nuestros resultados, en su conjunto, demuestran una reducción significativa de la transcripción global. Esta respuesta transcripcional encontrada en las CG del ratón TS podría deberse a dos factores: i) Los cambios en la arquitectura nuclear y el reordenamiento cromosómico, debidos al exceso de dosis génica, podrían alterar las interacciones normales entre los genes, lo que resultaría en una disminución de la expresión génica global. Así, en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo del ratón TS se ha descrito una reducción en la expresión de diferentes genes disómicos implicados en la supervivencia (Maass et al., 2019). ii) En las células aneuploides de mamíferos una característica típica es la alteración en la regulación de los genes de respuesta al estrés celular (Sheltzer et al., 2012). Así, es bien conocido que el estrés celular

induce una represión transcripcional de miles de genes dependientes de la actividad de la RNA polimerasa II, excluyendo los genes de respuesta al estrés que suelen estar sobreexpresados (Vihervaara et al., 2018).

Además, la expresión alterada de algunos genes del HSA21 que también están triplicados en el ratón TS, podría contribuir al incremento de la heterocromatinización y a la disminución de la transcripción global que se describe en las CG del TS. Entre ellos, podemos destacar el gen *Hlcs* que cataliza la biotinización de algunas histonas e induce la condensación de la cromatina y la represión de algunos genes (Pestinger et al., 2011; Singh et al., 2013). Además, otros genes triplicados en el ratón TS como *Dyrk1A* y *Runx1* codifican para proteínas que podrían alterar el patrón epigenético de la cromatina en el núcleo de las CG del hipocampo de este modelo experimental (Antonarakis et al., 2004; Bakshi et al., 2010).

### **6.1.3. Alteraciones en el número de nucleolos y en el patrón de fusión nucleolar en las CG del ratón TS**

En relación con las alteraciones nucleolares de las CG del ratón TS encontradas en este estudio, una característica llamativa es el incremento significativo del número de nucleolos por célula. Hay dos factores que pueden contribuir a esta alteración en las CG maduras: el número de NOR y el patrón de fusión nucleolar. En las células eucariotas, al comienzo de la telofase, comienza la transcripción del rRNA y la formación de nucleolos alrededor de las NOR. Al inicio de este proceso se forman múltiples nucleolos pequeños que después se fusionarán en uno o dos grandes nucleolos que contienen varias NOR (Hernandez-Verdun et al., 2010; Mcstay, 2016; Savino et al., 2001). Las células euploides de ratón poseen 6 cromosomas acrocéntricos con regiones codificantes para NOR (12,15, 16, 17, 18 y 19), cuyas secuencias se encuentran cerca de la región telomérica (Mcstay, 2016). Sin embargo, mientras que en las personas con SD la triplicación del HSA21 proporciona un NOR adicional, la porción triplicada del Mmu16 no contiene ninguna de estas regiones (Antonarakis et al., 2004). Por lo tanto, este incremento en el número de nucleolos en las CG del giro dentado del ratón TS no está causado por la presencia de un exceso de NOR.

En cuanto a la fusión nuclear, los mecanismos celulares y moleculares que regulan este proceso no se conocen en su totalidad. Sin embargo, existe evidencia de que es un proceso celular que implica la reorganización espacial dentro del núcleo de los cromosomas portadores de las NOR (Mcstay, 2016). De hecho, experimentos realizados en células humanas durante la fase G1 temprana han mostrado desplazamientos cromosómicos dependientes de ATP de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  y, también, que los nucleolos generalmente se mueven y colocan alejados entre sí

(Zidovska et al., 2013; Caragine et al., 2019). Sin embargo, los nucleolos se coordinan y ralentizan sus movimientos cuando se van a fusionar. Teniendo en cuenta que el rDNA nucleolar está físicamente unido a las fibras de cromatina de los cromosomas portadores de NOR, el movimiento nucleolar estaría implicado en la reorganización tridimensional de los cromosomas dentro del núcleo celular (Caragine et al., 2019). Además, se ha propuesto que la viscosidad del nucleoplasma alrededor del nucleolo, así como la interacción del nucleolo con la cromatina circundante, establece la escala de tiempo de la fusión nucleolar (Caragine et al., 2019).

En este contexto, se propone que las alteraciones en la arquitectura nuclear y los cambios epigenéticos en la cromatina, asociados al exceso de dosis génica, presentes en las CG del ratón TS interfieren con el patrón normal de fusión nucleolar y causan un incremento en el número de nucleolos (Carmo-Fonseca, 2015; Caudron-Herger et al., 2015; Falahati et al., 2016). La nucleolina, además de tener un papel fundamental en la transcripción del rRNA, está implicada en el ensamblaje de los nucleolos. Por ello, el incremento en la expresión de nucleolina en el hipocampo ratón TS, puede deberse al mantenimiento del elevado número de nucleolos en estos animales. Además, la nucleolina es una proteína multifuncional y, aunque se encuentra concentrada mayoritariamente en el nucleolo, también hay una fracción de ésta en el nucleoplasma (Baltanás et al., 2019; Das et al., 2013) que podría estar involucrada en la biogénesis de un mayor número de nucleolos en las CG del ratón TS.

Además, mientras que las neuronas grandes de los mamíferos son en su mayoría, mononucleoladas, las neuronas de menor tamaño con una actividad transcripcional menor suelen tener varios nucleolos. Este hecho sugiere que hay una correlación negativa entre la actividad transcripcional y el número de nucleolos en las neuronas de mamíferos (Berciano et al., 2007; Pena et al., 2001). Así, el hecho de tener un único nucleolo permite concentrar todos los genes ribosomales y la maquinaria molecular para la transcripción y el procesamiento de los rRNA en un único dominio nucleolar, lo que aumenta potencialmente las interacciones moleculares requeridas para la actividad nucleolar.

Otro dato que apoya la hipótesis de la reorganización espacial de los cromosomas portadores de NOR en el núcleo de las CG del ratón TS es el cambio en la distribución normal de los Ag-NOR. Las NOR se identificaron mediante una tinción argéntica, que reconoce algunas proteínas argirófilas asociadas al rDNA (Mcstay, 2016; Zatsepina, 2019). En los núcleos de las CG del ratón TS, además de la presencia de los típicos Ag-NOR asociados a los nucleolos, también observamos un incremento de pequeños puntos argirófilos extranucleolares. Este resultado sugiere que la trisomía parcial del Mmu16 en el ratón TS produce cambios posicionales

de los cromosomas portadores de NOR dentro del núcleo celular, alterando el patrón de fusión nucleolar.

Dado que el incremento en el número de nucleolos podría relacionarse con alteraciones en la transcripción del rRNA, a continuación, evaluamos los niveles de expresión de diferentes fragmentos de rRNA en el hipocampo de ratones CO y TS. Los resultados no mostraron cambios significativos en la expresión del precursor 45S ni de los rRNA maduros 18S y 28S, así como de sus respectivos precursores (18S-5'J y 28S-5'J) en comparación con los ratones euploides. Estos datos sugieren que la transcripción de los genes ribosomales no está alterada en las CG de los ratones TS. De manera consistente con estos resultados, tampoco se hallaron variaciones significativas en la expresión hipocampal de genes que codifican para las proteínas nucleolares UBF, fibrilarina y nucleofosmina entre ratones CO y TS. El mantenimiento de la transcripción de genes ribosomales en las CG del TS puede deberse a un mecanismo compensatorio del nucleolo frente a la reducción global de la transcripción de genes codificantes de proteínas, con el objetivo de preservar la biogénesis ribosomal y la actividad traduccional. De manera similar a lo que se propone en este trabajo, este tipo de respuestas nucleolares compensatorias también se han descrito en: i) motoneuronas espinales en un modelo animal de atrofia muscular espinal (Tapia et al., 2017), ii) neuronas ganglionares sensitivas sometidas a condiciones de estrés proteotóxico (Palanca et al., 2014) y iii) en algunas poblaciones neuronales de pacientes con EA (Hernández-Ortega et al., 2016). En conclusión, el incremento en el número de nucleolos en las CG del giro dentado del ratón TS no se correlaciona con un incremento de la transcripción nucleolar hipocampal.

#### **6.1.4. Alteraciones en el número de cuerpos nucleares de Cajal y redistribución de la coilina en las CG del ratón TS**

Otro hallazgo importante es el cambio en la organización de los CB en las CG del TS con dos notables manifestaciones: en primer lugar, la reducción significativa del número de CB canónicos y, en segundo lugar, el incremento en la incidencia de casquetes perinucleolares de coilina que no contienen snRNP. Los CB son organelas nucleares muy dinámicas dependientes de la actividad transcripcional (Machyna et al., 2013, 2014; Shevtsov y Dundr, 2011; Wang et al., 2016). En neuronas post-mitóticas con una alta demanda transcripcional y de *splicing*, los CB juegan un papel fundamental en la biogénesis de snRNPs (Gall, 2003; Lafarga et al., 2018; Machyna et al., 2013). Numerosas condicionales experimentales o patológicas en las que se produce estrés celular, inhibición de la transcripción, daño en el DNA o alteraciones en el *splicing* han descrito que este estrés da lugar a alteraciones o a reducción en el número de CB (Cioce et

al., 2006; Gilder et al., 2011; Lafarga et al., 2018; Tapia et al., 2017). Por lo tanto, la reducción en el número de CB encontrada en las CG del TS es consistente con la disminución en la transcripción global y un aumento en el estrés celular y, consecuentemente, con una reducción de la demanda de *splicing* de pre-mRNA. Además, los conocimientos actuales sobre el ensamblaje de los CB indican que se forman en loci activos de snRNA o snoRNA y de genes de histonas (Arias Escayola y Neugebauer, 2018; Wang et al., 2016b) lo que podría sugerir que la reducción de la transcripción de estos genes contribuye directamente a un descenso en el número de CB.

Por otro lado, el incremento en la formación de casquetes perinucleolares de coilina indica un defecto en el proceso de ensamblaje de los CB. En este proceso están implicadas diversas modificaciones post-traduccionales de proteínas del CB como la SMN o la coilina (Hebert y Poole, 2017; Lafarga et al., 2018). Por ejemplo, la metilación de la coilina es un factor regulador clave del ensamblaje de los CB (Hebert et al., 2002). En neuronas de mamíferos se ha demostrado que una reducción en la metilación de la coilina puede causar un cambio en su localización tras la inhibición de metilación de proteínas o la reducción de SMN (Navascues et al., 2008; Tapia et al., 2017).

En resumen, todos estos resultados indican que la triplicación de un segmento del Mmu16 presente en el ratón TS produce alteraciones en la arquitectura nuclear de las CG que podrían ser parcialmente responsables de las alteraciones funcionales dependientes del hipocampo encontrados en estos ratones.

## **6.2. Alteraciones celulares asociadas al incremento de estrés oxidativo en las CG hipocampales del ratón TS**

Los resultados obtenidos en el segundo estudio del presente trabajo de Tesis Doctoral confirman la existencia de anomalías celulares asociadas al incremento de estrés oxidativo en las CG del hipocampo del ratón TS a los 6 meses de edad. En concreto, el exceso de estrés oxidativo provoca alteraciones en dos sistemas esenciales para el mantenimiento de la homeostasis neuronal: la DDR y la proteostasis celular, particularmente, el UPS y el sistema lisosomal. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que las CG del hipocampo del TS presentan: i) un aumento del daño en el DNA, ii) una reorganización de las factorías proteolíticas en el núcleo celular acompañada de un descenso de la actividad del proteasoma y acúmulos de proteínas poliubiquitinadas en el citoplasma, iii) una modificación en la organización lisosomal en el citoplasma celular con la aparición de agregados lisosomales que contienen gotas lipídicas y productos citotóxicos oxidados y iv) alteraciones ultraestructurales en las mitocondrias. Todas

estas alteraciones generadas por el exceso de estrés oxidativo en las CG del hipocampo del ratón TS pueden comprometer el correcto funcionamiento neuronal, favorecer la neurodegeneración y el desarrollo de la neuropatología de tipo EA y, por tanto, contribuir a los déficits de memoria y aprendizaje dependiente del hipocampo que presenta este modelo de SD tanto en etapas tempranas como tardías de su vida.

### **6.2.1. El incremento de estrés oxidativo en el hipocampo del ratón TS se asocia con una respuesta antioxidante alterada, altos niveles de peroxidación lipídica y alteraciones mitocondriales en las CG**

En el SD el incremento del estrés oxidativo está presente desde etapas tempranas del neurodesarrollo y se debe, en parte, a la triplicación de algunos genes que directa o indirectamente están implicados en el mantenimiento de la homeostasis redox. Así, los cambios en la expresión de estos genes se relacionan con un exceso en la producción de ROS o con defectos en la respuesta antioxidante lo que, en conjunto, causa un desequilibrio redox y la acumulación de daño oxidativo (Lanzillotta y Domenico, 2021; Perluigi et al., 2011; Rueda y Martínez-Cué, 2020). De acuerdo con la presencia de una copia extra del gen *Sod1* en los ratones TS, se comprobó la sobreexpresión de la enzima SOD1 en el hipocampo de estos animales. Estos resultados, son consistentes con trabajos previos de este laboratorio que demostraron un incremento en la actividad enzimática de SOD1 a los 6 meses en este modelo experimental (Corrales et al., 2017). Por tanto, el aumento de SOD1 en el hipocampo del ratón TS podría dar lugar a una mayor producción de peróxido de hidrógeno y otras ROS con alto potencial oxidante en la célula. Además de la sobreexpresión de SOD1, también se detectó una disminución en los niveles hipocampales de *Nrf2*, un gen implicado en la respuesta antioxidante neuronal que regula la expresión de múltiples enzimas antioxidantes (Di Domenico et al., 2012). Estudios previos han demostrado que la sobreexpresión del gen *Batch1*, que está triplicado en el SD, está asociada a una disminución de la expresión de *Nrf2*, disminuyendo su fosforilación en la serina 40 y, por tanto, reduciendo la expresión de genes antioxidantes (Lanzillotta y Di Domenico, 2021). Por lo tanto, la disminución de la expresión de *Nrf2* puede causar una respuesta antioxidante ineficiente en el hipocampo de los ratones TS que exacerba el estrés oxidativo en esta estructura, lo que comprometería aún más la homeostasis neuronal y una correcta función hipocampal.

Como se ha discutido anteriormente en el estudio 1, el exceso de dosis génica presente en el SD produce alteraciones en la arquitectura nuclear y en el patrón epigenético en las CG del hipocampo del ratón TS que afectan a funciones nucleares básicas como la transcripción y

procesamiento de pre-mRNA y pre-rRNA (Bodai, 2022; Puente-Bedia et al. 2021). En este contexto, las alteraciones en la transcripción y procesamiento del RNA se postulan como un mecanismo clave para integrar el estrés celular, como el ocasionado por el exceso de estrés oxidativo, al perfil de expresión génica. Además del efecto que tiene el exceso de dosis génica sobre la desregulación de la expresión de los genes, en el estudio anterior se propone que la triplicación parcial de un fragmento del Mmu16 en el ratón TS puede causar por sí mismo alteraciones en la expresión de genes que están en disomía y que podrían estar involucrados en la homeostasis redox o en el control de la calidad proteica. Así, este efecto también podría contribuir al exceso de estrés oxidativo que presenta el ratón TS en el hipocampo (Corrales et al., 2014; 2017; Shichiri et al., 2011; Parisotto et al., 2016).

En el SD, también se ha descrito una importante disfunción mitocondrial que se asocia al incremento de estrés oxidativo y que, por tanto, contribuye a los déficits cognitivos (Bordi et al., 2019; Izzo et al., 2018 Mollo et al., 2020;). En concreto, se han descrito anomalías morfológicas y funcionales en las mitocondrias de fibroblastos y de cerebros de individuos con SD, así como en modelos experimentales de SD (Izzo et al., 2018; Piccoli et al., 2013). En este contexto, los resultados de este estudio confirman la existencia anomalías ultraestructurales en las mitocondrias de las CG del hipocampo del ratón TS. Concretamente, se observan mitocondrias de gran tamaño y con morfología multilobulada, así como una desorganización de las crestas mitocondriales y vacuolización de la matriz mitocondrial. Estos resultados sugieren una acumulación de mitocondrias aberrantes y/o defectuosas en las CG del ratón TS.

La eliminación de las mitocondrias dañadas implica la activación de una forma específica de autofagia, denominada mitofagia, que está regulada por la vía de señalización PINK1/Parkina. PINK1 es una quinasa que se acumula en la membrana externa de las mitocondrias dañadas. Entre sus funciones, se encuentra la activación de la Parkina, una ubiquitina ligasa E3 que añade una cadena corta de ubiquitinas a diversas proteínas en las mitocondrias defectuosas para iniciar el proceso de degradación por la vía mitofágica. En cultivos primarios de fibroblastos de humanos con SD se ha demostrado una acumulación de mitocondrias disfuncionales debido a defectos en la activación de la vía PINK1/Parkina (Bordi et al., 2019; Mollo et al., 2020). De acuerdo con estos datos, en este trabajo se ha demostrado un incremento significativo en los niveles de expresión de *Pink1* en el hipocampo de los ratones TS, indicando un aumento del daño mitocondrial en esta estructura. Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de expresión de *Parkina*. Debido a que la Parkina inicia la vía de la mitofagia, este desequilibrio en los niveles de expresión de *PINK1/Parkina* encontrado en el hipocampo de los animales TS podría indicar una mitofagia deficiente que daría lugar a la acumulación de mitocondrias disfuncionales y por tanto a una

mayor producción de ROS en esta estructura. Además de los defectos en la vía de PINK1/Parkina, en el hipocampo de ratones TS también se ha descrito la hiperactivación de la vía de señalización de mTOR como una de las causas de la inhibición de la autofagia (Bordi et al., 2019). Por último, en cuanto a la disfunción mitocondrial, de manera consistente a lo encontrado en individuos con SD (Mollo et al., 2020), en este estudio se observaban frecuentemente mitocondrias elongadas y polimórficas lo que sugiere una alteración en la dinámica de fusión y fisión de esta organela en las CG del hipocampo de los ratones TS (Mollo et al., 2020).

Tanto en las personas con SD como en el ratón TS, se han demostrado déficits en la producción energética mitocondrial desde etapas tempranas que se agravan progresivamente con el envejecimiento (Bayona-Bafaluy et al., 2021; Izzo et al., 2018; Piccoli et al., 2013; Valenti et al., 2022). Por lo tanto, las anomalías ultraestructurales observadas en las mitocondrias de las CG del hipocampo del ratón TS pueden contribuir a los déficits en la producción de energía necesaria para el correcto mantenimiento de procesos neuronales esenciales como la biosíntesis de neurotransmisores, la sinaptogénesis, el transporte axonal, la degradación proteica y la reparación del daño en el DNA.

El desequilibrio redox producido por el aumento en la producción de ROS y el deterioro de los sistemas antioxidantes da lugar a un incremento del daño oxidativo en diferentes biomoléculas como el DNA, los lípidos y las proteínas. En cuanto al daño oxidativo a lípidos, trabajos previos realizados en el ratón TS, demuestran que la peroxidación lipídica no afecta por igual a todas las regiones cerebrales. Mientras que el córtex del ratón TS muestra una mayor tolerancia o una mejor respuesta ante el estrés oxidativo, el hipocampo parece ser un área más susceptible de sufrir peroxidación lipídica (Corrales et al., 2017; Parisotto et al., 2016). Así, a los 4, 6 y 12 meses de edad, el hipocampo del ratón TS muestra un incremento de diferentes marcadores de lipoperoxidación como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, 4-hidroxinonenal y t8isoPGF2 $\alpha$  (Corrales et al., 2014; Parisotto et al., 2016; Shichiri et al., 2011). De acuerdo con estos estudios, en este trabajo se demuestra un incremento de la peroxidación lipídica, cuantificada mediante el número de focos y la intensidad de Bodipy C11, en las CG del hipocampo de los ratones TS a los 6 meses de edad.

### **6.2.2. El estrés oxidativo presente en las CG del hipocampo del ratón TS induce daño en el DNA**

En este estudio también se demuestra que, a los 6 meses de edad, las CG del hipocampo del ratón TS presentan un incremento de focos  $\gamma$ H2AX positivos, un marcador de DSB, la forma más

nociva de daño en el DNA. Este resultado sugiere que en esta población neuronal se produce un aumento en la producción de daño en el DNA y/o defectos en los mecanismos reparadores de este daño (Casafont et al., 2011; Chang et al., 2013; Jurk et al., 2012; Sharma et al., 2016). En las neuronas de mamíferos, las DSB se producen continuamente bajo condiciones fisiológicas (Casafont et al., 2011) debido principalmente a la excitotoxicidad o a los radicales libres que tienen potencial para producir daño oxidativo en el DNA (Chang et al., 2013; Crowe et al., 2011; Sharma et al., 2016). Además, otra fuente adicional de daño en el DNA es la actividad asociada a la transcripción de las topoisomerasas que producen DSB temporales (Madabhushi et al., 2015; Suberbielle et al., 2013). Por otro lado, la actividad de las topoisomerasas abortivas también produce lesiones en el DNA en síndromes neurodegenerativos (Gómez-Herreros et al., 2014; Katyal et al., 2014).

Numerosos trabajos describen que el incremento de daño en el DNA es un evento crítico en el envejecimiento del cerebro y en el desarrollo de patologías neurodegenerativas como la EA (Chow y Herrup, 2015; Madabhushi et al., 2014; Sedelnikova et al., 2004; Shadfar et al., 2022; Thadathil et al., 2021). En el caso del SD, donde ocurre un envejecimiento acelerado del cerebro y un desarrollo prematuro de la neuropatología del tipo EA, únicamente existen estudios de daño en el DNA en líneas celulares periféricas o células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de sujetos con SD (Murray et al., 2015). En el ratón TS se ha observado un incremento de daño oxidativo en el DNA de células satélite del músculo esquelético y de células madre de origen hematopoyético (Pawlikowski et al., 2018; Wang et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento, la evaluación del daño en el DNA no se ha llevado a cabo en el cerebro del ratón TS.

Los resultados de este estudio demuestran un incremento significativo en el número de focos  $\gamma$ H2AX positivos en las CG del ratón TS en comparación con los ratones euploides. Estos focos de daño son DSB de pequeño tamaño y se corresponden con focos de daño transitorios que normalmente se reparan y son eliminados en 24 horas después de la generación de la lesión gracias a la activación de la DDR, tal y como se ha demostrado en estudios cinéticos de DDR tras inducir daño en el DNA mediante irradiación en neuronas (Casafont et al., 2011; Olive y Banáth, 2004; Tang et al., 2021). Sin embargo, en las CG del hipocampo del ratón TS no se observaron grandes focos de daño  $\gamma$ H2AX positivos característicos de roturas en el DNA de doble cadena que no pueden ser reparados por los sistemas de reparación de daño y que dan lugar a focos de daño persistente en el núcleo celular (Mata-Garrido et al., 2016). Por tanto, a los 6 meses de edad se descarta la acumulación de daño en el DNA a largo plazo en el ratón TS. Además, el inmunomarcaje de la histona  $\gamma$ H2AX en las CG del hipocampo del ratón TS y el análisis ultraestructural de sus núcleos, descarta la existencia de una fragmentación del DNA

intranucleosomal con la formación de cuerpos apoptóticos. De acuerdo con esta observación, trabajos previos no detectan un incremento en el número de células apoptóticas en el hipocampo del ratón TS, ni en estadios tempranos ni en la etapa adulta, por lo que la muerte celular programada no parece ser el mecanismo responsable de la hipocelularidad hipocampal en este modelo animal (Contestabile et al., 2009; Lorenzi y Reeves, 2006; Rueda et al., 2011; 2013).

En este trabajo se demuestra que las CG del hipocampo del ratón TS presentan un incremento del daño en el DNA que no va acompañado de la aparición de focos de daño persistente. Esta observación sugiere que esta población celular tiene mecanismos de reparación de daño en el DNA funcionales, aunque, probablemente, menos eficientes. Por lo tanto, a continuación, evaluamos la expresión génica de la histona H2AX encontrándose un incremento significativo en el hipocampo del ratón TS. Trabajos anteriores describen que la degradación de histonas nucleosomales en los focos de daño induce una conformación abierta de la cromatina para permitir el acceso de los factores de reparación del DNA (Hauer y Gasser, 2017; Price y D'Andrea, 2013). Por lo tanto, el incremento en la expresión de H2AX en el hipocampo del ratón TS sugiere una mayor demanda de esta histona para poder reformar y ensamblar los nuevos nucleosomas, reparar la estructura de la cromatina y asegurar su correcto funcionamiento después de la lesión. Siguiendo con la cascada de señalización de la DDR, la modificación postraduccional de la histona H2A mediante la adición de una cola de ubiquitinas es un evento esencial que permite el acceso de factores reparadores, como la 53BP1, en los focos de daño de doble cadena (Mailand et al., 2007; Pan et al., 2014). De acuerdo con lo esperado, el hipocampo del ratón TS mostraba un incremento significativo en la expresión de H2A-ub, lo que apoya la idea de que la reparación del DNA es efectiva en el hipocampo de este modelo animal. Por otro lado, la monoubiquitinización de H2AX en los complejos represores de *polycomb* producen la heterocromatinización y reducción de la actividad transcripcional de la cromatina (Simon y Kingston, 2009), dos características fisiopatológicas presentes en el núcleo de las CG del hipocampo del TS (Puente-Bedia et al., 2021) que han sido previamente discutidos en el primer estudio de esta tesis doctoral.

Una de las causas de la reparación ineficiente del daño en el DNA encontrada en esta población neuronal en los animales TS puede ser la disfunción mitocondrial y los déficits en la producción de energía característicos ya que la DDR es un proceso con altos requerimientos energéticos. Se estima que la reparación de una única DSB necesita  $10^4$  moléculas de ATP para ser reparada (Hoeijmakers, 2009; Pan et al., 2014). Por consiguiente, la disfunción mitocondrial podría contribuir al incremento de daño en el DNA en las CG del hipocampo del ratón TS.

### **6.2.3. El estrés oxidativo presente en las CG del ratón TS se asocia con alteraciones en los sistemas de degradación intracelular: disfunción del proteasoma**

Los sistemas de degradación intracelular son esenciales para mantener la proteostasis celular, para eliminar organelas defectuosas y para evitar la propagación del daño oxidativo. Estos sistemas de degradación intracelular incluyen el UPS y el sistema autofágico lisosomal.

El primer lugar, este estudio demuestra alteraciones en el funcionamiento del UPS en el hipocampo y más concretamente en las CG del ratón TS. En concreto, los resultados muestran una reducción en el número de factorías proteolíticas nucleares, denominadas clastosomas, una disminución de la actividad quimotripsina del proteasoma y la acumulación de proteínas poliubiquitinadas formando agregados o inclusiones citoplasmáticas en las CG del ratón TS. Trabajos previos realizados en otros laboratorios han demostrado alteraciones en el funcionamiento del UPS en líneas celulares derivadas de individuos con SD (Aivazidis et al., 2017; Di Domenico et al., 2013; Granese et al., 2013). Además, mediante técnicas de proteómica redox, se han descrito alteraciones en la proteostasis y en los perfiles de ubiquitinación de proteínas en el córtex prefrontal de individuos con SD (Di Domenico et al., 2013; Tramutola et al., 2017). Por otro lado, el cerebelo del ratón TS, a los 18 meses de edad, muestra una reducción en la actividad quimotripsina del proteasoma y la acumulación de proteínas poliubiquitinadas y estas alteraciones se han relacionado con la degeneración de las neuronas de Purkinje (Necchi et al., 2015a). Sin embargo, hasta la fecha, no hay trabajos que evalúen la funcionalidad del UPS en el hipocampo del ratón TS.

En este estudio observamos que los núcleos de las CG de los ratones CO presentaban numerosas factorías proteolíticas o clastosomas, mientras que su presencia en el ratón TS era muy escasa. Los clastosomas son estructuras nucleares que concentran proteasomas y proteínas poliubiquitinadas para ser degradadas por este sistema (Carmo-Fonseca et al., 2010; Lafarga et al., 2002; Spector, 2006). Estos centros proteolíticos son compartimentos nucleares muy dinámicos constituidos por componentes moleculares que se ensamblan mediante mecanismos de separación de fases líquido-líquido (Mehta y Zhang, 2022; Yasuda et al., 2020). En neuronas de mamíferos, los clastosomas juegan un papel esencial en la degradación de proteínas nucleares de vida corta como factores de transcripción y proteínas ribosomales necesarias para el mantenimiento de la homeostasis neuronal (Carmo-Fonseca et al., 2010; Janer et al., 2006; Lafarga et al., 2002). Además, se ha propuesto que los clastosomas contribuyen a la regulación de la concentración de proteínas nucleares activas que son sustrato del UPS. Por lo tanto, la reducción en el número de clastosomas encontrado en las CG del ratón

TS sugiere una disfunción del proteasoma en el control de la proteostasis nuclear (Lafarga et al., 2002).

Por otro lado, otro resultado importante de este estudio es el hallazgo de gran cantidad de agregados proteicos citoplasmáticos en las CG de los animales TS en relación a los controles. Estos agregados podrían deberse a una redistribución de proteínas poliubiquitinadas en las CG del hipocampo del ratón TS, que consistiría en un cambio desde los focos proteicos nucleares asociados a los clastosomas a la formación de inclusiones citoplasmáticas prominentes (Lafarga et al., 2002). La presencia de agregados o inclusiones citoplasmáticas de proteínas dañadas o mal plegadas es un rasgo neuropatológico característico de algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA, la enfermedad de Huntington, el Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (Candelise et al., 2021; Ciechanover y Kwon, 2015; Knopman et al., 2021; Ross y Poirier, 2004). En estas enfermedades, diversas proteínas como tau,  $\alpha$ -sinucleína, FUS o TDP43 experimentan un comportamiento de separación de fases aberrante que da lugar a la formación de agregados mediante procesos de autoensamblaje (Zbinden et al., 2020). En este contexto, las inclusiones citoplasmáticas de proteínas ubiquitinadas observadas en las CG del hipocampo del ratón TS comparten ciertas características similares a los condensados moleculares formados por la separación de fases líquido-líquido mencionadas anteriormente, como la forma esférica y el hecho de carecer de membrana (Brangwynne et al., 2009; Zbinden et al., 2020).

Por tanto, la acumulación de inclusiones citoplasmáticas de proteínas poliubiquitinadas refleja alteraciones en el funcionamiento del UPS relacionadas con el daño oxidativo en las proteínas celulares (Riederer et al., 2011). El exceso de estrés oxidativo produce la agregación aberrante de proteínas oxidadas que no pueden ser correctamente degradadas por el proteasoma. Estas proteínas dañadas o mal plegadas dan lugar a la formación de inclusiones citoplasmáticas aberrantes (Candelise et al., 2021). Sin embargo, una cuestión importante que todavía no está resuelta es si la formación de estas inclusiones se relaciona con el desarrollo temprano de una neuropatología de tipo EA, en la que el proteasoma no logra eliminar los acúmulos de  $\beta$ -amiloide o los ovillos neurofibrilares constituidos por la proteína tau hiperfosforilada (Di Domenico et al., 2013).

Por otro lado, también se ha encontrado un descenso en la actividad del proteasoma en el hipocampo de los ratones TS, que no parece ser debido a la alteración en la expresión de sus subunidades. En este sentido, la actividad del proteasoma puede modularse por varios factores. Por un lado, para su funcionamiento, el proteasoma depende de la producción de ATP mitocondrial (Benaroudj et al., 2003). Además, cuando la cantidad de proteínas oxidadas es

moderada, el proteasoma aumenta su actividad, sin embargo, la disminuye cuando la cantidad de proteínas oxidadas es elevada (Grune et al., 2003). Por último, el incremento de péptidos  $\beta$ -amiloides inhibe la actividad del proteasoma, particularmente la actividad quimotripsina (Tseng et al., 2008). A los 6 meses de edad, el hipocampo del ratón TS presenta un incremento de péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, altos niveles de oxidación proteica y déficits en la producción de energía mitocondrial (Parisotto et al., 2016; Tramutola et al., 2016). En conjunto, todas estas alteraciones neuropatológicas pueden estar contribuyendo al descenso encontrado en la actividad del proteasoma (aproximadamente del 35 %). Como consecuencia, disminuyen la eliminación de proteínas anómalas, oxidadas o mal plegadas que generan un ambiente tóxico para la célula y dañan funciones esenciales para la supervivencia de las CG del hipocampo del ratón TS.

#### **6.2.4. El estrés oxidativo presente en las CG del ratón TS se asocia con alteraciones en los sistemas de degradación intracelular: disfunción del sistema lisosomal**

Por último, en este estudio también se encontró que las CG del ratón TS presentaban una acumulación de lisosomas de gran tamaño y polimorfos positivos para catepsina D. De acuerdo con la literatura actual, tanto en individuos SD como AD, una manifestación neuropatológica temprana es la disfunción en la clasificación y el tráfico de proteínas endosomales que acaba produciendo alteraciones en el sistema lisosomal (Botté et al., 2020; de Rosa et al., 2022; Filippone y Praticó, 2021; Jiang et al., 2019). En fibroblastos de personas con SD y cultivos celulares de neuronas corticales del modelo murino de SD, Ts2, se ha descrito la aparición de compartimentos endosomales agrandados y una gran disfunción lisosomal (Filippone y Praticó, 2021; Jiang et al., 2019).

El exceso de estrés oxidativo ejerce un papel esencial en el deterioro de la función lisosomal. Trabajos previos, realizados con espectrometría de masas, describen que algunos productos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxinonenal o el malondialdehído alteran la función proteolítica de las proteasas lisosomales como la catepsina B, L y D, dando lugar a alteraciones en la función de los lisosomas y a la generación de lipofuscina (Krohne et al., 2010). Otro trabajo realizado en cerebros de individuos con SD demuestra que la oxidación de proteínas que forman parte del sistema autofágico-lisosomal contribuye a la neurodegeneración (Di Domenico et al., 2013). En particular, en células SD, uno de los principales efectos del incremento de estrés oxidativo es el de favorecer la permeabilidad lisosomal causando una traslocación de las catepsinas del interior de los lisosomas al citoplasma celular e induciendo su activación aberrante (Di Domenico et al., 2016). Por lo tanto, en el SD, la activación de la catepsina D, ya sea por una mayor actividad o por sobreexpresión, parece ser un mecanismo compensatorio

frente a las alteraciones en la vía autofágica-lisosomal o por la acumulación de agregados de péptidos A $\beta$  (Di Domenico et al., 2016).

La mayoría de los lisosomas observados en las CG del ratón TS mediante microscopía electrónica parecen corresponder a estructuras residuales que contienen gotas lipídicas. Durante el envejecimiento neuronal, los lisosomas comienzan a mostrar alteraciones relacionadas con la senescencia (Kurz et al., 2008) como son la formación de cuerpos residuales lisosomales y la acumulación de pigmentos neurotóxicos como los gránulos de lipofuscina que contienen acumulaciones de lípidos oxidados (Jung et al., 2007). Los lisosomas de las CG del ratón TS presentan algunas de estas alteraciones asociadas a la senescencia celular. Por un lado, los resultados mediante el marcaje con Bodipy C11 demuestran un incremento de peroxidación lipídica y un mayor número de cuerpos citoplasmáticos positivos para este marcador en las CG del hipocampo del ratón TS. Estos cuerpos, presumiblemente, corresponden a gotas lipídicas intralisosomales con un alto contenido en lípidos peroxidados que podrían afectar negativamente al funcionamiento lisosomal. Además, la lipoperoxidación contribuye a la formación de sustancias con un gran potencial oxidante como la lipofuscina, que daña las biomoléculas y organelas celulares (Jung et al., 2007; Moreno-García et al., 2018). De acuerdo con esto, el citoplasma de las CG del ratón TS muestra una abundancia de gránulos de lipofuscina que no fue encontrada en los animales control. Por tanto, el patrón ultraestructural de los lisosomas encontrado en las células granulares del ratón TS es consistente con la disfunción lisosomal inducida por exceso de estrés oxidativo. Esta disfunción lisosomal podría contribuir al envejecimiento acelerado y la neurodegeneración presente en el hipocampo del ratón TS.

Por último, tanto el exceso de estrés oxidativo como la acumulación de lipofuscina encontrada en las CG del ratón TS son factores que inducen senescencia celular (Martínez-Cué y Rueda, 2020a; Moreno-García et al., 2018). Coincidentemente, el ratón TS muestra un incremento de la densidad de células con fenotipo senescente en distintas regiones del hipocampo, incluyendo la capa de células granulares (García-Cerro et al., 2017; Parisotto et al., 2016; Rueda et al., 2018b).

En resumen, los resultados obtenidos en este segundo estudio sugieren que el estrés oxidativo podría ser responsable de numerosas alteraciones de las CG hipocampales del ratón TS y, por tanto, contribuir a los déficits cognitivos encontrados en estos animales desde etapas tempranas del desarrollo y que se agravan con la edad.



## **7. Conclusions**

---



The findings presented in this Thesis suggest the following conclusions:

### **Study I.**

The partial triplication of Mmu16 in the TS mouse induces alterations in the nuclear architecture of the hippocampal GCs, affecting nuclear compartments involved in transcription and pre-rRNA and pre-mRNA processing. Specifically:

1. The excess gene dosage of TS mice affects their 3D genome organization in their hippocampal GCs. These alterations induce changes in gene positioning and chromatin interactions that result in a decrease in the nuclear size of these cells.
2. The excess gene dosage in the GCs of TS mice causes epigenetic modifications of chromatin structure, leading to increased heterochromatinization and a global reduction of transcription in this neuronal population.
3. Chromosomal rearrangement produces changes in the location of NORs and alters the pattern of nucleolar fusion, increasing the number of nucleoli per cell and the expression of nucleolin in the GCs of TS mice. However, the production of the mature rRNAs that form the pre-ribosomal particles is preserved.
4. The nuclear reorganization of GCs causes a decrease in the number of Cajal bodies, a defective assembly, and alterations in the function of this organelle.

Together, these nuclear alterations caused by an extra copy of a fragment of Mmu16 could play an important role in the hypocellularity and the neuromorphological or functional alterations of the hippocampal GCs contributing to the cognitive deficits found in TS mice.

### **Study II.**

At 6 months of age, the TS mouse shows oxidative stress-associated alterations in different cellular components of hippocampal GCs implicated in the maintenance of neuronal homeostasis.

1. Regarding the oxidative profile, increased oxidative stress in the hippocampus of the TS mouse is partially due to altered expression levels of components of the antioxidant system such as the SOD-1 protein and the *Nrf2* gene favoring the accumulation of ROS in this structure.
2. Oxidative stress causes increased lipid peroxidation in hippocampal GCs of TS mice. This neuronal population display a high number of Bodipy C11 positive bodies that correspond to lipid droplets containing peroxidized lipids.

## *Conclusions*

3. TS hippocampal CGs show mitochondrial morphological abnormalities related to increased oxidative stress damage. In addition, the hippocampus of TS mice presents an imbalance in the expression levels of Pink1 and Parkin which may indicate a defective mitophagy probably inducing accumulation of damaged mitochondria that produce a high generation of ROS in this neuronal population.
4. Increased oxidative stress accelerates the accumulation of DNA damage foci in TS GCs. The functioning of DNA damage response seems to be effective but, probably, slower in the TS hippocampus.
5. Increased oxidative stress induces alterations in the proteasome of GCs including a reduction of the nuclear proteolytic factories and the chymotrypsin-like activity, as well as the accumulation of ubiquitinated proteins in cytoplasmic aggregates.
6. Oxidative stress induces lysosomal alterations in the GCs of TS mice. Particularly, TS GCs show a higher number, larger and polymorphic cathepsin D-positive bodies as well as polymorphic lysosome-related bodies with a heterogeneous internal structure that contain, lipid droplets of cytotoxic peroxidation products.

Collectively, these oxidative stress-associated alterations found in the hippocampus and in the GCs of TS mice may compromise proper neuronal function in young mice and promote cellular senescence, accelerated aging, and the early neuropathological manifestation of AD, contributing to the progression of the hippocampal learning and memory deficits present in TS mice.

## **8. Bibliografía**

---



- Ábrahám, H., Vincze, A., Veszprémi, B., Kravják, A., Gömöri, É., Kovács, G. G., & Seress, L. (2012). Impaired myelination of the human hippocampal formation in Down syndrome. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *30*(2), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.11.005>
- Aït Yahya-Graison, E., Aubert, J., Dauphinot, L., Rivals, I., Prieur, M., Golfier, G., Rossier, J., Personnaz, L., Créau, N., Bléhaut, H., Robin, S., Delabar, J. M., & Potier, M. C. (2007). Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in down syndrome: Impact on disease phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, *81*(3), 475–491. <https://doi.org/10.1086/520000>
- Aivazidis, S., Coughlan, C. M., Rauniyar, A. K., Jiang, H., Liggett, L. A., Maclean, K. N., & Roede, J. R. (2017). The burden of trisomy 21 disrupts the proteostasis network in Down syndrome. *PLoS ONE*, *12*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176307>
- Aldridge, K., Reeves, R. H., Olson, L. E., & Richtsmeier, J. T. (2007). Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *143*(10), 1060–1070. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31721>
- Allred, M. J., Lee, S. H., Stutzmann, G. E., & Ginsberg, S. D. (2021). Oxidative Phosphorylation Is Dysregulated Within the Basocortical Circuit in a 6-month old Mouse Model of Down Syndrome and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.707950>
- Amiel, A., Fejgin, M. D., Liberman, M., Sharon, Y., Kidron, D., & Biron-Shental, T. (2013). Senescence in amniocytes and placentas from trisomy 21 pregnancies. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, *26*(11), 1086–1089. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.768982>
- Andrés, M., García-Gomis, D., Ponte, I., Suau, P., & Roque, A. (2020). Histone h1 post-translational modifications: Update and future perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 16, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21165941>
- Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Raymond, A., & Deutsch, S. (2004). Chromosome 21 and Down syndrome: From genomics to pathophysiology. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 5, Issue 10, pp. 725–738). <https://doi.org/10.1038/nrg1448>
- Antonarakis, S. E., Skotko, B. G., Rafii, M. S., Strydom, A., Pape, S. E., Bianchi, D. W., Sherman, S. L., & Reeves, R. H. (2020). Down syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0143-7>
- Arias Escayola, D., & Neugebauer, K. M. (2018). Dynamics and Function of Nuclear Bodies during Embryogenesis. In *Biochemistry* (Vol. 57, Issue 17, pp. 2462–2469). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01262>

- Ayberk Kurt, M., Ilker Kafa, M., Dierssen, M., & Ceri Davies, D. (2004). Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Research*, *1022*(1–2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.075>
- Aziz, N. M., Guedj, F., Pennings, J. L. A., Olmos-Serrano, J. L., Siegel, A., Haydar, T. F., & Bianchi, D. W. (2018). Lifespan analysis of brain development, gene expression and behavioral phenotypes in the Ts1Cje, Ts65Dn and Dp(16)1/Yey mouse models of Down syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *11*(6). <https://doi.org/10.1242/dmm.031013>
- Baburamani, A. A., Patkee, P. A., Arichi, T., & Rutherford, M. A. (2019). New approaches to studying early brain development in Down syndrome. In *Developmental Medicine and Child Neurology* (Vol. 61, Issue 8, pp. 867–879). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14260>
- Bakshi, R., Hassan, M. Q., Pratap, J., Lian, J. B., Montecino, M. A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Imbalzano, A. N., & Stein, G. S. (2010). The human SWI/SNF complex associates with RUNX1 to control transcription of hematopoietic target genes. *Journal of Cellular Physiology*, *225*(2), 569–576. <https://doi.org/10.1002/jcp.22240>
- Baltanás, F. C., Berciano, M. T., Tapia, O., Narcis, J. O., Lafarga, V., Díaz, D., Weruaga, E., Santos, E., & Lafarga, M. (2019). Nucleolin reorganization and nucleolar stress in Purkinje cells of mutant PCD mice. *Neurobiology of Disease*, *127*, 312–322. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.017>
- Baltanás, F. C., Casafont, I., Weruaga, E., Alonso, J. R., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2011). Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells. *Brain Pathology*, *21*(4), 374–388. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00461.x>
- Baraona, F., Gurvitz, M., Landzberg, M. J., & Opatowsky, A. R. (2013). Hospitalizations and mortality in the United States for adults with down syndrome and congenital heart disease. *American Journal of Cardiology*, *111*(7), 1046–1051. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.12.025>
- Bartesaghi, R., Guide, S., & Ciani, E. (2011). Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? In *Reviews in the Neurosciences* (Vol. 22, Issue 4, pp. 419–455). <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.037>
- Bayona-Bafaluy, M. P., Garrido-Pérez, N., Meade, P., Iglesias, E., Jiménez-Salvador, I., Montoya, J., Martínez-Cué, C., & Ruiz-Pesini, E. (2021). Down syndrome is an oxidative phosphorylation disorder. *Redox Biology*, *41*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101871>

- Beacher, F., Daly, E., Simmons, A., Prasher, V., Morris, R., Robinson, C., Lovestone, S., Murphy, K., & Murphy, D. G. M. (2009). Alzheimer's disease and Down's syndrome: An in vivo MRI study. *Psychological Medicine*, 39(4), 675–684. <https://doi.org/10.1017/S0033291708004054>
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., & Roelofs, J. (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 20, Issue 7, pp. 391–401). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.03.007>
- Belichenko, P. v., Kleschevnikov, A. M., Masliah, E., Wu, C., Takimoto-Kimura, R., Salehi, A., & Mobley, W. C. (2009). Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *Journal of Comparative Neurology*, 512(4), 453–466. <https://doi.org/10.1002/cne.21895>
- Belichenko, P. v., Kleschevnikov, A. M., Salehi, A., Epstein, C. J., & Mobley, W. C. (2007). Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: Exploring genotype-phenotype relationships. *Journal of Comparative Neurology*, 504(4), 329–345. <https://doi.org/10.1002/cne.21433>
- Belichenko, P. v., Masliah, E., Kleschevnikov, A. M., Villar, A. J., Epstein, C. J., Salehi, A., & Mobley, W. C. (2004). Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Journal of Comparative Neurology*, 480(3), 281–298. <https://doi.org/10.1002/cne.20337>
- Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemü, E., Baumeister, W., & Goldberg, A. L. (2003). ATP Hydrolysis by the Proteasome Regulatory Complex PAN Serves Multiple Functions in Protein Degradation. *Molecular Cell*, 11, 69–78. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00775-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00775-x)
- Berciano, M. T., Novell, M., Villagra, N. T., Casafont, I., Bengoechea, R., Val-Bernal, J. F., & Lafarga, M. (2007). Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *Journal of Structural Biology*, 158(3), 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.12.008>
- Bianchi, P., Ciani, E., Contestabile, A., Guidi, S., & Bartesaghi, R. (2010). Lithium restores neurogenesis in the subventricular zone of the ts65dn mouse, a model for down syndrome. *Brain Pathology*, 20(1), 106–118. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00246.x>
- Bianchi, P., Ciani, E., Guidi, S., Trazzi, S., Felice, D., Grossi, G., Fernandez, M., Giuliani, A., Calzà, L., & Bartesaghi, R. (2010). Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for down syndrome. *Journal of Neuroscience*, 30(26), 8769–8779. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0534-10.2010>
- Bodai, L. (2022). Epigenetic Regulation in Neurodegeneration Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6185. <https://doi.org/10.3390/ijms23116185>

- Bohmann, K., Ferreira, J., Santama, N., Weis, K., & Lamond, A. I. (1995). Molecular analysis of the coiled body. In *Journal of Cell Science, Supplement* (Vol. 19).  
[https://doi.org/10.1242/jcs.1995.supplement\\_19.16](https://doi.org/10.1242/jcs.1995.supplement_19.16)
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 7, pp. 574–585). <https://doi.org/10.1038/nrm2184>
- Bordi, M., Darji, S., Sato, Y., Mellén, M., Berg, M. J., Kumar, A., Jiang, Y., & Nixon, R. A. (2019). mTOR hyperactivation in Down Syndrome underlies deficits in autophagy induction, autophagosome formation, and mitophagy. *Cell Death and Disease*, *10*(8).  
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1752-5>
- Botté, A., Lainé, J., Xicota, L., Heiligenstein, X., Fontaine, G., Kasri, A., Rivals, I., Goh, P., Faklaris, O., Cossec, J. C., Morel, E., Rebillat, A. S., Nizetic, D., Raposo, G., & Potier, M. C. (2020). Ultrastructural and dynamic studies of the endosomal compartment in down syndrome. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00956-z>
- Brangwynne, C. P., Eckmann, C. R., Courson, D. S., Rybarska, A., Hoege, C., Charakhani, J., Jülicher, F., & Hyman, A. A. (2009). Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*, *324*, 1729–1732.  
<https://doi.org/10.1126/science.1172046>
- Bull, M. J. (2020). Down Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *382*(24), 2344–2352.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1706537>
- Busciglio, J., & Yankner, B. A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature*, *378*(6559), 776–779.
- Bussy, G., Charrin, E., Brun, A., Curie, A., & des Portes, V. (2011). Implicit procedural learning in fragile X and Down syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, *55*(5), 521–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2011.01410.x>
- Butterfield, A. D., & Boyd-Kimball, D. (2018). Oxidative Stress, Amyloid- $\beta$  Peptide, and Altered Key Molecular Pathways in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 62, Issue 3, pp. 1345–1367). IOS Press.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-170543>
- Butterfield, D. A., di Domenico, F., Swomley, A. M., Head, E., & Perluigi, M. (2014). Redox proteomics analysis to decipher the neurobiology of Alzheimer-like neurodegeneration: Overlaps in Down's syndrome and Alzheimer's disease brain. *Biochemical Journal*, *463*(2), 177–189. <https://doi.org/10.1042/BJ20140772>

- Butterfield, D. A., Perluigi, M., Reed, T., Muharib, T., Hughes, C. P., Robinson, R. A. S., & Sultana, R. (2012). Redox proteomics in selected neurodegenerative disorders: From its infancy to future applications. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 17, Issue 11, pp. 1610–1655). <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4109>
- Buzsáki, G., & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. In *Nature Neuroscience* (Vol. 16, Issue 2, pp. 130–138). <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Camacho Ugarte, V., Bastida Codina, A., & Giovana Zarate, S. (2020). Estudio anatómico del hipocampo como una de las regiones de neurogénesis más relevante. *Rev. Cient Cienc Med*, 23(2), 221–230. <https://orcid.org/0000-0003->
- Candelise, N., Scaricamazza, S., Salvatori, I., Ferri, A., Valle, C., Manganelli, V., Garofalo, T., Sorice, M., & Misasi, R. (2021). Protein aggregation landscape in neurodegenerative diseases: Clinical relevance and future applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22116016>
- Capone, G., Kim, P., Payne, L., Freund, L., Welch, K., Miller, E., & Trush, M. (2002). Evidence for increased mitochondrial superoxide production in Down syndrome. In *Life Sciences* (Vol. 70). [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01538-2](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01538-2)
- Carducci, F., Onorati, P., Condoluci, C., Quarato, P. P., Pierallini, A., Sará, M., Miano, S., Cornia, R., & Albertini, G. (2013). Whole-brain voxel-based morphometry study of children and adolescents with Down syndrome. *Functional Neurology*, 28(1), 19–28.
- Carmo-Fonseca, M. (2015). Assembly of the nucleolus: in need of revision. *The EMBO Journal*, 34(22), 2731–2732. <https://doi.org/10.15252/embj.201593185>
- Carmo-Fonseca, M., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2010). Orphan nuclear bodies. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 2, Issue 9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000703>
- Casafont, I., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2010). Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. *Neurotoxicity Research*, 17(2), 167–178. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9086-1>
- Casafont, I., Palanca, A., Lafarga, V., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2011). Effect of ionizing radiation in sensory ganglion neurons: Organization and dynamics of nuclear compartments of DNA damage/repair and their relationship with transcription and cell cycle. *Acta Neuropathologica*, 122(4), 481–493. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0869-0>
- Cascio, P., Call, M., Petre, B. M., Walz, T., & Goldberg, A. L. (2002). Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. *The EMBO Journal*, 21(11), 2636–2645. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2636>

- Castillo-Iglesias, M. S., Berciano, M. T., Narcis, J. O., Val-Bernal, J. F., Rodriguez-Rey, J. C., Tapia, O., & Lafarga, M. (2019). Reorganization of the nuclear compartments involved in transcription and RNA processing in myonuclei of type I spinal muscular atrophy. *Histochemistry and Cell Biology*, *152*(3), 227–237. <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01792-6>
- Cataldo, A. M., Petanceska, S., Terio, N. B., Peterhoff, C. M., Durham, R., Mercken, M., Mehta, P. D., Buxbaum, J., Haroutunian, V., & Nixon, R. A. (2004). A $\beta$  localization in abnormal endosomes: Association with earliest A $\beta$  elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiology of Aging*, *25*(10), 1263–1272. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.027>
- Caudron-Herger, M., Pankert, T., Seiler, J., Németh, A., Voit, R., Grummt, I., & Rippe, K. (2015). Alu element-containing RNA s maintain nucleolar structure and function . *The EMBO Journal*, *34*(22), 2758–2774. <https://doi.org/10.15252/embj.201591458>
- Chang, I. Y., Kim, J. H., Cho, K. W., & Yoon, S. P. (2013). Acute responses of DNA repair proteins and StarD6 in rat hippocampus after domoic acid-induced excitotoxicity. *Acta Histochemica*, *115*(3), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.07.001>
- Chow, H. M., & Herrup, K. (2015). Genomic integrity and the ageing brain. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 11, pp. 672–684). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn4020>
- Ciechanover, A., & Kwon, Y. T. ae. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. In *Experimental & molecular medicine* (Vol. 47, p. e147). <https://doi.org/10.1038/emm.2014.117>
- Cioce, M., Boulon, S., Matera, A. G., & Lamond, A. I. (2006a). UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *Journal of Cell Biology*, *175*(3), 401–413. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604099>
- Cioce, M., Boulon, S., Matera, A. G., & Lamond, A. I. (2006b). UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *Journal of Cell Biology*, *175*(3), 401–413. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604099>
- Cioce, M., & Lamond, A. I. (2005). CAJAL BODIES: A Long History of Discovery. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*(1), 105–131. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.103738>
- Clark, C. A. C., Fernandez, F., Sakhon, S., Spanò, G., & Edgin, J. O. (2017). The medial temporal memory system in Down syndrome: Translating animal models of hippocampal compromise. *Hippocampus*, *27*(6), 683–691. <https://doi.org/10.1002/hipo.22724>

- Contestabile, A., Benfenati, F., & Gasparini, L. (2010). Communication breaks-Down: From neurodevelopment defects to cognitive disabilities in Down syndrome. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 91, Issue 1, pp. 1–22). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.003>
- Contestabile, A., Fila, T., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2009). Cell cycle elongation impairs proliferation of cerebellar granule cell precursors in the Ts65Dn mouse, an animal model for down syndrome. *Brain Pathology*, *19*(2), 224–237. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00168.x>
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2007a). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus*, *17*(8), 665–678. <https://doi.org/10.1002/hipo.20308>
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2007b). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus*, *17*(8), 665–678. <https://doi.org/10.1002/hipo.20308>
- Coppedè, F., & Migliore, L. (2015). DNA damage in neurodegenerative diseases. In *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (Vol. 776, pp. 84–97). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.11.010>
- Corrales, A., Parisotto, E. B., Vidal, V., García-Cerro, S., Lantigua, S., Diego, M., Wilhem Filho, D., Sanchez-Barceló, E. J., Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2017). Pre- and post-natal melatonin administration partially regulates brain oxidative stress but does not improve cognitive or histological alterations in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, *334*, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.022>
- Corrales, A., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Martínez, P., García, E., Flórez, J., Sanchez-Barceló, E. J., Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2014). Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *Journal of Pineal Research*, *56*(1), 51–61. <https://doi.org/10.1111/jpi.12097>
- Coskun, P. E., & Busciglio, J. (2012). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Down's syndrome: Relevance to aging and dementia. In *Current Gerontology and Geriatrics Research* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/383170>
- Coskun, P. E., Wyrembak, J., Derbereva, O., Melkonian, G., Doran, E., Lott, I. T., Head, E., Cotman, C. W., & Wallace, D. C. (2010). Systemic mitochondrial dysfunction and the etiology of Alzheimer's disease and down syndrome dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, *20*(SUPPL.2). <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100351>

- Costa, A. C. S., & Scott-Mckean, J. J. (2013). Prospects for improving brain function in individuals with down syndrome. *CNS Drugs*, 27(9), 679–702.  
<https://doi.org/10.1007/s40263-013-0089-3>
- Cremer, T., & Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 2).  
<https://doi.org/10.1038/35066075>
- Crowe, S. L., Tsukerman, S., Gale, K., Jorgensen, T. J., & Kondratyev, A. D. (2011). Phosphorylation of histone H2A.X as an early marker of neuronal endangerment following seizures in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience*, 31(21), 7648–7656.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0092-11.2011>
- Das, S., Cong, R., Shandilya, J., Senapati, P., Moindrot, B., Monier, K., Delage, H., Mongelard, F., Kumar, S., Kundu, T. K., & Bouvet, P. (2013). Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS Letters*, 587(5), 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.035>
- de Haan, J. B., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M. J., & Kola, I. (1996). Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. In *Human Molecular Genetics* (Vol. 5, Issue 2). <http://hmg.oxfordjournals.org/>
- de Haan, J. B., Cristiano, F., Iannello, R. C., & Kola, I. (1995). Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem. Mol. Biol.*, 35, 1281–1297.
- de Rosa, L., Fasano, D., Zerillo, L., Valente, V., Izzo, A., Mollo, N., Amodio, G., Polishchuk, E., Polishchuk, R., Melone, M. A. B., Criscuolo, C., Conti, A., Nitsch, L., Remondelli, P., Pierantoni, G. M., & Paladino, S. (2022). Down Syndrome Fetal Fibroblasts Display Alterations of Endosomal Trafficking Possibly due to SYNJ1 Overexpression. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.867989>
- del Hoyo Soriano, L., Rosser, T., Hamilton, D., Wood, T., Abbeduto, L., & Sherman, S. (2020). Gestational age is related to symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in late-preterm to full-term children and adolescents with down syndrome. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77392-5>
- Deleyto-Seldas, N., & Efeyan, A. (2021). The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.655731>
- Demirtas, H. (2009). AgNOR status in Down's syndrome infants and a plausible phenotype formation hypothesis. In *Micron* (Vol. 40, Issues 5–6, pp. 511–518).  
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.02.014>

- DeRuisseau, L. R., Receno, C. N., Heffernan, K. S., & Cunningham, C. M. (2019). Heart rate and blood pressure in male Ts65Dn mice: a model to investigate cardiovascular responses in Down syndrome. *Physiological Reports*, 7(17).  
<https://doi.org/10.14814/phy2.14205>
- di Carlo, M., Giacomazza, D., Picone, P., Nuzzo, D., & San Biagio, P. L. (2012). Are oxidative stress and mitochondrial dysfunction the key players in the neurodegenerative diseases? In *Free Radical Research* (Vol. 46, Issue 11, pp. 1327–1338).  
<https://doi.org/10.3109/10715762.2012.714466>
- di Domenico, F., Baroneb, E., Mancuso, C., Perluigi, M., Cocciolo, A., Mecocci, P., Butterfield, D. A., & Coccia, R. (2012). HO-1/BVR-A system analysis in plasma from probable Alzheimer's disease and mild cognitive impairment subjects: A potential biochemical marker for the prediction of the disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 32(2), 277–289.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121045>
- di Domenico, F., Coccia, R., Cocciolo, A., Murphy, M. P., Cenini, G., Head, E., Butterfield, D. A., Giorgi, A., Schinina, M. E., Mancuso, C., Cini, C., & Perluigi, M. (2013). Impairment of proteostasis network in Down syndrome prior to the development of Alzheimer's disease neuropathology: Redox proteomics analysis of human brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(8), 1249–1259.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.04.013>
- di Domenico, F., Tramutola, A., Foppoli, C., Head, E., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2018). mTOR in Down syndrome: Role in A $\beta$  and tau neuropathology and transition to Alzheimer disease-like dementia. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 114, pp. 94–101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.009>
- di Domenico, F., Tramutola, A., & Perluigi, M. (2016). Cathepsin D as a therapeutic target in Alzheimer's disease. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 20, Issue 12, pp. 1393–1395). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1252334>
- Dierssen, M. (2012). Down syndrome: The brain in trisomic mode. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 13, Issue 12, pp. 844–858). <https://doi.org/10.1038/nrn3314>
- Duchon, A., Raveau, M., Chevalier, C., Nalesso, V., Sharp, A. J., & Herault, Y. (2011). Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: Relevance for modeling down syndrome. *Mammalian Genome*, 22(11–12), 674–684.  
<https://doi.org/10.1007/s00335-011-9356-0>
- Edvardson, S., Msallam, N., Hertz, P., Malkiel, S., Wexler, I. D., & Tenenbaum, A. (2014). Attention Deficit Hyperactivity Disorders Symptomatology Among Individuals With Down Syndrome. *Journal of Policy and Practice in Intellectual Disabilities*, 11(1), 58–61.  
<https://doi.org/10.1111/jppi.12069>

- Escorihuelaa, R. M., Ferntidez-Teruela, A., Vallinab, I. F., Baamondeb, C., Lumbrerasb, M. A., Dierssenb, M., Tobehaa, A., & F16rezb, J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. In *Neuroscience Letters* (Vol. 199).
- Esposito, G., Imitola, J., Lu, J., de Filippis, D., Scuderi, C., Ganesh, V. S., Folkerth, R., Hecht, J., Shin, S., Iuvone, T., Chesnut, J., Steardo, L., & Sheen, V. (2008). Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury. *Human Molecular Genetics*, *17*(3), 440–457.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm322>
- European Commission Website. (2022, January 3). *Prevalence charts and tables from European Commission Website*. [https://Eu-Rd-Platform.Jrc.Ec.Europa.Eu/Eurocat/Eurocat-Data/Prevalence\\_en](https://Eu-Rd-Platform.Jrc.Ec.Europa.Eu/Eurocat/Eurocat-Data/Prevalence_en).
- Falahati, H., Pelham-Webb, B., Blythe, S., & Wieschaus, E. (2016). Nucleation by rRNA dictates the precision of nucleolus assembly. *Current Biology*, *26*(3), 277–285.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.065>
- Fernandez, F., & Garner, C. C. (2008). Episodic-like memory in Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, *188*(1), 233–237.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.09.015>
- Ferrer, I., & Gullotta, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. In *Acta Neuropathol* (Vol. 79).
- Filippone, A., & Praticó, D. (2021). Endosome Dysregulation in Down Syndrome: A Potential Contributor to Alzheimer Disease Pathology. In *Annals of Neurology* (Vol. 90, Issue 1, pp. 4–14). <https://doi.org/10.1002/ana.26042>
- Flanagan, T. W., & Brown, D. T. (2016). Molecular dynamics of histone H1. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1859*(3), 468–475.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.10.005>
- Forte, J., Vilaplana, E., Carmona-Iragui, M., Benejam, B., Videla, L., Barroeta, I., Fernández, S., Altuna, M., Pegueroles, J., Montal, V., Valldeneu, S., Giménez, S., González-Ortiz, S., Muñoz, L., Estellés, T., Illán-Gala, I., Belbin, O., Camacho, V., Wilson, L. R., ... Lleó, A. (2020). Clinical and biomarker changes of Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: a cross-sectional study. *The Lancet*, *395*(10242), 1988–1997.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30689-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30689-9)
- Franceschi, C., Garagnani, P., Gensous, N., Bacalini, M. G., Conte, M., & Salvioli, S. (2019). Accelerated bio-cognitive aging in Down syndrome: State of the art and possible deceleration strategies. In *Aging Cell* (Vol. 18, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd.  
<https://doi.org/10.1111/accel.12903>

- Freeburn, A., & Munn, R. G. K. (2021). Signalling pathways contributing to learning and memory deficits in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neuronal Signaling*, 5(1).  
<https://doi.org/10.1042/ns20200011>
- Frotscher, M., Seress, L., Schwerdtfeger, W. K., & Buhl, E. (1991). The Mossy Cells of the Fascia Dentata: A Comparative Study of Their Fine Structure and Synaptic Connections in Rodents and Primates. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*.
- Gall, J. G. (2003). The centennial of the Cajal Body. *Nature Reviews Mol Cell Biol.*, 4, 975–980.
- Gamis, A. S., & Smith, F. O. (2012). Transient myeloproliferative disorder in children with Down syndrome: Clarity to this enigmatic disorder. In *British Journal of Haematology* (Vol. 159, Issue 3, pp. 277–287). <https://doi.org/10.1111/bjh.12041>
- Gao, F. J., Klinedinst, D., Fernandez, F. X., Cheng, B., Savonenko, A., Devenney, B., Li, Y., Wu, D., Pomper, M. G., & Reeves, R. H. (2021). Forebrain Shh overexpression improves cognitive function and locomotor hyperactivity in an aneuploid mouse model of Down syndrome and its euploid littermates. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1186/s40478-021-01237-z>
- García-Cerro, S., Rueda, N., Vidal, V., Lantigua, S., & Martínez-Cué, C. (2017). Normalizing the gene dosage of Dyrk1A in a mouse model of Down syndrome rescues several Alzheimer's disease phenotypes. *Neurobiology of Disease*, 106, 76–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.06.010>
- García-Cerro, S., Rueda, N., Vidal, V., Puente, A., Campa, V., Lantigua, S., Narcís, O., Velasco, A., Bartesaghi, R., & Martínez-Cué, C. (2020). Prenatal Administration of Oleic Acid or Linolenic Acid Reduces Neuromorphological and Cognitive Alterations in Ts65dn Down Syndrome Mice. *Journal of Nutrition*, 150(6), 1631–1643.  
<https://doi.org/10.1093/jn/nxaa074>
- García-Cerro, S., Vidal, V., Lantigua, S., Berciano, M. T., Lafarga, M., Ramos-Cabrer, P., Padro, D., Rueda, N., & Martínez-Cué, C. (2018). Cerebellar alterations in a model of Down syndrome: The role of the Dyrk1A gene. *Neurobiology of Disease*, 110, 206–217.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.002>
- Garner, C. C., & Wetmore, D. Z. (2012). Synaptic pathology of down syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970, 451–468. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_20)
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 482, Issue 3, pp. 419–425). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

- Giacomini, A., Stagni, F., Emili, M., Guidi, S., Salvalai, M. E., Grilli, M., Vidal-Sanchez, V., Martinez-Cué, C., & Bartesaghi, R. (2018). Treatment with corn oil improves neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Brain Research Bulletin*, *140*, 378–391. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.06.009>
- Giffin-Rao, Y., Sheng, J., Strand, B., Xu, K., Huang, L., Medo, M., Risgaard, K. A., Dantinne, S., Mohan, S., Keshan, A., Daley, R. A., Levesque, B., Amundson, L., Reese, R., Sousa, A. M. M., Tao, Y., Wang, D., Zhang, S.-C., & Bhattacharyya, A. (2022). Altered patterning of trisomy 21 interneuron progenitors. *Stem Cell Reports*, *17*(6), 1366–1379. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.05.001>
- Gilder, A. S., Do, P. M., Carrero, Z. I., Cosman, A. M., Broome, H. J., Velma, V., Martinez, L. A., & Hebert, M. D. (2011). Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(7), 1070–1079. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0731>
- Godfrey, M., & Lee, N. R. (2018). Memory profiles in Down syndrome across development: A review of memory abilities through the lifespan. In *Journal of Neurodevelopmental Disorders* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s11689-017-9220-y>
- Gomez, W., Morales, R., Maracaja-Coutinho, V., Parra, V., & Nassif, M. (2020). Down syndrome and Alzheimer's disease: common molecular traits beyond the amyloid precursor protein. *Aging*, *12*(1), 1011–1033. <https://doi.org/10.18632/aging.102677>
- Gómez-Herreros, F., Schuurs-Hoeijmakers, J. H. M., McCormack, M., Grealley, M. T., Rulten, S., Romero-Granados, R., Counihan, T. J., Chaila, E., Conroy, J., Ennis, S., Delanty, N., Cortés-Ledesma, F., de Brouwer, A. P. M., Cavalleri, G. L., El-Khamisy, S. F., de Vries, B. B. A., & Caldecott, K. W. (2014). TDP2 protects transcription from abortive topoisomerase activity and is required for normal neural function. *Nature Genetics*, *46*(5), 516–521. <https://doi.org/10.1038/ng.2929>
- Goud, EV. S. S., Gulati, S., Agrawal, A., Pani, P., Nishant, K., Pattnaik, S., & Gupta, S. (2021). Implications of Down's syndrome on oral health status in patients: A prevalence-based study. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, *10*(11), 4247. [https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc\\_885\\_21](https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_885_21)
- Granese, B., Scala, I., Spatuzza, C., Valentino, A., Coletta, M., Vacca, R. A., de Luca, P., & Andria, G. (2013). Validation of microarray data in human lymphoblasts shows a role of the ubiquitin-proteasome system and NF-κB in the pathogenesis of Down syndrome. *BMC Medical Genomics*, *6*(1). <https://doi.org/10.1186/1755-8794-6-24>

- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., & Davies, K. J. A. (2003). Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 305, Issue 3, pp. 709–718). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00809-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00809-X)
- Guidi, S., Bianchi, P., Stagni, F., Giacomini, A., Emili, M., Trazzi, S., & Ciani, E. (2017). Lithium Restores Age-related olfactory impairment in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *16*(7), 812–819. <https://doi.org/10.2174/1871527315666160801143108>
- Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtieri, F., Ciani, E., & Bartesaghi, R. (2008). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathology*, *18*(2), 180–197. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00113.x>
- Gupta, M., Dhanasekaran, A. R., & Gardiner, K. J. (2016). Mouse models of Down syndrome: gene content and consequences. In *Mammalian Genome* (Vol. 27, Issues 11–12, pp. 538–555). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9661-8>
- Hamlett, E. D., Boger, H. A., Ledreux, A., Kelley, C. M., Mufson, E. J., Falangola, M. F., Guilfoyle, D. N., Nixon, R. A., Patterson, D., Duval, N., & Granholm, A.-C. E. (2016). Cognitive Impairment, Neuroimaging, and Alzheimer Neuropathology in Mouse Models of Down Syndrome. *Current Alzheimer Research*, *13*, 35–52. <https://doi.org/10.2174/1567205012666150921095505>
- Hamlett, E. D., Hjorth, E., Ledreux, A., Gilmore, A., Schultzberg, M., & Granholm, A. C. (2020). RvE1 treatment prevents memory loss and neuroinflammation in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *GLIA*, *68*(7), 1347–1360. <https://doi.org/10.1002/glia.23779>
- Hansen, J. C., Ghosh, R. P., & Woodcock, C. L. (2010). Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. In *IUBMB Life* (Vol. 62, Issue 10, pp. 732–738). <https://doi.org/10.1002/iub.386>
- Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. In *Molecular Cell* (Vol. 28, Issue 5, pp. 739–745). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>
- Hassold, T., & Sherman, S. (2000). Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clinical Genetics*, *57*, 96–100. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0004.2000.570201.x>
- Hauer, M. H., & Gasser, S. M. (2017). Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes & Development*, *31*, 2204–2221. <https://doi.org/10.1101/gad.307702>

- Hebert, M. D., & Poole, A. R. (2017). Towards an understanding of regulating Cajal body activity by protein modification. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 761–778). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1243649>
- Hebert, M. D., Shpargel, K. B., Ospina, J. K., Tucker, K. E., & Matera, A. G. (2002). Coilin Methylation Regulates Nuclear Body Formation and one that directs symmetric dimethylarginine (sDMA) formation (type II). The majority of arginine methylation is carried out by type I enzymes, with PRMT1 and its. In *Developmental Cell* (Vol. 3). <http://www.developmentalcell.com/cgi/content/full/3/3/329/DC1>
- Helguera, P., Seiglie, J., Rodriguez, J., Hanna, M., Helguera, G., & Busciglio, J. (2013). Adaptive downregulation of mitochondrial function in down syndrome. *Cell Metabolism*, 17(1), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.005>
- Henderson, A., Eroles, J., Hoyt, M. A., & Coffino, P. (2011). Dependence of proteasome processing rate on substrate unfolding. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17495–17502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.212027>
- Herault, Y., Delabar, J. M., Fisher, E. M. C., Tybulewicz, V. L. J., Yu, E., & Brault, V. (2017a). Rodent models in Down syndrome research: Impact and future opportunities. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 10, Issue 10, pp. 1165–1186). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dmm.029728>
- Herault, Y., Delabar, J. M., Fisher, E. M. C., Tybulewicz, V. L. J., Yu, E., & Brault, V. (2017b). Rodent models in Down syndrome research: Impact and future opportunities. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 10, Issue 10, pp. 1165–1186). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dmm.029728>
- Hernández-Ortega, K., Garcia-Esparcia, P., Gil, L., Lucas, J. J., & Ferrer, I. (2016). Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathology*, 26(5), 593–605. <https://doi.org/10.1111/bpa.12335>
- Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V., & Lafontaine, D. L. J. (2010). The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 1, Issue 3, pp. 415–431). <https://doi.org/10.1002/wrna.39>
- Hithersay, R., Hamburg, S., Knight, B., & Strydom, A. (2017). Cognitive decline and dementia in Down syndrome. In *Current Opinion in Psychiatry* (Vol. 30, Issue 2, pp. 102–107). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000307>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/nejmra0804615>

- Höhn, A., Sittig, A., Jung, T., Grimm, S., & Grune, T. (2012). Lipofuscin is formed independently of macroautophagy and lysosomal activity in stress-induced prematurely senescent human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, *53*(9), 1760–1769. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.591>
- Holtzman, D. M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D. J., Daniels, S. E., Johnson, R. M., Chen, K., Sun, Y., Carlson, E., Alleva, E., Epstein, C. J., & Mobley, W. C. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *93*, 13333–13338.
- Huen, M. S. Y., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B., & Chen, J. (2007). The E3 ubiquitin ligase RNF8 transduces the DNA damage signal via an ubiquitin-dependent signaling pathway. *Cell*, *131*(5), 901–914. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.041>
- Hunter, C. L., Bimonte-Nelson, H. A., Nelson, M., Eckman, C. B., & Granholm, A. C. (2004). Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: Effects of estrogen. *Neurobiology of Aging*, *25*(7), 873–884. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.10.010>
- Hunter, C. L., Isacson, O., Nelson, M., Bimonte-Nelson, H., Seo, H., Lin, L., Ford, K., Kindy, M. S., & Granholm, A. C. (2003). Regional alterations in amyloid precursor protein and nerve growth factor across age in a mouse model of Down's syndrome. *Neuroscience Research*, *45*(4), 437–445. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(03\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(03)00005-1)
- Ishii, T., Sakurai, T., Usami, H., & Uchida, K. (2005). Oxidative modification of proteasome: Identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry*, *44*(42), 13893–13901. <https://doi.org/10.1021/bi051336u>
- Ito, K., & Takizawa, T. (2018a). Nuclear architecture in the nervous system: Development, function, and neurodevelopmental diseases. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00308>
- Ito, K., & Takizawa, T. (2018b). Nuclear architecture in the nervous system: Development, function, and neurodevelopmental diseases. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00308>
- Iyer, A. M., van Scheppingen, J., Milenkovic, I., Anink, J. J., Adle-Biassette, H., Kovacs, G. G., & Aronica, E. (2014). *mTOR Hyperactivation in Down Syndrome Hippocampus Appears Early During Development*. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000083>
- Izzo, A., Mollo, N., Nitti, M., Paladino, S., Cali, G., Genesio, R., Bonfiglio, F., Cicatiello, R., Barbato, M., Sarnataro, V., Conti, A., & Nitsch, L. (2018). Mitochondrial dysfunction in down syndrome: Molecular mechanisms and therapeutic targets. In *Molecular Medicine* (Vol. 24, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0004-y>

- Jafri, S. K., & Harman, K. E. (2020). Neurocognitive abilities in individuals with down syndrome- a narrative review. In *Turkish Journal of Pediatrics* (Vol. 62, Issue 6, pp. 897–905). Turkish National Pediatric Society. <https://doi.org/10.24953/turkyped.2020.06.001>
- Jain, S., Watts, C. A., Chung, W. C. J., & Welshhans, K. (2020). Neurodevelopmental wiring deficits in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neuroscience Letters*, 714. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134569>
- Janer, A., Martin, E., Muriel, M. P., Latouche, M., Fujigasaki, H., Ruberg, M., Brice, A., Trottier, Y., & Sittler, A. (2006). PML clastosomes prevent nuclear accumulation of mutant ataxin-7 and other polyglutamine proteins. *Journal of Cell Biology*, 174(1), 65–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511045>
- Jiang, X., Liu, C., Yu, T., Zhang, L., Meng, K., Xing, Z., Belichenko, P. v., Kleschevnikov, A. M., Pao, A., Peresie, J., Wie, S., Mobley, W. C., & Yu, Y. E. (2015). Genetic dissection of the Down syndrome critical region. *Human Molecular Genetics*, 24(22), 6540–6551. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv364>
- Jiang, Y., Sato, Y., Im, E., Berg, M., Bordi, M., Darji, S., Kumar, A., Mohan, P. S., Bandyopadhyay, U., Diaz, A., Cuervo, A. M., & Nixon, R. A. (2019). Lysosomal dysfunction in down syndrome is app-dependent and mediated by APP- $\beta$ CTF (c99). *Journal of Neuroscience*, 39(27), 5255–5268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0578-19.2019>
- Jung, T., Bader, N., & Grune, T. (2007). Lipofuscin: Formation, distribution, and metabolic consequences. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119(1), 97–111. <https://doi.org/10.1196/annals.1404.008>
- Jung, T., Engels, M., Kaiser, B., Poppek, D., & Grune, T. (2006). Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(8), 1303–1312. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.023>
- Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tsolou, A., Gonos, E. S., Thrasivoulou, C., Jill Saffrey, M., Cameron, K., & von Zglinicki, T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell*, 11(6), 996–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x>
- Kahlem, P., Sultan, M., Herwig, R., Steinfath, M., Balzereit, D., Eppens, B., Saran, N. G., Pletcher, M. T., South, S. T., Stetten, G., Lehrach, H., Reeves, R. H., & Yaspo, M. L. (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of Down syndrome. *Genome Research*, 14(7), 1258–1267. <https://doi.org/10.1101/gr.1951304>

- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., & Steward, R. (2005). PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes and Development*, *19*(4), 431–435. <https://doi.org/10.1101/gad.1263005>
- Katyal, S., Lee, Y., Nitiss, K. C., Downing, S. M., Li, Y., Shimada, M., Zhao, J., Russell, H. R., Petrini, J. H. J., Nitiss, J. L., & McKinnon, P. J. (2014). Aberrant topoisomerase-1 DNA lesions are pathogenic in neurodegenerative genome instability syndromes. *Nature Neuroscience*, *17*(6), 813–821. <https://doi.org/10.1038/nn.3715>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 365–381). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
- Keller, J. N., Hanni, K. B., & Markesbery, R. (2000). Rapid Communication Impaired Proteasome Function in Alzheimer's Disease. In *J. Neurochem* (Vol. 75). <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750436.x>
- Kemeny, S., Tatout, C., Salaun, G., Pebrel-Richard, C., Goumy, C., Ollier, N., Maurin, E., Pereira, B., Vago, P., & Gouas, L. (2018). Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells. *Chromosoma*, *127*(2), 247–259. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0653-6>
- Kirstein, M., Cambrils, A., Segarra, A., Melero, A., & Varea, E. (2022). Cholinergic Senescence in the Ts65Dn Mouse Model for Down Syndrome. *Neurochemical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03659-0>
- Klein, J. A., & Haydar, T. F. (2022). Neurodevelopment in Down syndrome: Concordance in humans and models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.941855>
- Kleschevnikov, A. M., Yu, J., Kim, J., Lysenko, L. v., Zeng, Z., Yu, Y. E., & Mobley, W. C. (2017). Evidence that increased Kcnj6 gene dose is necessary for deficits in behavior and dentate gyrus synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiology of Disease*, *103*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.009>
- Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., Nixon, R. A., & Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>
- Koenig, K. A., Oh, S.-H., Stasko, M. R., Roth, E. C., Taylor, H. G., Ruedrich, S., Wang, Z. I., Leverenz, J. B., & Costa, A. C. S. (2021). High resolution structural and functional MRI of the hippocampus in young adults with Down syndrome. *Brain Communications*, *3*(2). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab088>

- Korovila, I., Hugo, M., Castro, J. P., Weber, D., Höhn, A., Grune, T., & Jung, T. (2017). Proteostasis, oxidative stress and aging. In *Redox Biology* (Vol. 13, pp. 550–567). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.008>
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E. A., Trempe, J. F., Saeki, Y., Tanaka, K., & Matsuda, N. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*, *510*(7503), 162–166. <https://doi.org/10.1038/nature13392>
- Krohne, T. U., Kaemmerer, E., Holz, F. G., & Kopitz, J. (2010). Lipid peroxidation products reduce lysosomal protease activities in human retinal pigment epithelial cells via two different mechanisms of action. *Experimental Eye Research*, *90*(2), 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.10.014>
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., & Brunk, U. T. (2008). Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1780, Issue 11, pp. 1291–1303). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.01.009>
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 84, pp. 435–464). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>
- Lafarga, M., Andres, M. A., Berciano, M. T., & Maquiera, E. (1991). Organization of Nucleoli and Nuclear Bodies in Osmotically Stimulated Supraoptic Neurons of the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *308*, 329–339.
- Lafarga, M., Berciano, M. T., Pena, E., Mayo, I., Castaño, J. G., Bohmann, D., Rodrigues, J. P., Tavanez, J. P., & Carmo-Fonseca, M. (2002). Clastosome: A subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(8), 2771–2782. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-03-0122>
- Lafarga, M., Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., & Berciano, M. T. (2009). Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. In *Chromosoma* (Vol. 118, Issue 4, pp. 437–443). <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0212-x>
- Lafarga, V., Tapia, O., Sharma, S., Bengoechea, R., Stoecklin, G., Lafarga, M., & Berciano, M. T. (2018). CBP-mediated SMN acetylation modulates Cajal body biogenesis and the cytoplasmic targeting of SMN. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(3), 527–546. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2638-2>
- Lamond, A. L., & Spector, D. L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *4*, 605–612. <https://doi.org/10.1038/nrm1172>
- Lana-Elola, E., Watson-Scales, S. D., Fisher, E. M. C., & Tybulewicz, V. L. J. (2011). Down syndrome: Searching for the genetic culprits. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 4, Issue 5, pp. 586–595). <https://doi.org/10.1242/dmm.008078>

- Lanfranchi, S., Toffanin, E., Zilli, S., Panzeri, B., & Vianello, R. (2014). Memory coding in individuals with Down syndrome. *Child Neuropsychology*, *20*(6), 700–712. <https://doi.org/10.1080/09297049.2013.856396>
- Lanzillotta, C., & di Domenico, F. (2021). Stress Responses in Down Syndrome Neurodegeneration: State of the Art and Therapeutic Molecules. *Biomolecules*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/biom1102>
- Lanzillotta, C., Zuliani, I., Tramutola, A., Barone, E., Blarmino, C., Folgiero, V., Caforio, M., Valentini, D., Villani, A., Locatelli, F., Butterfield, D. A., Head, E., Perluigi, M., Abisambra, J. F., & di Domenico, F. (2021). Chronic PERK induction promotes Alzheimer-like neuropathology in Down syndrome: Insights for therapeutic intervention. *Progress in Neurobiology*, *196*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101892>
- Larrimore, K. E., Barattin-Voynova, N. S., Reid, D. W., & Ng, D. T. W. (2020). Aneuploidy-induced proteotoxic stress can be effectively tolerated without dosage compensation, genetic mutations, or stress responses. *BMC Biology*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00852-x>
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, *524*(7565), 309–314. <https://doi.org/10.1038/nature14893>
- Letourneau, A., & Antonarakis, S. E. (2012). Genomic determinants in the phenotypic variability of Down syndrome. In *Progress in Brain Research* (Vol. 197, pp. 15–28). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-54299-1.00002-9>
- Letourneau, A., Santoni, F. A., Bonilla, X., Sailani, M. R., Gonzalez, D., Kind, J., Chevalier, C., Thurman, R., Sandstrom, R. S., Hibaoui, Y., Garieri, M., Popadin, K., Falconnet, E., Gagnebin, M., Gehrig, C., Vannier, A., Guipponi, M., Farinelli, L., Robyr, D., ... Antonarakis, S. E. (2014). Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature*, *508*(7496), 345–350. <https://doi.org/10.1038/nature13200>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lockrow, J. P., Fortress, A. M., & Granholm, A. C. E. (2012). Age-related neurodegeneration and memory loss in down syndrome. In *Current Gerontology and Geriatrics Research* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/463909>
- Lorenzi, H. A., & Reeves, R. H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain Research*, *1104*(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.022>

- Lorenzo, L. P. E., Shatynski, K. E., Clark, S., Yarowsky, P. J., & Williams, M. S. (2013). Defective thymic progenitor development and mature T-cell responses in a mouse model for Down syndrome. *Immunology*, *139*(4), 447–458. <https://doi.org/10.1111/imm.12092>
- Lott, I. T. (2012a). Neurological phenotypes for Down syndrome across the life span. *Progress in Brain Research*, *197*(714), 101–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-54299-1.00006-6>
- Lott, I. T. (2012b). Antioxidants in Down syndrome. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1822, Issue 5, pp. 657–663). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.010>
- Lott, I. T., & Dierssen, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. In *The Lancet Neurology* (Vol. 9, Issue 6, pp. 623–633). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70112-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70112-5)
- Lott, I. T., & Head, E. (2019). Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 135–147). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0132-6>
- Loveall, S. J., & Barton-Hulsey, A. (2021). Reading Skills in Down Syndrome: Implications for Clinical Practice. *Semin Speech Lang*, *42*(4), 330–344. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1730991>
- Lowry, O. H., Rosebrouh, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265–275. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89160-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89160-4)
- Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A. (2007). Lysosomes: Fusion and function. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 8, pp. 622–632). <https://doi.org/10.1038/nrm2217>
- Lyle, R., Béna, F., Gagos, S., Gehrig, C., Lopez, G., Schinzel, A., Lespinasse, J., Bottani, A., Dahoun, S., Taine, L., Doco-Fenzy, M., Cornillet-Lefèbvre, P., Pelet, A., Lyonnet, S., Toutain, A., Colleaux, L., Horst, J., Kennerknecht, I., Wakamatsu, N., ... Antonarakis, S. E. (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *European Journal of Human Genetics*, *17*(4), 454–466. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.214>
- Lyle, R., Gehrig, C., Neergaard-Henrichsen, C., Deutsch, S., & Antonarakis, S. E. (2004). Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of Down syndrome. *Genome Research*, *14*(7), 1268–1274. <https://doi.org/10.1101/gr.2090904>
- Maass, P. G., Barutcu, A. R., & Rinn, J. L. (2019a). Interchromosomal interactions: A genomic love story of kissing chromosomes. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 218, Issue 1, pp. 27–38). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201806052>

- Maass, P. G., Barutcu, A. R., & Rinn, J. L. (2019b). Interchromosomal interactions: A genomic love story of kissing chromosomes. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 218, Issue 1, pp. 27–38). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201806052>
- Machyna, M., Heyn, P., & Neugebauer, K. M. (2013). Cajal bodies: Where form meets function. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/wrna.1139>
- Machyna, M., Kehr, S., Straube, K., Kappei, D., Buchholz, F., Butter, F., Ule, J., Hertel, J., Stadler, P. F., & Neugebauer, K. M. (2014a). The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through cajal bodies. *Molecular Cell*, *56*(3), 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.004>
- Machyna, M., Kehr, S., Straube, K., Kappei, D., Buchholz, F., Butter, F., Ule, J., Hertel, J., Stadler, P. F., & Neugebauer, K. M. (2014b). The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through cajal bodies. *Molecular Cell*, *56*(3), 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.004>
- Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., Rueda, R., Phan, T. X., Yamakawa, H., Pao, P. C., Stott, R. T., Gjoneska, E., Nott, A., Cho, S., Kellis, M., & Tsai, L. H. (2015). Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell*, *161*(7), 1592–1605. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.032>
- Madabhushi, R., Pan, L., & Tsai, L. H. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. In *Neuron* (Vol. 83, Issue 2, pp. 266–282). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.034>
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007). RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell*, *131*(5), 887–900. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.040>
- Manna, C., Officioso, A., Trojsi, F., Tedeschi, G., Leoncini, S., Signorini, C., Ciccoli, L., & de Felice, C. (2016). Increased non-protein bound iron in Down syndrome: contribution to lipid peroxidation and cognitive decline. *Free Radical Research*, *50*(12), 1422–1431. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1253833>
- Martinez, J. L., Zammit, M. D., West, N. R., Christian, B. T., & Bhattacharyya, A. (2021). Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Linking Down Syndrome and Alzheimer's Disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.703876>
- Martínez-Cué, C., Delatour, B., & Potier, M. C. (2014). Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: Use of GABA  $\alpha$ 5-selective inverse agonists. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 46, Issue P2, pp. 218–227). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.12.008>

- Martínez-Cué, C., Martínez, P., Rueda, N., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Corrales, A., Montero, J. A., Pazos, Á., Flórez, J., Gasser, R., Thomas, A. W., Honer, M., Knoflach, F., Trejo, J. L., Wettstein, J. G., & Hernández, M. C. (2013). Reducing GABAA  $\alpha$ 5 receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome. *Journal of Neuroscience*, *33*(9), 3953–3966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1203-12.2013>
- Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2020a). Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00016>
- Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2020b). Signalling pathways implicated in alzheimer's disease neurodegeneration in individuals with and without down syndrome. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18, pp. 1–36). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21186906>
- Martínez-Cué, C., Rueda, N., García, E., Davisson, M. T., Schmidt, C., & Flórez, J. (2005). Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, *163*(2), 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.04.016>
- Mata-Garrido, J., Casafont, I., Tapia, O., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2016). Neuronal accumulation of unrepaired DNA in a novel specific chromatin domain: structural, molecular and transcriptional characterization. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*, 41. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0312-9>
- Mazur-Kolecka, B., Golabek, A., Nowicki, K., Flory, M., & Frackowiak, J. (2006). Amyloid- $\beta$  impairs development of neuronal progenitor cells by oxidative mechanisms. *Neurobiology of Aging*, *27*(9), 1181–1192. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.07.006>
- McCann, B., Levman, J., Baumer, N., Lam, M. Y., Shiohama, T., Cogger, L., MacDonald, A., Ijner, P., & Takahashi, E. (2021). Structural magnetic resonance imaging demonstrates volumetric brain abnormalities in down syndrome: Newborns to young adults. *NeuroImage: Clinical*, *32*. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2021.102815>
- Mcstay, B. (2016). Nucleolar organizer regions: genomic “dark matter” requiring illumination. *Genes Dev.*, *30*, 1598–1610. <https://doi.org/10.1101/gad.283838>
- Mehta, S., & Zhang, J. (2022). Liquid-liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer. *Nature Rev Cancer*, *22*, 239–252. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00444-7>
- Meier, U. T. (2017). RNA modification in Cajal bodies. In *RNA Biology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 693–700). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1249091>

- Mentis, A. F. A. (2016). Epigenomic engineering for Down syndrome. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 71, pp. 323–327). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.012>
- Millan Sanchez, M., Heyn, S. N., Das, D., Moghadam, S., Martin, K. J., & Salehi, A. (2012). Neurobiological elements of cognitive dysfunction in down syndrome: Exploring the role of APP. In *Biological Psychiatry* (Vol. 71, Issue 5, pp. 403–409). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.08.016>
- Mollo, N., Cicatiello, R., Aurilia, M., Scognamiglio, R., Genesio, R., Charalambous, M., Paladino, S., Conti, A., Nitsch, L., & Izzo, A. (2020). Targeting mitochondrial network architecture in down syndrome and aging. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21093134>
- Moore, C. S. (2006). Postnatal lethality and cardiac anomalies in the Ts65Dn Down syndrome mouse model. *Mammalian Genome*, 17(10), 1005–1012. <https://doi.org/10.1007/s00335-006-0032-8>
- Morawiec, Z., Janik, K., Kowalski, M., Stetkiewicz, T., Szaflik, J., Morawiec-Bajda, A., Sobczuk, A., & Blasiak, J. (2008a). DNA damage and repair in children with Down's syndrome. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 637(1–2), 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.010>
- Morawiec, Z., Janik, K., Kowalski, M., Stetkiewicz, T., Szaflik, J., Morawiec-Bajda, A., Sobczuk, A., & Blasiak, J. (2008b). DNA damage and repair in children with Down's syndrome. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 637(1–2), 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.010>
- Moreno-García, A., Kun, A., Calero, O., Medina, M., & Calero, M. (2018). An overview of the role of lipofuscin in age-related neurodegeneration. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00464>
- Muchová, J., Žitňanová, I., & Ďuračková, Z. (2014). Oxidative stress and Down syndrome. do antioxidants play a role in therapy? In *Physiological Research* (Vol. 63, Issue 5, pp. 535–542). Czech Academy of Sciences. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932722>
- Murray, A., Letourneau, A., Canzonetta, C., Stathaki, E., Gimelli, S., Sloan-Bena, F., Abrehart, R., Goh, P., Lim, S., Baldo, C., Dagna-Bricarelli, F., Hannan, S., Mortensen, M., Ballard, D., Syndercombe Court, D., Fusaki, N., Hasegawa, M., Smart, T. G., Bishop, C., ... Nizetic, D. (2015). Isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells*, 33(6), 2077–2084. <https://doi.org/10.1002/stem.1968>

- Narcís, J. O., Tapia, O., Tarabal, O., Piedrafita, L., Calderó, J., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2018). Accumulation of poly(A) RNA in nuclear granules enriched in Sam68 in motor neurons from the SMN $\Delta$ 7 mouse model of SMA. *Scientific Reports*, *8*(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27821-3>
- Nardone, R., Marth, R., Ausserer, H., Bratti, A., & Tezzon, F. (2006). Reduced short latency afferent inhibition in patients with Down syndrome and Alzheimer-type dementia. *Clinical Neurophysiology*, *117*(10), 2204–2210. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.07.134>
- Nash, H., & Heath, J. (2011). The role of vocabulary, working memory and inference making ability in reading comprehension in Down syndrome. *Research in Developmental Disabilities*, *32*(5), 1782–1791. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2011.03.007>
- Navascues, J., Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2008). SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *Journal of Structural Biology*, *163*(2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.04.013>
- Necchi, D., Lomoio, S., & Scherini, E. (2011). Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in the cerebellum of aging Ts65Dn mice. *Experimental Neurology*, *232*(2), 114–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.08.009>
- Necchi, D., Pinto, A., Tillhon, M., Dutto, I., Serafini, M. M., Lanni, C., Govoni, S., Racchi, M., & Prospero, E. (2015a). Defective DNA repair and increased chromatin binding of DNA repair factors in Down syndrome fibroblasts. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *780*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.07.009>
- Necchi, D., Pinto, A., Tillhon, M., Dutto, I., Serafini, M. M., Lanni, C., Govoni, S., Racchi, M., & Prospero, E. (2015b). Defective DNA repair and increased chromatin binding of DNA repair factors in Down syndrome fibroblasts. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *780*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.07.009>
- Newpher, T. M., & Ehlers, M. D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 19, Issue 5, pp. 218–227).  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.02.004>
- Nicolas, M., & Hassan, B. A. (2014). Amyloid precursor protein and neural development. *Development (Cambridge)*, *141*(13), 2543–2548. <https://doi.org/10.1242/dev.108712>
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Friedland, R. P., Hirai, K., Chiba, S., & Smith, M. A. (2000). Neuronal Oxidative Stress Precedes Amyloid-Deposition in Down Syndrome. In *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (Vol. 59, Issue 11).  
<http://jnen.oxfordjournals.org/>
- Odetti, P., Angelini, G., Dapino, D., Zaccheo, D., Garibaldi, S., Dagna-Bricarelli, F., Piombo, G., Perry, G., Smith, M., Traverso, N., & Tabaton, M. (1998). Early Glycoxidation Damage in Brains from Down's Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *243*, 849–851.

- Ofen, N., Kao, Y. C., Sokol-Hessner, P., Kim, H., Whitfield-Gabrieli, S., & Gabrieli, J. D. E. (2007). Development of the declarative memory system in the human brain. *Nature Neuroscience*, *10*(9), 1198–1205. <https://doi.org/10.1038/nn1950>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2004). Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *58*(2), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.09.028>
- Olmos-Serrano, J. L., Tyler, W. A., Cabral, H. J., & Haydar, T. F. (2016). Longitudinal measures of cognition in the Ts65Dn mouse: Refining windows and defining modalities for therapeutic intervention in Down syndrome. *Experimental Neurology*, *279*, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.02.005>
- Olson, L. E., Roper, R. J., Sengstaken, C. L., Peterson, E. A., Aquino, V., Galdzicki, Z., Siarey, R., Pletnikov, M., Moran, T. H., & Reeves, R. H. (2007). Trisomy for the Down syndrome “critical region” is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Human Molecular Genetics*, *16*(7), 774–782. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm022>
- Orlowski, M., & Wilk, S. (2000). Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 383, Issue 1, pp. 1–16). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2036>
- Oromendia, A. B., & Amon, A. (2014). Aneuploidy: Implications for protein homeostasis and disease. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 7, Issue 1, pp. 15–20). <https://doi.org/10.1242/dmm.013391>
- Palanca, A., Casafont, I., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2014). Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(6), 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.016>
- Palay, S. L., & Chan-Palay V. (1976). A guide to the synaptic analysis of the neuropil. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *40*(1).
- Pan, L., Penney, J., & Tsai, L. H. (2014). Chromatin regulation of DNA damage repair and genome integrity in the central nervous system. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 426, Issue 20, pp. 3376–3388). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.08.001>
- Pandey, U. B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B. A., Ritson, G. P., Nedelsky, N. B., Schwartz, S. L., Diprospero, N. A., Knight, M. A., Schuldiner, O., Padmanabhan, R., Hild, M., Berry, D. L., Garza, D., Hubbert, C. C., Yao, T. P., Baehrecke, E. H., & Taylor, J. P. (2007). HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*, *447*(7146), 859–863. <https://doi.org/10.1038/nature05853>

- Papavassiliou, P., Charalsawadi, C., Rafferty, K., & Jackson-Cook, C. (2015). Mosaicism for trisomy 21: A review. In *American Journal of Medical Genetics, Part A* (Vol. 167, Issue 1, pp. 26–39). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36861>
- Parisotto, E. B., Vidal, V., García-Cerro, S., Lantigua, S., Wilhelm Filho, D., Sanchez-Barceló, E. J., Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2016). Chronic Melatonin Administration Reduced Oxidative Damage and Cellular Senescence in the Hippocampus of a Mouse Model of Down Syndrome. *Neurochemical Research*, *41*(11), 2904–2913. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2008-8>
- Parlato, R., & Kreiner, G. (2013). Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: A missing piece of the puzzle? In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 91, Issue 5, pp. 541–547). <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0981-1>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 20, Issue 3, pp. 460–473). <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pawlikowski, B., Betta, N. D., Elston, T., Williams, D. A., & Olwin, B. B. (2018). Muscle stem cell dysfunction impairs muscle regeneration in a mouse model of Down syndrome. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22342-5>
- Pelleri, M. C., Cicchini, E., Petersen, M. B., Tranebjærg, L., Mattina, T., Magini, P., Antonaros, F., Caracausi, M., Vitale, L., Locatelli, C., Seri, M., Strippoli, P., Piovesan, A., & Cocchi, G. (2019). Partial trisomy 21 map: Ten cases further supporting the highly restricted Down syndrome critical region (HR-DSCR) on human chromosome 21. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *7*(8). <https://doi.org/10.1002/mgg3.797>
- Pena, E., Berciano, M. T., Fernandez, R., Ojeda, J. L., & Lafarga, M. (2001a). Neuronal Body Size Correlates With the Number of Nucleoli and Cajal Bodies, and With the Organization of the Splicing Machinery in Rat Trigeminal Ganglion Neurons. *J. Comp. Neurol*, *430*, 250–263.
- Pena, E., Berciano, M. T., Fernandez, R., Ojeda, J. L., & Lafarga, M. (2001b). Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *Journal of Comparative Neurology*, *430*(2), 250–263. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010205\)430:2<250::AID-CNE1029>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010205)430:2<250::AID-CNE1029>3.0.CO;2-L)
- Pérez-Cremades, D., Hernández, S., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., Nacher, J., & Varea, E. (2010). Alteration of inhibitory circuits in the somatosensory cortex of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome. *Journal of Neural Transmission*, *117*(4), 445–455. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0376-9>

- Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2012a). Oxidative stress and down syndrome: A route toward Alzheimer-like dementia. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/724904>
- Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2012b). Oxidative stress and down syndrome: A route toward Alzheimer-like dementia. In *Current Gerontology and Geriatrics Research* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/724904>
- Perluigi, M., di Domenico, F., & Butterfield, D. A. (2014). Unraveling the complexity of neurodegeneration in brains of subjects with Down syndrome: Insights from proteomics. In *Proteomics - Clinical Applications* (Vol. 8, Issues 1–2, pp. 73–85). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/prca.201300066>
- Perluigi, M., di Domenico, F., Fiorini, A., Cocciolo, A., Giorgi, A., Foppoli, C., Butterfield, D. A., Giorlandino, M., Giorlandino, C., Eugenia Schininà, M., & Coccia, R. (2011). Oxidative stress occurs early in Down syndrome pregnancy: A redox proteomics analysis of amniotic fluid. *Proteomics - Clinical Applications*, 5(3–4), 167–178. <https://doi.org/10.1002/prca.201000121>
- Perluigi, M., Pupo, G., Tramutola, A., Cini, C., Coccia, R., Barone, E., Head, E., Butterfield, D. A., & di Domenico, F. (2014). Neuropathological role of PI3K/Akt/mTOR axis in Down syndrome brain. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(7), 1144–1153. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.04.007>
- Pestinger, V., Wijeratne, S. S. K., Rodriguez-Melendez, R., & Zempleni, J. (2011). Novel histone biotinylation marks are enriched in repeat regions and participate in repression of transcriptionally competent genes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(4), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.02.011>
- Phillips, C., Fahimi, A., Das, D., Mojabi, F. S., Ponnusamy, R., & Salehi, A. (2016). Noradrenergic System in Down Syndrome and Alzheimer's Disease A Target for Therapy. *Current Alzheimer Research*, 13, 68–83. <https://doi.org/10.2174/1567205012666150921095924>
- Piccoli, C., Izzo, A., Scrima, R., Bonfiglio, F., Manco, R., Negri, R., Quarato, G., Cela, O., Ripoli, M., Prisco, M., Gentile, F., Cali, G., Pinton, P., Conti, A., Nitsch, L., & Capitanio, N. (2013). Chronic pro-oxidative state and mitochondrial dysfunctions are more pronounced in fibroblasts from down syndrome foeti with congenital heart defects. *Human Molecular Genetics*, 22(6), 1218–1232. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds529>
- Powers, B. E., Velazquez, R., Kelley, C. M., Ash, J. A., Strawderman, M. S., Alldred, M. J., Ginsberg, S. D., Mufson, E. J., & Strupp, B. J. (2016). Attentional function and basal forebrain cholinergic neuron morphology during aging in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Brain Structure and Function*, 221(9), 4337–4352. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1164-y>

- Price, B. D., & D'Andrea, A. D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. In *Cell* (Vol. 152, Issue 6, pp. 1344–1354). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.011>
- Puente-Bedia, A., Berciano, M. T., Tapia, O., Martínez-Cué, C., Lafarga, M., & Rueda, N. (2021). Nuclear reorganization in hippocampal granule cell neurons from a mouse model of down syndrome: Changes in chromatin configuration, nucleoli and cajal bodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–21.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22031259>
- Pujol, J., Fenoll, R., Ribas-Vidal, N., Martínez-Vilavella, G., Blanco-Hinojo, L., García-Alba, J., Deus, J., Novell, R., & Esteba-Castillo, S. (2018). A longitudinal study of brain anatomy changes preceding dementia in Down syndrome. *NeuroImage: Clinical*, 18, 160–166.  
<https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.01.024>
- Qian, W., Jin, N., Shi, J., Yin, X., Jin, X., Wang, S., Cao, M., Iqbal, K., Gong, C. X., & Liu, F. (2013). Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) enhances tau expression. *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(3), 529–538.  
<https://doi.org/10.3233/JAD-130824>
- Rachidi, M., & Lopes, C. (2007). Mental retardation in Down syndrome: From gene dosage imbalance to molecular and cellular mechanisms. In *Neuroscience Research* (Vol. 59, Issue 4, pp. 349–369). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.08.007>
- Rachubinski, A. L., Maclean, K. N., Evans, J. R., & Bjugstad, K. B. (2012). Modulating cognitive deficits and tau accumulation in a mouse model of aging Down syndrome through neonatal implantation of neural progenitor cells. *Experimental Gerontology*, 47(9), 723–733. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.06.013>
- Rahmani, Z., Blouin, J.-L., Creau-Goldbergt, N., Watkinst, P. C., Mattei, J.-F. Šois, Poissonnier, M., Prieurii, M., Chetrouh, Z., Nicole, A., Aurias, A., Sinet, P.-M., & Delabar, J.-M. (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 86).
- Rakovic, A., Shurkewitsch, K., Seibler, P., Grünwald, A., Zanon, A., Hagenah, J., Krainc, D., & Klein, C. (2013). Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced Putative Kinase 1 (PINK1)-dependent ubiquitination of endogenous parkin attenuates mitophagy: Study in human primary fibroblasts and induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2223–2237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.391680>
- Ranweiler, R. (2009). Assessment and Care of the Newborn with Down Syndrome. In *Advances in Neonatal Care* (Vol. 9, Issue 1). <https://doi.org/10.1097/01.ANC.0000346090.05240.ab>
- Raška, I., Shaw, P. J., & Cmarko, D. (2006). New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. In *International Review of Cytology* (Vol. 255, pp. 177–235).  
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)55004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)55004-1)

- Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.*, 17(1), 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Ribak, C. E., & Shapiro, L. A. (2007). Ultrastructure and synaptic connectivity of cell types in the adult rat dentate gyrus. In *Progress in Brain Research* (Vol. 163, pp. 155–166). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63009-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63009-X)
- Riederer, B. M., Leuba, G., Vernay, A., & Riederer, I. M. (2011). The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 236, Issue 3, pp. 268–276). <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010327>
- Rissman, R. A., & Mobley, W. C. (2011). Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 117, Issue 4, pp. 613–622). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07237.x>
- Rodríguez-Sureda, V., Vilches, Á., Sánchez, O., Audí, L., & Domínguez, C. (2015). Intracellular oxidant activity, antioxidant enzyme defense system, and cell senescence in fibroblasts with trisomy 21. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/509241>
- Roizen, N. J., & Patterson, D. (2003). Down's syndrome. In *The Lancet* (Vol. 361). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12987-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12987-X)
- Roper, R. J., & Reeves, R. H. (2006). Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. In *PLoS Genetics* (Vol. 2, Issue 3, pp. 0231–0236). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020050>
- Roper, R. J., st. John, H. K., Philip, J., Lawler, A., & Reeves, R. H. (2006). Perinatal loss of Ts65Dn Down syndrome mice. *Genetics*, 172(1), 437–443. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.050898>
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(7), S10. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2011). The Ts65Dn mouse model of Down syndrome shows reduced expression of the Bcl-X L antiapoptotic protein in the hippocampus not accompanied by changes in molecular or cellular markers of cell death. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(7), 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.06.001>
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2012). Mouse models of down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities. In *Neural Plasticity* (Vol. 2012). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2012/584071>
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2013). Apoptosis in Down's syndrome: Lessons from studies of human and mouse models. *Apoptosis*, 18(2), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s10495-012-0785-3>

- Rueda, N., Llorens-Martín, M., Flórez, J., Valdizán, E., Banerjee, P., Trejo, J. L., & Martínez-Cué, C. (2010). Memantine normalizes several phenotypic features in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *Journal of Alzheimer's Disease*, *21*(1), 277–290. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100240>
- Rueda, N., & Martínez-Cué, C. (2020). Antioxidants in down syndrome: From preclinical studies to clinical trials. *Antioxidants*, *9*(8), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox9080692>
- Rueda, N., Mostany, R., Pazos, Á., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2005). Cell proliferation is reduced in the dentate gyrus of aged but not young Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neuroscience Letters*, *380*(1–2), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.039>
- Rueda, N., Vidal, V., García-Cerro, S., Narcís, J. O., Llorens-Martín, M., Corrales, A., Lantigua, S., Iglesias, M., Merino, J., Merino, R., & Martínez-Cué, C. (2018a). Anti-IL17 treatment ameliorates Down syndrome phenotypes in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *73*(May), 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.05.008>
- Rueda, N., Vidal, V., García-Cerro, S., Narcís, J. O., Llorens-Martín, M., Corrales, A., Lantigua, S., Iglesias, M., Merino, J., Merino, R., & Martínez-Cué, C. (2018b). Anti-IL17 treatment ameliorates Down syndrome phenotypes in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *73*, 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.05.008>
- Rueda, N., Vidal, V., García-Cerro, S., Puente, A., Campa, V., Lantigua, S., Narcís, O., Bartesaghi, R., & Martínez-Cué, C. (2020). Prenatal, but not postnatal, curcumin administration rescues neuromorphological and cognitive alterations in Ts65Dn down syndrome mice. *Journal of Nutrition*, *150*(9), 2478–2489. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa207>
- Ruiz-Soto, M., Riancho, J., Tapia, O., Lafarga, M., & Berciano, M. T. (2020). Satellite Glial Cells of the Dorsal Root Ganglion: A New “Guest/Physiopathological Target” in ALS. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.595751>
- Salehi, A., Faizi, M., Colas, D., Valletta, J., Laguna, J., Takimoto-Kimura, R., Kleschevnikov, A., Wagner, S. L., Aisen, P., Shamloo, M., & Mobley, W. C. (2009). Restoration of Norepinephrine-Modulated Contextual Memory in a Mouse Model of Down Syndrome. *Sci Transl Med.*, *1*(7), 7–17. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000258>
- Sánchez-Font, M. F., Sebastià, J., Sanfeliu, C., Cristòfol, R., Marfany, G., & González-Duarte, R. (2003). Peroxiredoxin 2 (PRDX2), an antioxidant enzyme, is under-expressed in Down syndrome fetal brains. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *60*(7), 1513–1523. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3048-1>
- Savino, T. M., Gébrane-Younès, J., de Mey, J., Sibarita, J.-B., & Hernandez-Verdun, D. (2001). Nucleolar Assembly of the rRNA Processing Machinery in Living Cells. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 153, Issue 5). <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1097>

- Sawyer, I. A., Sturgill, D., Sung, M. H., Hager, G. L., & Dunder, M. (2016). Cajal body function in genome organization and transcriptome diversity. *BioEssays*, 38(12), 1197–1208. <https://doi.org/10.1002/bies.201600144>
- Schöfer, C., & Weipoltshammer, K. (2018). Nucleolus and chromatin. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 150, Issue 3, pp. 209–225). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1696-3>
- Schuck, S. (2020). Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. In *Journal of Cell Science* (Vol. 133, Issue 17). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.246322>
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, 6(2), 168–170. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>
- Seo, H., & Isacson, O. (2005). Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Experimental Neurology*, 193(2), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.017>
- Shadfar, S., Brocardo, M., & Atkin, J. D. (2022). The Complex Mechanisms by Which Neurons Die Following DNA Damage in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052484>
- Shapiro BL. (2001). Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome. *Journal of Neural Transmission*, 61, 11–34. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6262-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6262-0_2)
- Sharma, V., Collins, L. B., Chen, T., Herr, N., Takeda, S., Sun, W., Swenberg, J. A., & Nakamura, J. (2016). Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*, 7(18), 25377–25390. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8298>
- Sheltzer, J. M., Torres, E. M., Dunham, M. J., & Amon, A. (2012). Transcriptional consequences of aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12644–12649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209227109>
- Shevtsov, S. P., & Dunder, M. (2011). Nucleation of nuclear bodies by RNA. *Nature Cell Biology*, 13(2), 167–173. <https://doi.org/10.1038/ncb2157>
- Shichiri, M., Yoshida, Y., Ishida, N., Hagihara, Y., Iwahashi, H., Tamai, H., & Niki, E. (2011).  $\alpha$ -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(12), 1801–1811. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.023>

- Shoaib, M., Walter, D., Gillespie, P. J., Izard, F., Fahrenkrog, B., Lleres, D., Lerdrup, M., Johansen, J. V., Hansen, K., Julien, E., Blow, J. J., & Sørensen, C. S. (2018). Histone H4K20 methylation mediated chromatin compaction threshold ensures genome integrity by limiting DNA replication licensing. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06066-8>
- Siarey, R. J., Kline-Burgess, A., Cho, M., Balbo, A., Best, T. K., Harashima, C., Klann, E., & Galdzicki, Z. (2006). Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Journal of Neurochemistry*, *98*(4), 1266–1277. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03971.x>
- Simon, J. A., & Kingston, R. E. (2009). Mechanisms of Polycomb gene silencing: Knowns and unknowns. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 10, Issue 10, pp. 697–708). <https://doi.org/10.1038/nrm2763>
- Singh, M. P., Wijeratne, S. S. K., & Zemleni, J. (2013). Biotinylation of lysine 16 in histone H4 contributes toward nucleosome condensation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *529*(2), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.11.005>
- Singleton, M. K., Gonzales, M. L., Leung, K. N., Yasui, D. H., Schroeder, D. I., Dunaway, K., & LaSalle, J. M. (2011). MeCP2 is required for global heterochromatic and nucleolar changes during activity-dependent neuronal maturation. *Neurobiology of Disease*, *43*(1), 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.03.011>
- Smirnov, E., Cmarko, D., Mazel, T., Hornáček, M., & Raška, I. (2016). Nucleolar DNA: the host and the guests. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 145, Issue 4, pp. 359–372). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1407-x>
- Spector, D. L. (2006). SnapShot: Cellular Bodies. In *Cell* (Vol. 127, Issue 5, pp. 1071.e1-1071.e2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.026>
- Stagni, F., Giacomini, A., Emili, M., Guidi, S., & Bartesaghi, R. (2018). Neurogenesis impairment: An early developmental defect in Down syndrome. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 114, pp. 15–32). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.07.026>
- Stepan, J., Dine, J., & Eder, M. (2015). Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: Network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00160>
- Stewart, L. S., Persinger, M. A., Cortez, M. A., & Snead, O. C. (2007). Chronobiometry of behavioral activity in the Ts65Dn model of Down syndrome. *Behavior Genetics*, *37*(2), 388–398. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9119-y>

- Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 32, pp. 22–37). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.010>
- Suberbielle, E., Sanchez, P. E., Kravitz, A. v., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., Devidze, N., Kreitzer, A. C., & Mucke, L. (2013). Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- $\beta$ . *Nature Neuroscience*, *16*(5), 613–621. <https://doi.org/10.1038/nn.3356>
- Tai, H. C., & Schuman, E. M. (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 9, Issue 11, pp. 826–838). <https://doi.org/10.1038/nrn2499>
- Tang, M., Li, S., & Chen, J. (2021). Ubiquitylation in DNA double-strand break repair. *DNA Repair*, *103*. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103129>
- Tapia, O., Narcís, J. O., Riancho, J., Tarabal, O., Piedrafita, L., Calderó, J., Berciano, M. T., & Lafarga, M. (2017). Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiology of Disease*, *108*, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.08.004>
- Thadathil, N., Delotterie, D. F., Xiao, J., Hori, R., McDonald, M. P., & Khan, M. M. (2021). DNA Double-Strand Break Accumulation in Alzheimer's Disease: Evidence from Experimental Models and Postmortem Human Brains. *Molecular Neurobiology*, *58*(1), 118–131. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02109-8>
- Tiano, L., Padella, L., Santoro, L., Carnevali, P., Principi, F., Brugè, F., Gabrielli, O., & Littarru, G. P. (2012a). Prolonged coenzyme Q10 treatment in Down syndrome patients, effect on DNA oxidation. *Neurobiology of Aging*, *33*(3), 626.e1-626.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.025>
- Tiano, L., Padella, L., Santoro, L., Carnevali, P., Principi, F., Brugè, F., Gabrielli, O., & Littarru, G. P. (2012b). Prolonged coenzyme Q10 treatment in Down syndrome patients, effect on DNA oxidation. *Neurobiology of Aging*, *33*(3), 626.e1-626.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.025>
- Tosh, J., Tybulewicz, V., & Fisher, E. M. C. (2022). Mouse models of aneuploidy to understand chromosome disorders. In *Mammalian Genome* (Vol. 33, Issue 1, pp. 157–168). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00335-021-09930-z>
- Tramutola, A., di Domenico, F., Barone, E., Arena, A., Giorgi, A., di Francesco, L., Schininà, M. E., Coccia, R., Head, E., Butterfield, D. A., & Perluigi, M. (2017). Polyubiquitylation profile in down syndrome brain before and after the development of Alzheimer neuropathology. *Antioxidants and Redox Signaling*, *26*(7), 280–298. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6686>

- Tramutola, A., Pupo, G., di Domenico, F., Barone, E., Arena, A., Lanzillotta, C., Broekaart, D., Blarmino, C., Head, E., Butterfield, D. A., & Perluigi, M. (2016). Activation of p53 in Down Syndrome and in the Ts65Dn Mouse Brain is Associated with a Pro-Apoptotic Phenotype. *Journal of Alzheimer's Disease*, *52*(1), 359–371. <https://doi.org/10.3233/JAD-151105>
- Trazzi, S., Mitrugno, V. M., Valli, E., Fuchs, C., Rizzi, S., Guidi, S., Perini, G., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2011). APP-dependent up-regulation of Ptch1 underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome. *Human Molecular Genetics*, *20*(8), 1560–1573. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr033>
- Trinkle-Mulcahy, L., & Sleeman, J. E. (2017). The Cajal Body and the Nucleolus: “In a Relationship” or “It’s Complicated”? *RNA Biol.*, *14*, 739–751. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236169>
- Tseng, B. P., Green, K. N., Chan, J. L., Blurton-Jones, M., & LaFerla, F. M. (2008). A $\beta$  inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiology of Aging*, *29*(11), 1607–1618. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014>
- Vacano, G. N., Duval, N., & Patterson, D. (2012). The use of mouse models for understanding the biology of down syndrome and aging. In *Current Gerontology and Geriatrics Research* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/717315>
- Valenti, D., Braidy, N., de Rasmio, D., Signorile, A., Rossi, L., Atanasov, A. G., Volpicella, M., Henrion-Caude, A., Nabavi, S. M., & Vacca, R. A. (2018). Mitochondria as pharmacological targets in Down syndrome. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 114, pp. 69–83). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.014>
- Valenti, D., de Bari, L., de Rasmio, D., Signorile, A., Henrion-Caude, A., Contestabile, A., & Vacca, R. A. (2016). The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1862*(6), 1093–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.03.003>
- Valenti, D., Manente, G. A., Moro, L., Marra, E., & Vacca, R. A. (2011). Deficit of complex I activity in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy and overproduction of reactive oxygen species by mitochondria: Involvement of the cAMP/PKA signalling pathway. *Biochemical Journal*, *435*(3), 679–688. <https://doi.org/10.1042/BJ20101908>
- Valenti, D., Stagni, F., Emili, M., Guidi, S., Bartesaghi, R., & Vacca, R. A. (2022). Impaired brain mitochondrial bioenergetics in the ts65dn mouse model of down syndrome is restored by neonatal treatment with the polyphenol 7,8-dihydroxyflavone. *Antioxidants*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/antiox11010062>

- Valenti, D., Tullo, A., Caratozzolo, M. F., Merafina, R. S., Scartezzini, P., Marra, E., & Vacca, R. A. (2010). Impairment of F1F0-ATPase, adenine nucleotide translocator and adenylate kinase causes mitochondrial energy deficit in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy. *Biochemical Journal*, *431*(2), 299–310. <https://doi.org/10.1042/BJ20100581>
- van Sluis, M., Gailín, M. Ó., Mccarter, J. G. W., Mangan, H., Grob, A., & Mcstay, B. (2019). *Human NORs, comprising rDNA arrays and functionally conserved distal elements, are located within dynamic chromosomal regions*. <https://doi.org/10.1101/gad.331892>
- Vicari, S., Bellucci, S., & Carlesimo, G. A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome. *Neuropsychologia*, *38*, 240–251. [https://doi.org/10.1016/s0028-3932\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/s0028-3932(99)00081-0)
- Vidal, V., García-Cerro, S., Rueda, N., Puente, A., Bartesaghi, R., & Martínez-Cué, C. (2020). Early postnatal oleic acid administration enhances synaptic development and cognitive abilities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Nutritional Neuroscience*. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1861897>
- Vihervaara, A., Duarte, F. M., & Lis, J. T. (2018). Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 19, Issue 6, pp. 385–397). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0001-6>
- Villarroya, O., Ballestín, R., López-Hidalgo, R., Mulet, M., Blasco-Ibáñez, J., Crespo, C., Nacher, J., Gilabert-Juan, J., & Varea, E. (2018). Morphological alterations in the hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down Syndrome correlate with structural plasticity markers. *Histol Histopathol.*, *33*(1), 101–115. <https://doi.org/10.14670/HH-11-894>
- Vink, J., Incerti, M., Toso, L., Roberson, R., Abebe, D., & Spong, C. Y. (2009). Prenatal NAP+SAL prevents developmental delay in a mouse model of Down syndrome through effects on N-methyl-D-aspartic acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *200*(5), 524.e1-524.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.01.052>
- Walser, F., Mulder, M. P. C., Bragantini, B., Burger, S., Gubser, T., Gatti, M., Botuyan, M. V., Villa, A., Altmeyer, M., Neri, D., Ovaa, H., Mer, G., & Penengo, L. (2020). Ubiquitin Phosphorylation at Thr12 Modulates the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, *80*(3), 423-436.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.017>
- Wang, Q., Sawyer, I. A., Sung, M. H., Sturgill, D., Shevtsov, S. P., Pegoraro, G., Hakim, O., Baek, S., Hager, G. L., & Dundr, M. (2016a). Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10966>
- Wang, Q., Sawyer, I. A., Sung, M. H., Sturgill, D., Shevtsov, S. P., Pegoraro, G., Hakim, O., Baek, S., Hager, G. L., & Dundr, M. (2016b). Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms10966>

- Wang, Y., Chang, J., Shao, L., Feng, W., Luo, Y., Chow, M., Du, W., Meng, A., & Zhou, D. (2016). Hematopoietic Stem Cells from Ts65Dn Mice Are Deficient in the Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Radiation Research*, 185(6), 630–637. <https://doi.org/10.1667/RR14407.1>
- Webster, M., Wikin, K. L., & Cohen-Fix, O. (2009). Sizing up the nucleus: Nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. In *Journal of Cell Science* (Vol. 122, Issue 10, pp. 1477–1486). <https://doi.org/10.1242/jcs.037333>
- Wehmer, M., & Sakata, E. (2016). Recent advances in the structural biology of the 26S proteasome. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 79, pp. 437–442). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.08.008>
- Whitney, K. N., & Wenger, G. R. (2013). Impulsivity and motor activity in aged, male Ts65Dn mice. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 21(5), 345–354. <https://doi.org/10.1037/a0033965>
- Whittle, N., Sartori, S. B., Dierssen, M., Lubec, G., & Singewald, N. (2007). Fetal Down syndrome brains exhibit aberrant levels of neurotransmitters critical for normal brain development. *Pediatrics*, 120(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3448>
- Wilcock, D. M., & Griffin, W. S. T. (2013). Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 10). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-84>
- Williams, A. D., Mjaatvedt, C. H., & Moore, C. S. (2008). Characterization of the cardiac phenotype in neonatal Ts65Dn mice. *Developmental Dynamics*, 237(2), 426–435. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21416>
- Wilson, D. N., & Cate, J. H. D. (2012). The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011536>
- Wiseman, F. K., Al-Janabi, T., Hardy, J., Karmiloff-Smith, A., Nizetic, D., Tybulewicz, V. L. J., Fisher, E. M. C., & Strydom, A. (2015). A genetic cause of Alzheimer disease: Mechanistic insights from Down syndrome. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 9, pp. 564–574). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3983>
- Xu, S. Y., Lu, F. M., Wang, M. Y., Hu, Z. S., Zhang, J., Chen, Z. Y., Armada-da-Silva, P. A. S., & Yuan, Z. (2020). Altered Functional Connectivity in the Motor and Prefrontal Cortex for Children With Down's Syndrome: An fNIRS Study. *Frontiers in Human Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.00006>

- Yamamoto, T., Shimojima, K., Nishizawa, T., Matsuo, M., Ito, M., & Imai, K. (2011). Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including DYRK1A and KCNJ6. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, *155*(1), 113–119. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33735>
- Yang, Y., Conners, F. A., & Merrill, E. C. (2014). Visuo-spatial ability in individuals with Down syndrome: Is it really a strength? In *Research in Developmental Disabilities* (Vol. 35, Issue 7, pp. 1473–1500). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2014.04.002>
- Yasuda, S., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Guo, Q., Ikeuchi, K., Endo, A., Arai, N., Ohtake, F., Murata, S., Inada, T., Baumeister, W., Fernández-Busnadiego, R., Tanaka, K., & Saeki, Y. (2020). Stress- and ubiquitylation-dependent phase separation of the proteasome. *Nature*, *578*(7794), 296–300. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1982-9>
- Yazdani, M., Deogracias, R., Guy, J., Poot, R. A., Bird, A., & Barde, Y. A. (2012a). Disease modeling using embryonic stem cells: MeCP2 regulates nuclear size and RNA synthesis in neurons. *Stem Cells*, *30*(10), 2128–2139. <https://doi.org/10.1002/stem.1180>
- Yazdani, M., Deogracias, R., Guy, J., Poot, R. A., Bird, A., & Barde, Y. A. (2012b). Disease modeling using embryonic stem cells: MeCP2 regulates nuclear size and RNA synthesis in neurons. *Stem Cells*, *30*(10), 2128–2139. <https://doi.org/10.1002/stem.1180>
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.*, *12*(2), 1542–1552. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401765>
- Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2015). Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1853, Issue 10, pp. 2797–2801). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.013>
- Zamponi, E., & Helguera, P. R. (2019). The shape of mitochondrial dysfunction in Down syndrome. *Dev. Neurobiol.*, *57*, 613–621. <https://doi.org/10.1002/dneu.22673>
- Zamponi, E., Zamponi, N., Coskun, P., Quassollo, G., Lorenzo, A., Cannas, S. A., Pigino, G., Chialvo, D. R., Gardiner, K., Busciglio, J., & Helguera, P. (2018). Nrf2 stabilization prevents critical oxidative damage in Down syndrome cells. *Aging Cell*, *17*(5). <https://doi.org/10.1111/accel.12812>
- Zana, M., Janka, Z., & Kálmán, J. (2007). Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. In *Neurobiology of Aging* (Vol. 28, Issue 5, pp. 648–676). <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.03.008>
- Zatsepina, O. v. (2019). Cytogenetic instability of chromosomal nucleolar organizer regions (NORs) in cloned mouse L929 fibroblasts. *Chromosome Research*, *27*(1–2), 95–108. <https://doi.org/10.1007/s10577-018-9598-8>

- Zbinden, A., Pérez-Berlanga, M., de Rossi, P., & Polymenidou, M. (2020). Phase Separation and Neurodegenerative Diseases: A Disturbance in the Force. In *Developmental Cell* (Vol. 55, Issue 1, pp. 45–68). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.014>
- Zhang, T., Cooper, S., & Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Reports*, 16(11), 1467–1481. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>
- Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., Fang, Y., & Fang, D. (2021). Overview of Histone Modification. In *Adv. Exp. Med. Biol* (Vol. 1283). [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1)
- Zhou, K., Gaullier, G., & Luger, K. (2019). Nucleosome structure and dynamics are coming of age. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 26, Issue 1, pp. 3–13). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0166-x>
- Zhou, L., Chen, X., Liu, T., Gong, Y., Chen, S., Pan, G., Cui, W., Luo, Z. P., Pei, M., Yang, H., & He, F. (2015). Melatonin reverses H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence in mesenchymal stem cells via the SIRT1-dependent pathway. *Journal of Pineal Research*, 59(2), 190–205. <https://doi.org/10.1111/jpi.12250>
- Zmijewski, J. W., Banerjee, S., & Abraham, E. (2009). S-glutathionylation of the Rpn2 regulatory subunit inhibits 26 S proteasomal function. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 22213–22221. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.028902>

## **9. Artículos**

---



Del presente Trabajo de Tesis Doctoral derivan dos publicaciones:

Puente-Bedia, A., Berciano, M. T., Tapia, O., Martínez-Cué, C., Lafarga, M., & Rueda, N. (2021). Nuclear reorganization in hippocampal granule cell neurons from a mouse model of down syndrome: Changes in chromatin configuration, nucleoli and cajal bodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22031259>

Puente-Bedia, A., Berciano, M.T., Martínez-Cue, C., Lafarga, M. & Rueda, N. Oxidative-stress-associated proteostasis disturbances and increased DNA damage in the hippocampal granule cells of the Ts65Dn model of Down syndrome. En revisión en *Antioxidants*.

Además, la colaboración en otros Proyectos de Investigación ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Berciano, M. T., Puente-Bedia, A., Medina-Samamé, A., Rodríguez-Rey, J. C., Calderó, J., Lafarga, M., & Tapia, O. (2020). Nusinersen ameliorates motor function and prevents motoneuron Cajal body disassembly and abnormal poly(A) RNA distribution in a SMA mouse model. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67569-3>

Diban, N., Mantecón-Oria, M., Berciano, M. T., Puente-Bedia, A., Rivero, M. J., Urtiaga, A., Lafarga, M., & Tapia, O. (2022). Non-homogeneous dispersion of graphene in polyacrylonitrile substrates induces a migrastatic response and epithelial-like differentiation in MCF7 breast cancer cells. *Cancer Nanotechnology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12645-021-00107-6>

García-Cerro, S., Rueda, N., Vidal, V., Puente, A., Campa, V., Lantigua, S., Narcís, O., Velasco, A., Bartesaghi, R., & Martínez-Cué, C. (2020). Prenatal Administration of Oleic Acid or Linolenic Acid Reduces Neuromorphological and Cognitive Alterations in Ts65dn Down Syndrome Mice. *Journal of Nutrition*, 150(6), 1631–1643. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa074>

Rueda, N., Vidal, V., García-Cerro, S., Puente, A., Campa, V., Lantigua, S., Narcís, O., Bartesaghi, R., & Martínez-Cué, C. (2020). Prenatal, but not postnatal, curcumin administration rescues neuromorphological and cognitive alterations in Ts65Dn down syndrome mice. *Journal of Nutrition*, 150(9), 2478–2489. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa207>

Vidal, V., García-Cerro, S., Rueda, N., Puente, A., Bartesaghi, R., & Martínez-Cué, C. (2020). Early postnatal oleic acid administration enhances synaptic development and cognitive abilities in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Nutritional Neuroscience*. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2020.1861897>

Vidal, V., Puente, A., García-Cerro, S., García Unzueta, M. T., Rueda, N., Riancho, J., & Martínez-Cué, C. (2021). Bexarotene Impairs Cognition and Produces Hypothyroidism in a Mouse Model of Down Syndrome and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.613211>



Article

# Nuclear Reorganization in Hippocampal Granule Cell Neurons from a Mouse Model of Down Syndrome: Changes in Chromatin Configuration, Nucleoli and Cajal Bodies

Alba Puente-Bedia <sup>1</sup>, María T. Berciano <sup>2</sup>, Olga Tapia <sup>3</sup> , Carmen Martínez-Cué <sup>1</sup> , Miguel Lafarga <sup>4,\*</sup>,  
and Noemí Rueda <sup>1,\*</sup>,<sup>†</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Cantabria, 39011 Santander, Spain; alba.puente@unican.es (A.P.-B.); martinec@unican.es (C.M.-C.)

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology, “Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)” and University of Cantabria-IDIVAL, 39011 Santander, Spain; maria.berciano@unican.es

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), “Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)” and Universidad Europea del Atlántico, 39011 Santander, Spain; otapia@idival.org

<sup>4</sup> Department of Anatomy and Cell Biology, “Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)” and University of Cantabria-IDIVAL, 39011 Santander, Spain

\* Correspondence: miguel.lafarga@unican.es (M.L.); ruedan@unican.es (N.R.); Tel.: +34-942201966 (N.R.); Fax: +34-942201903 (N.R.)

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Puente-Bedia, A.; Berciano, M.T.; Tapia, O.; Martínez-Cué, C.; Lafarga, M.; Rueda, N. Nuclear Reorganization in Hippocampal Granule Cell Neurons from a Mouse Model of Down Syndrome: Changes in Chromatin Configuration, Nucleoli and Cajal Bodies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1259. <https://doi.org/10.3390/ijms22031259>

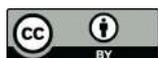
Academic Editor: Laszlo Bodai

Received: 22 November 2020

Accepted: 22 January 2021

Published: 27 January 2021

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Down syndrome (DS) or trisomy of chromosome 21 (Hsa21) is characterized by impaired hippocampal-dependent learning and memory. These alterations are due to defective neurogenesis and to neuromorphological and functional anomalies of numerous neuronal populations, including hippocampal granular cells (GCs). It has been proposed that the additional gene dose in trisomic cells induces modifications in nuclear compartments and on the chromatin landscape, which could contribute to some DS phenotypes. The Ts65Dn (TS) mouse model of DS carries a triplication of 92 genes orthologous to those found in Hsa21, and shares many phenotypes with DS individuals, including cognitive and neuromorphological alterations. Considering its essential role in hippocampal memory formation, we investigated whether the triplication of this set of Hsa21 orthologous genes in TS mice modifies the nuclear architecture of their GCs. Our results show that the TS mouse presents alterations in the nuclear architecture of its GCs, affecting nuclear compartments involved in transcription and pre-rRNA and pre-mRNA processing. In particular, the GCs of the TS mouse show alterations in the nucleolar fusion pattern and the molecular assembly of Cajal bodies (CBs). Furthermore, hippocampal GCs of TS mice present an epigenetic dysregulation of chromatin that results in an increased heterochromatinization and reduced global transcriptional activity. These nuclear alterations could play an important role in the neuromorphological and/or functional alterations of the hippocampal GCs implicated in the cognitive dysfunction characteristic of TS mice.

**Keywords:** Ts65Dn; hippocampus; Down syndrome; nucleolus; Cajal body; chromatin; NORs

## 1. Introduction

Down syndrome (DS), the most frequent genetic cause of cognitive dysfunction [1] is caused by a partial or complete triplication of the human chromosome 21 (Hsa21). To study the mechanisms implicated in the neurobiological and cognitive alterations found in DS and to develop therapeutic approaches to reduce or prevent these impairments, several mouse models of DS, trisomic for different sets of Hsa21 orthologous genes, have been generated [2–5]. Among them, the Ts65Dn mouse (TS) harbors a translocation of a segment of Mmu16 that contains 92 genes orthologous to those found in the Hsa21 [2,6]. It also exhibits numerous neuroanatomical, neurochemical, and behavioral DS phenotypes similar to those found in individuals with DS [3–5].

In DS and in the TS mouse, hippocampal-dependent learning and memory is particularly affected due to anatomical and functional alterations of this structure [3,7]. Reduced hippocampal volume is associated with a smaller density of hippocampal granular cells (GCs) [8–10]. This hypocellularity is mainly caused by alterations in pre- and post-natal neurogenesis [7,8,10]. In addition to hypocellularity, abnormal dendritic tree arborization, spine density and morphology, and synaptic density and connectivity have also been found in the granular cell layer (GCL), further altering proper hippocampal function [11–14].

The cell nucleus is organized into structural and functional compartments involved in transcription, DNA replication and repair, and RNA processing. They include chromosome territories, the distinct nuclear sub-volumes occupied by each interphase chromosome, and the interchromatin region, which contains several nuclear structures with roles in gene expression and RNA processing, such as the nucleolus, Cajal bodies, and nuclear speckles of splicing factors [15–18].

Chromosome territories are nonrandomly arranged within the interphase nucleus, and a precise 3D organization of the genome is required for establishing cell-specific gene expression programs [16,19]. Underscoring the closely intertwined relationship between genome topology and gene regulation, alterations of the nuclear architecture that perturb intrachromosomal and interchromosomal interactions can disturb gene expression and lead to diseases [19]. Chromosome territories include domains of transcriptionally silenced heterochromatin, which harbor specific proteins and histone repressive marks (H3K9me, H4K27me3; H4K20me3), as well as transcriptionally active euchromatin enriched in acetylated nucleosomal histone marks and components of the transcription machinery.

The nucleolus is an archetype of nuclear compartment that is assembled around rDNA sequences called nucleolar organizer regions (NORs), where repeated rRNA genes are arranged in tandem [20–22]. Each ribosomal gene transcription unit encodes for three categories of mature rRNAs, 28S, 18S and 5.8S, produced from a single 47S rRNA precursor which is transcribed by RNA polymerase I activity (RNA pol I). The nucleolus is the site of ribosome biogenesis, where pre-rRNA synthesis, pre-rRNA processing, and the assembly of pre-ribosomal particles takes place [15,21,23,24].

Because of the essential role of the nucleolus in sustaining the protein synthesis machinery in developing and mature neurons, alterations in its structure and/or function can disrupt neurodevelopment, and may also be involved in the pathophysiology of several neurodegenerative disorders, including cerebellar ataxias, Alzheimer Disease (AD), Parkinson's disease, and spinal muscular atrophy (SMA) [25–29].

Cajal bodies (CBs) are dynamic nuclear structures of the interchromatinic region, discovered in mammalian neurons by Cajal [18,30–33]. They concentrate coilin, a structural protein and molecular marker of CBs, the survival of motor neuron (SMN) protein, spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs), small nucleolar RNAs (snoRNAs) and CB-specific snRNAs (scaRNAs). Moreover, like the nucleolus, CBs contain fibrillarin, a protein involved in pre-rRNA processing [18,30,32]. Current conceptions of CBs assembly support the view that they form on active histone and U snRNAs or snoRNA gene loci, and that this CB-dependent gene positioning contributes to genome organization [33,34]. CBs are transcription-dependent nuclear compartments essentially involved in the biogenesis of spliceosomal snRNPs which are required for pre-mRNA processing in the spliceosome [32,35,36]. In mammalian neurons, the CB number positively correlates with neuronal mass and transcriptional activity [37,38]. Depletion of CBs, in neurodegenerative diseases such as SMA, perturbs pre-mRNA splicing, and contributes to the pathophysiology of the disease [29,39].

Recent advances in genomics and epigenomics reveal that the 3D spatial organization of the genome contributes to the regulation of gene expression through complex long-range intrachromosomal and interchromosomal interactions, which are often mediated by the formation of chromatin loops. In particular, newborn maturing postmitotic mammalian neurons that exit from cell cycle must acquire, in the early G1/G0 phase, the stable 3D genome organization characteristic of each neuronal type. This includes chromosome

movements to achieve the spatial rearrangement of chromosome territories, the spatial tethering of NORs sequences of rDNA resulting in nucleolar fusion, and the acquisition of the epigenetic pattern of chromatin configuration with the specific heterochromatin (transcriptionally repressed) and euchromatin (transcriptionally active or poised for activation) pattern domains [21,40,41].

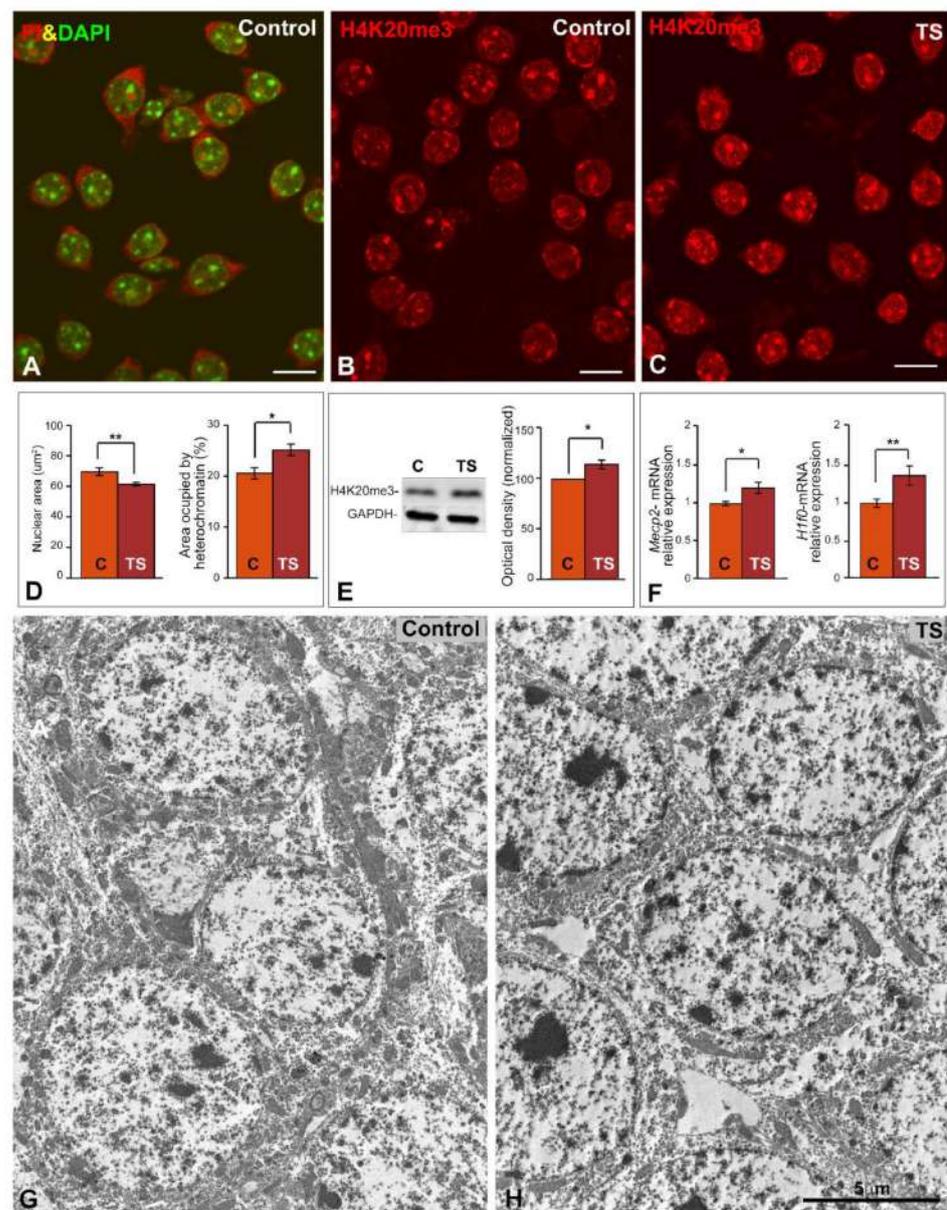
In this context, it has been demonstrated that the extra Hsa21 causes a displacement and higher compaction of other chromosome territories in trisomic cells [42]. In addition, the supernumerary Hsa21 or Mmu16 fragment also creates gene expression dysregulation domains and modifies the histone mark profiles in DS and TS cells [43]. Significantly, in the TS mouse, analysis of the gene expression in different organs including the brain has revealed that while some of the triplicated genes are overexpressed others are down-regulated or kept below normal levels of expression [44,45], suggesting the presence of additional tissue-specific regulatory mechanisms [44]. Finally, in addition to the altered expression of trisomic genes, the excessive gene dosage in DS also dysregulates the global transcription of other disomic genes [43,46–49]. Thus, the genomic dose imbalance causes a complex regulation of gene expression and epigenetic alterations, such as DNA and histone modifications, which have been implicated in several DS phenotypes such as memory impairment, premature aging, and neurodevelopmental defects [5,50].

Because of its essential role in hippocampal learning and memory, alterations in the 3D reorganization of the genome and/or in the nuclear structure and function of hippocampal GCs could contribute to the neuromorphological or functional alterations observed in this neuronal population. In particular, these alterations may be implicated in the cognitive dysfunction that the TS mouse presents. The aim of this study is to analyze the effect that the 3D reorganization of the genome induced by the partial trisomy of Mmu16 in the GCs of the TS mouse has on the nuclear size and organization of the nuclear compartments involved in transcription and mRNA and rRNA processing. We will primarily focus on (I) the epigenetic changes in chromatin structure and its potential influence on global transcriptional activity, (II) the reorganization of NORs, and its effect on the fusion pattern of nucleoli, and (III) the behavior of CBs.

## 2. Results

### 2.1. Reduced Nuclear Size and Increased Heterochromatinization Are Nuclear Features in TS GCs

The impact of alterations in the 3D-organization of chromosomes and their associated changes in the epigenetic programs in GCs was studied in TS mice. First, we analyzed variations in the nuclear size and the heterochromatin compartment. Dissociated neuronal preparations of the dentate gyrus GCL from wild-type (hereafter referred to as control) mice co-stained with DAPI and propidium iodide, two cytochemical markers for DNA and RNA, respectively, revealed the well-preserved morphology of whole GC perikarya. Thus, the cell nucleus showed several prominent masses of condensed heterochromatin and appeared to be surrounded by a narrow RNA-rich cytoplasmic band stained with propidium iodide (Figure 1A).



**Figure 1.** GCs of TS mice show reduced nuclear size and increased heterochromatinization. (A) Representative example of dissociated dentate gyrus GCs from a control mouse co-stained with DAPI (DNA staining) and propidium iodide (PI, RNA staining). Note the well-preserved neuronal perikarya, illustrating the concentration of RNA in the cytoplasm and nucleoli, and the prominent heterochromatin clumps counterstained with DAPI. (B,C) Histone H4K20me3 immunolabeling of dissociated GCs from control (B) and TS mice (C). Note the higher nuclear fluorescent signal of this trimethylated histone in TS GCs. Scale bars: 5 µm. (D) Morphometric analysis of the nuclear size and the nuclear surface area occupied by histone H4K20me3-positive clumps in control and TS GCs. Partial trisomy in TS mice associates with a reduction of nuclear size and a parallel increase of repressive heterochromatin domains. (E) Up-regulation of histone H4K20me3 expression in the hippocampi of TS mice relative to control animals as shown by Western blotting. GAPDH was used as loading control. (F) RT-qPCR determination of *Mecp2* and *H1f0* gene expression in hippocampal RNA extracts from control and TS mice. Both genes are up-regulated in the TS mice. (D–F): Data is presented as means + SEM of three independent experiments. (G,H) Electron micrographs of GCs from control (G) and TS (H) mice. Note the prominent heterochromatin clumps in TS GCs. Scale bar: 5 µm. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ . C = control mice; TS = Ts65Dn mice.

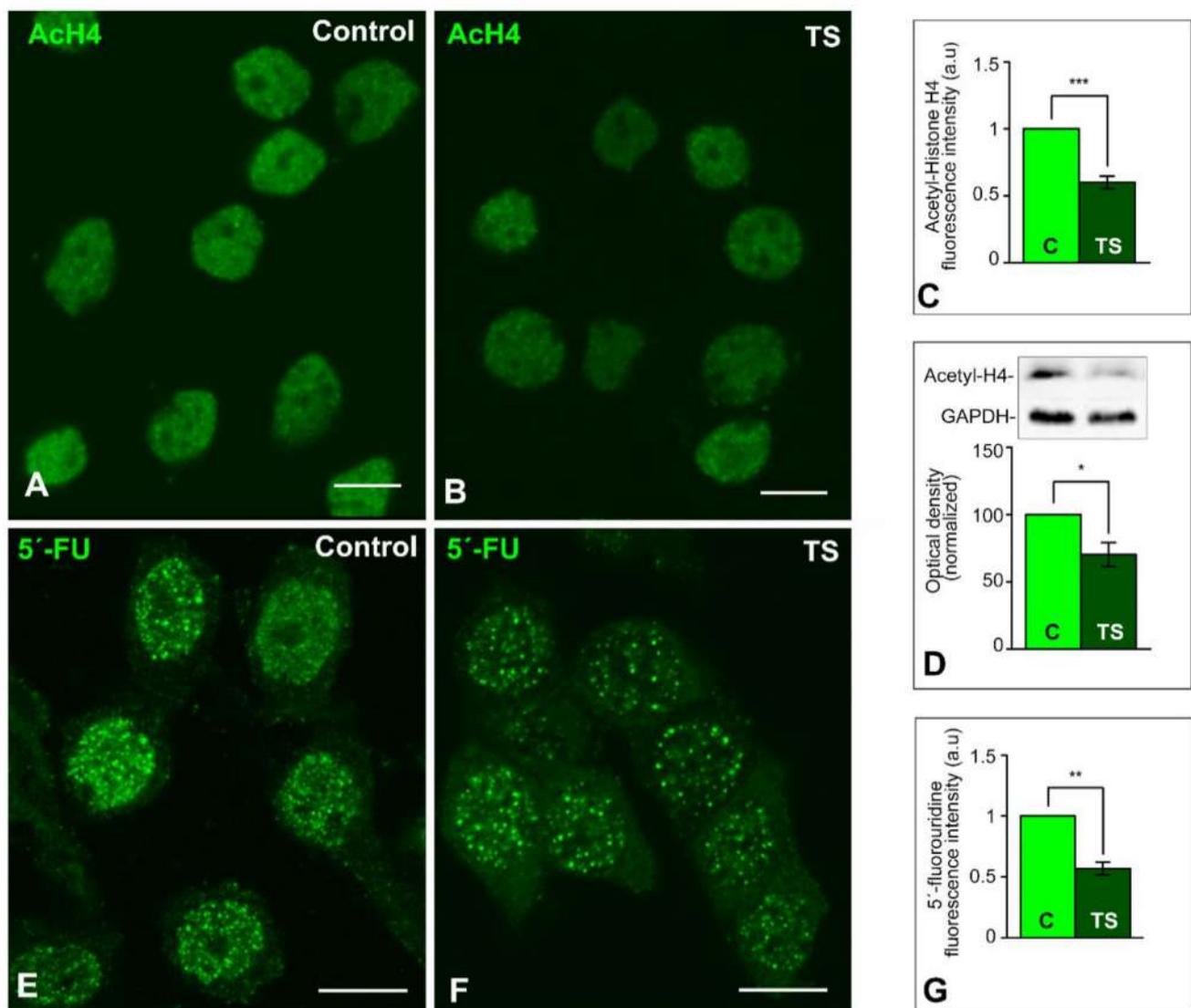
Next, we performed immunolabeling for the repressive histone modification H4K20me3, a heterochromatin marker, which is involved in gene silencing and also contributes to the cellular senescence program [51–53]. As is illustrated in Figure 1B,C, the GCs of TS mice exhibited a clear increase of the heterochromatin regions immunolabeled for the histone H4K20me3 relative to control neurons. Morphometric measurements of the nuclear surface area of control and TS GCs on histone H4K20me3 immunostained preparations revealed a significant reduction of nuclear size, a parameter related to the heterochromatinization level and transcriptional activity [54,55], in TS mice when compared with control animals (Figure 1D). Consistent with the reduction of the nuclear size, morphometric estimation with Image-J software (NIH, USA) of the total nuclear area occupied by H4K20me3-positive chromatin regions confirmed a significant increase of heterochromatin in the GCs from TS mice as compared with control mice (Figure 1D). The upregulation of the amount of histone H4K20me3 in hippocampal tissue lysates from TS mice relative to control animals was validated by Western blotting (Figure 1E).

Moreover, the expression levels of two genes, *Mecp2* and *H1f0*, encoding methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), which has a great affinity for methylated DNA, and the H1.0 linker histone, respectively, were significantly increased in the hippocampal RNA extracts from TS mice relative to control animals (Figure 1F). Interestingly, both abundant nuclear proteins are important for the maintenance of higher-order chromatin structure, particularly of heterochromatin domains [56,57]. In this line, electron microscopy analysis of the GCL confirmed the higher abundance of heterochromatin clumps in the tightly packed GC nuclei from TS mice (Figure 1G,H).

## 2.2. Chromatin Reorganization in TS GCs Induces a Decrease in Global Transcription Rate

After establishing that the reorganization of the genome architecture in TS GCs is accompanied by increased heterochromatinization, we investigated the impact of these chromatin changes on global transcriptional activity. We analyzed the lysine acetylation pattern in the nucleosomal histone H4 as a marker of “open” transcriptionally active chromatin [58]. The immunostaining for the acetylated histone H4 showed a higher intensity of fluorescent signal in control GC nuclei than in TS ones (Figure 2A,B). Densitometric analysis of signal intensities with ImageJ software (NIH, USA) confirmed the reduction of this acetylated histone H4 in TS GC nuclei relative to control nuclei (Figure 2C). Moreover, the significant reduction of acetylated histone H4 levels in TS mice was validated by Western blotting of hippocampal lysates (Figure 2D).

To determine the global transcriptional activity, we performed an in situ transcription assay based on the incorporation of 5'-FU into nascent RNA 45 min after the intraperitoneal injection of this halogenated nucleotide precursor. The incorporation pattern of 5'-FU showed the typical nuclear punctate pattern, corresponding to transcription factories [59,60], in addition to a diffuse nucleoplasmic signal (Figure 2E,F). Densitometric analysis of 5'-FU fluorescent signal in confocal images of the total nuclear surface area revealed a significant increase in control GC nuclei as compared with TS GC nuclei (Figure 2G), supporting a reduced transcription rate in TS GCs.



**Figure 2.** Global transcription rate is reduced in the GCs of TS mice. (A,B) Nuclear immunostaining of the acetylated histone H4 in dissociated GCs from control (A), and TS (B) mice. This acetylated histone appears diffusely distributed throughout the nucleus, excluding the nucleolus, with a higher intensity of fluorescent signal in control GCs. Scale bars: 5  $\mu$ m. (C) Densitometric analysis reveals a significant increase of acetylated histone H4 signal intensity in control GC nuclei as compared with TS ones. (D) Down-regulation of acetylated histone H4 expression in the hippocampi of TS mice relative to control animals as shown by Western blotting. GAPDH was used as loading control. (E,F) In situ transcription assay with 5'-fluorouridine illustrates the nuclear incorporation of this halogenated precursor into nascent RNA from control (E), and TS (F) GCs. Note the higher abundance of microfoci of high fluorescent signal intensity of RNA (transcription factories) in control GC nuclei. Scale bars: 5  $\mu$ m. (G) Densitometric analysis reveals a significant increase of 5'-fluorouridine incorporation signal intensity in control GC nuclei as compared with TS ones. C, D, G: Data is presented as means + SEM of three independent experiments. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ . Ach4 = acetylated histone H4; C = control mice; 5'-FU = 5'-fluorouridine; TS = Ts65Dn mice.

Next, we investigated whether the reduction of transcription was accompanied by a reorganization of the translation machinery in the GC cytoplasm from TS mice. As an initial cytochemical approach, we observed an apparent decrease in the cytoplasmic RNA signal with the propidium iodide staining for nucleic acids, suggesting a reduced cytoplasmic availability of mRNAs for translation (Supplementary Figure S1).

### 2.3. The Reorganization of Chromosomes in TS GCs Is Associated with Reduced Nucleolar Fusion, Resulting in a Higher Number of Nucleoli

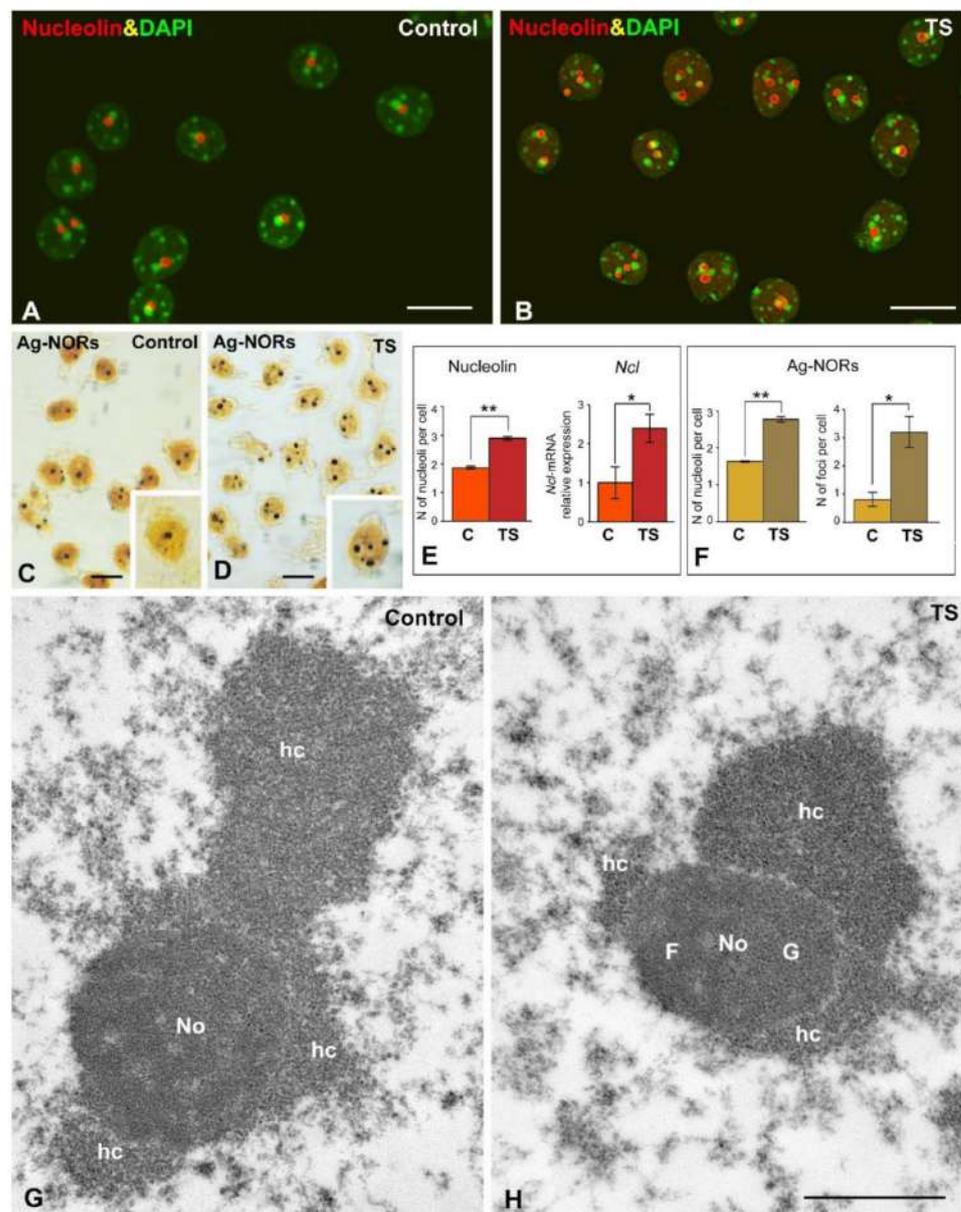
Since the DS trisomy involves positional changes in the 3D-organization of the genome, presumably affecting the NOR-containing chromosomes, we investigated the impact of this genome rearrangement on the behavior of nucleoli in TS GCs. It is well known that post-mitotic mammalian neurons start with several small nucleoli which fuse together and generally form only one or two larger ones [37,40]. In the case of post-mitotic mouse GCs, they are diploid with six NOR-bearing chromosomes [21]. When GC precursors leave the last telophase and enter a quiescent G0 state, they may initially form multiple nucleoli, one for each NOR, before starting nucleolar fusion events during GC differentiation.

The mean number of nucleoli per nucleus in mature GCs was estimated in dissociated GCs immunostained for nucleolin, an abundant nucleolar protein that interacts with rDNA and pre-rRNA and is involved in the spatial organization of rDNA arrays [24,26,61]. Nucleolin immunostaining revealed small and round-shaped nucleoli in both control and TS GCs, which are commonly associated with large masses of perinucleolar heterochromatin, intensely counterstained with DAPI (Figure 3A,B). Importantly, the number of nucleoli was significantly higher in TS GCs than in control ones (Figure 3A,B,E). According with the essential role of nucleolin in nucleolar assembly [61,62], this increase in the average number of nucleoli per GC was accompanied by a moderate increase in the expression level of *Ncl* gene in RNA extracts of the hippocampi from TS mice (Figure 3E). However, non-significant changes in the expression of nucleolin protein were observed in TS mice hippocampi as compared with control samples (Supplementary Figure S2). Ag-NOR protein staining for rDNA sites [22] confirmed the increase in the number of nucleoli in GCs from TS mice (Figure 3C,D,F). Moreover, this Ag-staining procedure distinguished two types of nuclear bodies: typical sharply defined nucleoli, where active NORs are concentrated [22], and between one and three smaller foci, which corresponded to extranucleolar rDNA sites (Figure 3C,D). The number of the Ag-stained foci increased significantly in TS GCs as compared with control neurons (Figure 3F). The augmentation in the number of both nucleoli and Ag-stained foci supports the hypothesis that the nucleolar fusion pattern is altered in TS GCs.

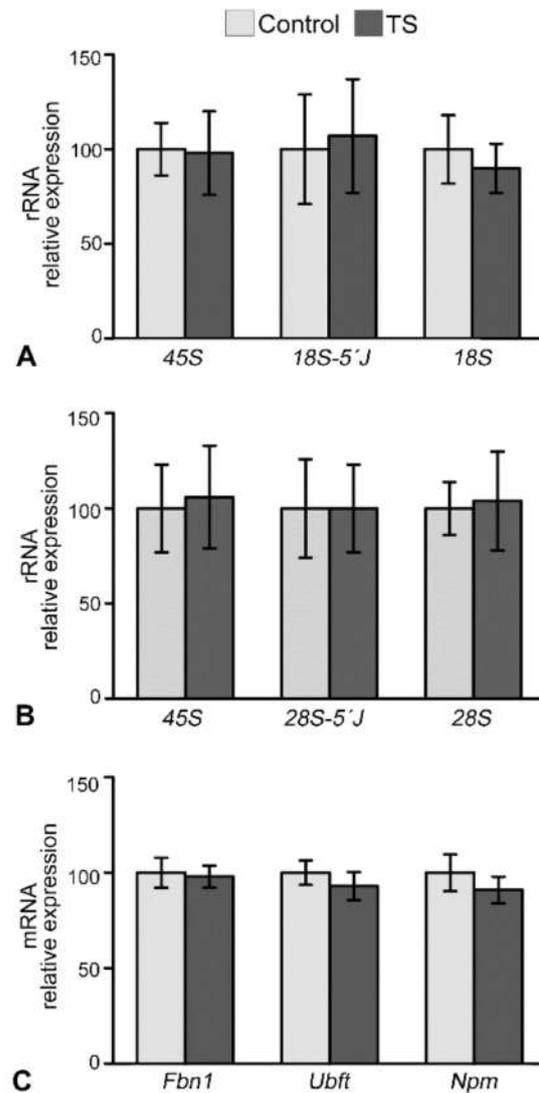
Ultrastructural analysis of nucleoli from both control and TS GCs showed a small size, rounded morphology, and a compact configuration with a predominant granular component (Figure 3G,H). Nucleolus associated domains (NAD) enriched in repressive heterochromatin were prominent in both TS and control GCs (Figure 3G,H).

### 2.4. The Nuclear Reorganization in GCs of the TS Mouse Results in Reduced CB Number and Coilin Redistribution

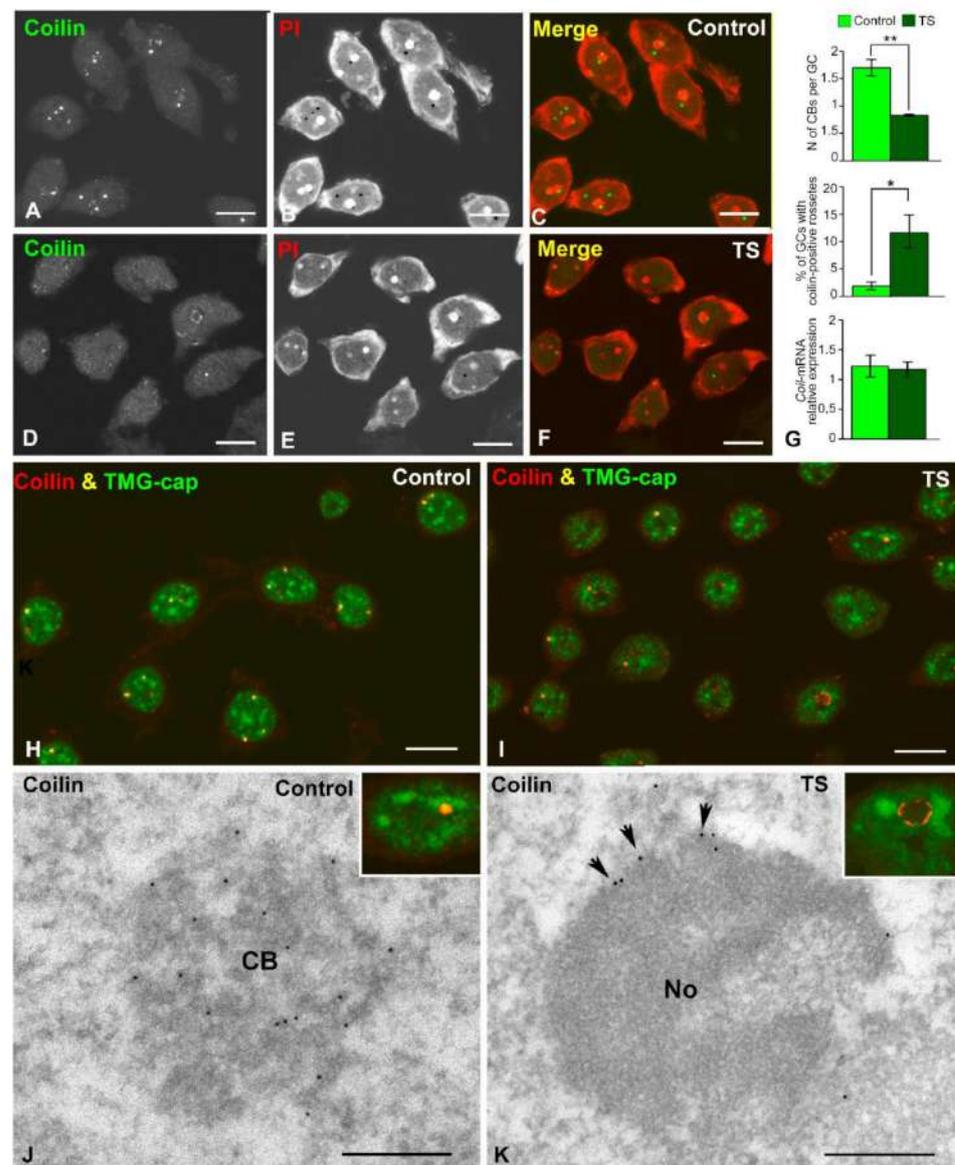
Given that CBs are transcription-dependent nuclear compartments involved in essential nuclear functions, particularly in pre-mRNA and pre-rRNA processing [18,31–33,35], we investigated the behavior of these nuclear bodies in GCs of the TS mouse. First, in dissociated GCs from control and TS mice, we estimated the CB number in preparations immunostained for coilin, a CB marker, counterstained with propidium iodide (Figure 5A–F). A significant decrease in the mean number of CBs per GC was detected in TS mice when compared with control animals (Figure 5G). Moreover, a fraction of GCs from the TS mice, approximately 12%, showed perinucleolar caps or “rossettes” of coilin [29] instead of typical spherical CBs, whereas this relocation of coilin was only found in about 2% of control GCs (Figure 5G). No significant differences in the expression level of coilin mRNA were detected by RT-qPCR between control and TS mice in RNA extracts from the hippocampi (Figure 5G), suggesting a redistribution of coilin protein in trisomic mice rather than a downregulation of *Coil* gene expression.



**Figure 3.** Trisomy causes an increase of nucleoli and Ag-NORs number in the GCs of TS mice. (A,B) Nucleolin immunolabeling counterstained with DAPI of dissociated GCs from control (A), and TS (B) mice. Note the apparent increase in the number of nucleoli in TS GCs. (C,D) Dissociated GCs from control (C), and TS (D) mice stained with the silver nitrate procedure for Ag-NOR proteins. Whereas large silver-impregnated spots correspond to Ag-NOR-containing nucleoli, the smaller foci (insets) belong to extranucleolar Ag-NORs. Scale bars: A-D: 5  $\mu$ m. (E) The quantitative analysis of the mean number of nucleolin-positive nucleoli per GC shows an increase in TS GCs relative to control ones. This significant rise in the number of nucleoli correlates with a parallel increase in the expression levels of *Ncl* mRNA. (F) The quantitative analysis of the distribution of Ag-NORs in nucleoli and extranucleolar tiny foci reveals an increase in both the number of nucleoli and extranucleolar Ag-NOR foci in TS GCs. E and F: Data is presented as means + SEM of three independent experiments. (G,H) Electron micrographs of nucleoli (No) from control (G), and TS (H) GCs surrounded by prominent masses of perinucleolar heterochromatin (hc). Both nucleoli exhibit a predominance of the granular component (G). F: fibrillar component. Scale bar: 1  $\mu$ m. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ . Ag-NORs = argyrophilic nucleolar organizer regions; C = control mice; G = granular component; F = dense fibrillar component; hc = heterochromatin; No = nucleolus; TS = Ts65Dn mice.



**Figure 4.** Ribosomal and nucleolar proteins genes expression is preserved in the GCs of TS mice. (A,B) RT-qPCR of the expression levels of pre-rRNA 45S, 18S 5' and 28S 5' junction precursors and mature 18S and 28S rRNAs in hippocampal RNA extracts from control and TS mice. Non-significant changes in all studied categories of rRNAs were detected in TS mice as compared to wild-type. (C) Expression levels of *Ubtf*, *Npm1*, and *Fbn1* mRNAs encoding three key nucleolar proteins, UBF, nucleophosmin, and fibrillarin. Non-significant differences between control and TS samples were observed in the three mRNAs analyzed. Data is presented as means + SEM of three independent experiments.



**Figure 5.** The GCs of TS mice present reduced CB number and coilin redistribution. (A–F) Co-staining for coilin, for demonstration of CBs, and PI, for the RNA-rich structures, in dissociated GCs from control (A–C), and TS (D–F) mice. Note the apparent reduction of CBs in TS GCs relative to control ones. Scale bars: 5  $\mu$ m. (G) Quantitative analysis of the mean number of CBs per GC and the proportion of GCs containing coilin-positive perinuclear caps (“rosettes”). TS GCs exhibit a significant reduction of CBs and a significant parallel increase of perinuclear “rosettes”. This nuclear reorganization of coilin in TS GCs was not associated with significant changes in the expression level of the *Coil* gene. Data is presented as means + SEM of three independent experiments. (H,I) Double immunolabeling for coilin and TMG-cap (a marker of spliceosomal U snRNAs) reveals the typical colocalization of coilin and splicing factors in CBs and the absence of any detectable TMG-cap signal in the coilin-positive perinucleolar caps. Scale bars: 5  $\mu$ m. (J,K) Immunogold electron microscopy for the detection of coilin in typical CBs (J, scale bar: 250 nm) and a perinucleolar cap (arrow heads in panel K, scale bar: 500 nm). Insets illustrate the confocal microscopy counterpart of a double immunofluorescence for coilin and TMG-cap in GC nuclei. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ . C = control mice; CB = Cajal body; No = nucleolus; PI = propidium iodide; TS = Ts65Dn mice.

Next, to determine the presence of spliceosomal snRNPs in CBs we performed double immunolabeling for TMG-cap, which recognizes the 5' cap of spliceosomal snRNAs, and coilin. Whereas both molecular constituents colocalized in typical CBs from both control and

TS mice, indicating that they are canonical CBs, the fluorescent signal of TMG-cap was very weak or absent in perinucleolar rosettes (Figure 5H–K insets). Finally, the localization of coilin in CBs and perinucleolar rosettes was confirmed by immunogold electron microscopy which illustrated the distribution of coilin in the coiled threads of typical CBs from control mice (Figure 5J), and in perinucleolar caps from TS mice (Figure 5K).

### 3. Discussion

Our results indicate that the partial trisomy of a segment of Mmu16 in TS mice induces important changes in the nuclear architecture of GCs, particularly in the nuclear compartments involved in transcription and pre-rRNA and pre-mRNA processing. This nuclear reorganization of GCs influences: (I) the epigenetic regulation of chromatin structure and function, with increased heterochromatin and a global reduction of transcription, (II) the nucleolar fusion pattern, with increased number of nucleoli, and (III) the molecular assembly of the CBs involved in pre-mRNA splicing.

Notwithstanding the influence of the dosage imbalance of gene expression in this mouse model of DS [64], we propose that the triplication of a large segment of Mmu16 into the genome of GCs affects *per se* their 3D genome organization. This could result in physical alterations in both gene positioning and the intrachromosomal and interchromosomal interactions mediated by chromatin loops. Given the closely intertwined relationship between genome topology and gene regulation, changes in the gene positioning and chromatin interactions in DS trisomy could lead to altered gene expression, resulting in a global downregulation of transcription observed here in the TS GCs. This effect may contribute to the neuromorphological and functional alterations found in the hippocampal GCs [8,12–14]. The alterations in the nuclear architecture of TS GCs should occur during maturation, when postmitotic neurons undergo a spatial reorganization of chromosomes in order to achieve the specific 3D nuclear architecture of differentiated mature neurons [41]. Thus, the establishment and maintenance of neuron-specific gene expression programs in hippocampal GCs allow for their specialized functions, such as the processing of information and the formation of memories.

The hippocampal GCs of the dentate gyrus have a small nucleus with prominent heterochromatin masses of transcriptionally repressed heterochromatin and compact small nucleoli [65]. The reduction of nuclear size in TS GCs is consistent with their increased heterochromatin domains and reduced global transcription. Nuclear size has been positively correlated with DNA content and global transcription rate [37,54,66]. Interestingly, a reduction of both nuclear size and RNA synthesis has been reported in differentiating neuronal progenitors in the absence of the methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) [66]. This protein recognizes unmethylated and methylated regions of the genome and, acting as an epigenetic regulator of gene expression, can both repress and activate specific genes depending on the context [67]. In agreement with the close relationship between epigenetic regulation of chromatin and nuclear size in TS GCs, we found that increased levels of histone H4K20me3, a marker of repressive heterochromatin domains [52,53], and decreased expression of acetylated histone H4 both correlated with reduced nuclear size. Moreover, two genes, *Mecp2* and *H1f0*, involved in the organization of heterochromatin are upregulated in the hippocampi of TS mice [56,57,67]. In this context, chromatin compaction in heterochromatin should reduce the nuclear subvolume occupied by chromosome territories, leading to decreased nuclear size, as has been reported in some neurodegenerative disorders such as SMA [55].

The global reduction of the transcription rate in TS GCs detected with the *in situ* 5'-FU transcription assay is noteworthy. The decreased incorporation of 5'-FU into nascent RNA clearly occurs in active euchromatin domains, supporting the fact that downregulated genes mainly correspond to protein coding genes. However, the contribution of chromatin non-coding genes cannot be ruled out. Consistent with the run-on transcription assay, we have detected a reduction of the acetylated histone H4, a marker of "open" transcriptionally active euchromatin [58], by immunofluorescence and Western blotting.

Despite the high complexity of gene expression in aneuploid mammalian cells, a common feature is decreased proliferative capacity [64]. In particular, mouse embryonic fibroblasts trisomic for Mmu16 show an upregulation of the genes involved in the cellular stress response, and downregulation of cell cycle transcripts, including mitosis, DNA replication, and chromosome segregation [64]. This transcriptional response can impact the neurogenesis of hippocampal GCs resulting in the reduction of mature neurons previously reported in the TS mouse model of DS [8,68].

Regarding the particular impact of the Mmu16 trisomy on global gene expression in the central nervous system, Kahlem et al. [44] reported increased transcripts in the majority of trisomic genes in the cerebral cortex and cerebellum of TS mice, supporting an upregulation which is proportional to the gene copy number. However, some trisomic genes are downregulated, suggesting the participation of additional regulatory mechanisms [44]. Beyond the expression levels of trisomic genes in the TS mouse, which represents a small fraction of the mouse genome, our results support a global reduction of transcriptional activity. We propose that two factors are essential in this transcriptional response. First, the changes in nuclear architecture and gene positioning induced by Mmu16 trisomy may disturb normal gene interactions, resulting in a downregulation of gene expression [19]. For example, downregulation of several disomic genes implicated in the survival and maintenance of neuronal pathways has been found in CA1 pyramidal neurons of TS mice. Second, a common feature of aneuploid mammalian cells is the altered regulation of cellular stress response genes [64]. In this regard, it is well known that cellular stress commonly induces a genome-wide transcriptional repression of thousands of RNA pol II activity-dependent genes, excluding stress-related genes that are upregulated [69].

Additionally, the altered expression of several orthologous Hsa21 genes, triplicated in the TS mouse, may contribute to increased heterochromatinization, or the decrease in global transcription found in the GCs of this mouse model. Among them, *Hlcs* catalyzes the biotinylation of some histones and induces chromatin condensation and the repression of genes [70,71]. Other triplicated genes such as *Dyrk1A* and *Runx1* codify proteins that may alter the epigenetic architecture of the nucleus [72,73].

In relation to the nucleolar behavior of GCs from the TS mouse, the increase in the number of nucleoli is remarkable. Two important factors may influence the determination of the number of nucleoli in maturing GCs: the number of NORs, and the nucleolar fusion pattern. In eukaryotic cells, beginning at telophase, the transcription of rRNA genes resumes and nucleoli start to reform around individual NORs, initially forming multiple nucleoli. They fuse together, resulting in the assembly of one or a few larger mature nucleoli, each containing several NORs [21,24,40]. In euploid mice there are six NOR-bearing acrocentric chromosomes (12, 15, 16, 17, 18, 19), and their NORs are positioned close to telomeres [21]. Interestingly, while the triplication of Hsa21 provides an additional NOR in DS, the trisomic Mmu16 segment of the TS mouse does not include an additional NOR [74]. Therefore, the increase in TS GC nucleoli is independent of the presence of a supernumerary NOR.

Regarding nucleolar fusion, its cellular and molecular mechanisms are not well known, but there is evidence that this cellular process must involve an important spatial reorganization of NOR-bearing chromosomes within the nucleus [21]. Indeed, cell-life experiments in human cells during the early G1 phase have shown ATP-dependent chromosome displacements of 3–5 µm, and also that nucleoli usually independently move away from each other [75,76]. However, pairs of nucleoli coordinate and slow down their movements when they are to be fused. Taking into consideration that nucleolar rDNA arrays are physically tethered to chromatin fibers of NOR-bearing chromosomes, nucleolar motion must lead to local spatial reorganization of chromatin [76]. Moreover, it has been proposed that the nucleoplasm viscosity around the nucleolus, as well as the interaction of the nucleolus with the surrounding chromatin, sets the time scale for nucleolar fusion kinetics [76].

In this context, we propose that partial trisomy-associated alterations in nuclear architecture and the epigenetic state of chromatin in differentiating TS GCs interferes with

the normal pattern of nucleolar fusion, resulting in an increase in the number of nucleoli. In addition to rRNA transcription, nucleolin plays a key role in nucleolar assembly [61,62,77]. We suggest that the preserved expression of nucleolin mRNA and protein may contribute to the maintenance of an elevated number of nucleoli in mature TS GCs. Moreover, although nucleolin is a multifunctional protein with a predominant nucleolar localization, there is a nucleoplasmic pool [26,78] which could potentially be involved in the biogenesis of the supernumerary nucleoli.

Importantly, whereas most large size mammalian neurons are mononucleolated, small size neurons with lower transcriptional activity tend to be multinucleolated. This suggests a negative correlation between transcriptional activity and the number of nucleoli in mammalian neurons [37,38]. It is thought that the presence of a single nucleolus allows the concentration of active ribosomal genes and the molecular machinery for rRNA transcription and processing in a unique nucleolar domain, which potentially enhances the molecular interactions required for nucleolar activity.

Supporting the hypothesis of the spatial reorganization of NOR-bearing chromosomes in trisomic GCs, we have found changes in the normal distribution of Ag-NORs stained with a silver nitrate procedure that recognizes some argyrophilic proteins associated with rDNA arrays [21,22]. In addition to the presence of typical Ag-NORs associated with nucleoli [21], we observed a significant increase of smaller extranucleolar foci of Ag-NORs, suggesting that partial Mmu16 trisomy induces positional changes in some NOR-bearing chromosomes.

Our results show non-significant changes in the expression of both 45S pre-rRNA and mature 18S and 28S rRNAs in hippocampal TS mice compared with control ones, suggesting that ribosomal gene transcription is preserved in TS GCs. Consistent with these findings, no variations in the expression of genes encoding three key nucleolar proteins, UBE, fibrillarin and nucleophosmin, were found between control and TS hippocampal RNA extracts. The maintenance of ribosomal gene transcription in TS GCs may reflect a reactive response of the nucleolus to the global reduction of the transcription of protein-coding genes, in an attempt to preserve ribosome biogenesis and translational activity. A similar reactive compensatory nucleolar response has been reported in (i) SMA spinal motor neurons, (ii) sensory ganglion neurons under experimental conditions of proteotoxic stress and (iii) certain neuronal populations from AD patients [27,29,79]. It is also noteworthy that the increase in the number of nucleoli in TS GCs does not correlate with a parallel increase of nucleolar transcription.

Another important issue is the changes in the organization of CBs in TS GCs, with two crucial manifestations: a reduction in the number of canonical CBs, and an increased incidence of perinucleolar caps of coilin which are free of snRNPs. CBs are very dynamic transcription-dependent nuclear structures [18,32,33,35]. In post-mitotic neurons with high transcription and splicing demands, CBs play an essential role in the biogenesis of spliceosomal snRNPs [30,32,80]. Several experimental or pathological conditions including cellular stress, inhibition of transcription, DNA damage, and splicing dysfunction induced by SMN deficiency in SMA motor neurons induce disruption and loss of CBs [25,29,81,82]. In this context, the depletion of CBs is consistent with both cellular stress and a drop in the global transcription rate and, consequently, in the neuronal demand for pre-mRNA splicing in TS GCs. Moreover, current conceptions of CB assembly indicate that they are formed on active U snRNA or snoRNA and histone gene loci [33,34], suggesting that the reduced transcription of these genes can directly contribute to the decrease in the number of CBs.

The increased formation of perinucleolar caps of coilin suggests a defective assembly of CBs which is dependent on post-translational modifications of CB proteins such as SMN and coilin [80,83]. Coilin methylation is a key regulatory factor for CB assembly [84], and hypomethylated coilin has been reported to relocalize in perinucleolar caps upon inhibition of protein methylation or SMN depletion in mammalian neurons [29,85].

#### 4. Conclusions

In conclusion, in this study we demonstrate that the three copies of a fragment of Mmu16 in the TS mouse alters the nuclear architecture (increase of both heterochromatin domains and the number of nucleoli, and loss of CBs) of their hippocampal GCs. The organization of CBs and nucleoli is emerging as a reliable nuclear indicator of neuronal homeostasis, and of its dysfunction under neurodegenerative conditions such as AD [27,28,86]. Because of the fundamental role of CBs in pre-mRNA processing, the alterations of these nuclear structures in GCs of TS mice may disturb mature mRNA synthesis and translation, affecting the maintenance of neuronal homeostasis, particularly the function of dendrites and synapses. Furthermore, the 3D genome reorganization of the hippocampal GCs of TS mice produces an epigenetic dysregulation of chromatin that results in increased heterochromatinization and reduced global transcriptional activity. Besides its influence on trisomic genes, this response may alter the expression of other disomic genes with essential functions in neuronal proliferation, maintenance, or survival. Because GCs have a fundamental role in hippocampal-dependent learning and memory [87], alterations in their nuclear compartments or 3D genome organization may play an important role in the altered neurogenesis and contribute to the cognitive deficits of this mouse model of DS.

#### 5. Materials and methods

##### 5.1. Animals

This study was approved by the Cantabria University Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and the European Communities Council Directive (86/609/EEC of 24 November 1986). TS and control mice were generated and karyotyped using real-time quantitative PCR (qPCR) as previously described [68]. In all the experiments, 6-month-old TS mice were compared with their euploid control littermates.

##### 5.2. Immunofluorescence and Confocal Microscopy

For immunofluorescence, at least three animals of each karyotype were anesthetized and perfused under deep anesthesia with paraformaldehyde 3.7% in PBS, and post-fixed for 1 h. Their brains were removed and coronally sliced in a vibratome (200 µm thick). Small fragments from the GCL of the hippocampus were dissected out and transferred to a drop of PBS on a siliconized slide. Squash preparations of dissociated GCs were performed following the protocol described by [37]. The samples were then sequentially treated with 0.1 glycine in PBS for 20 min, 0.5% of Triton X-100 in PBS for 45 min, and 0.05% of Tween20 in PBS for 5 min. The samples were then incubated overnight at 4 °C with the primary antibody, washed with 0.05% of Tween20 in PBS, incubated 45 min in the specific secondary antibody conjugated with FITC or TexasRed (Jackson, Laboratories, USA Jackson, West Grove, PA, USA), and mounted with Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Some samples were counterstained with propidium iodide.

Confocal images were obtained with a LSM510 (Zeiss, Germany) laser scanning microscope using a 63x Oil (1.4 NA) objective. In order to avoid overlapping signals, images were obtained by sequential excitation at 488 nm and 543 nm to detect FITC or TexasRed, respectively. The images were processed using Adobe Photoshop CS4 software (Adobe Systems Inc, California, CA, USA).

The following primary antibodies were used: polyclonal rabbit anti-acetyl histone H4 (06-598, Upstate), polyclonal rabbit anti-tri-methylated histone H4 at K20 (07-463, Upstate), anti-coilin 204/10 (204.3 serum), anti-TMG-cap (NA02A, Oncogene) and anti-nucleolin (ab22758, Abcam). Morphometric and quantitative analyses were performed using ImageJ software (US National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij>). At least 100 GCs per animal were sampled in all the analyses. The nuclear area of the GC was determined using DAPI staining. Nuclear perimeters were traced by hand and the areas were measured with Image J default tools to calculate the shape descriptors. Acetylated histone-H4 fluorescence intensity was quantified within the nuclear perimeter of the GC. Quantification of the area

occupied by tri-methylated histone-H4 was performed in single-plane images. First, the nuclear area was determined and then the regions occupied by tri-methylated histone-H4 were delimited by applying an automatic local threshold. For the quantitative analysis of the number of CBs and nucleoli, coilin and nucleolin positive spots were counted, respectively, on serial confocal sections of the whole nucleus.

### 5.3. *In Situ Transcription Assays with 5'-Fluorouridine*

Active transcription sites were labelled by incorporation of 5'-fluorouridine (5'-FU) into nascent RNA as previously described [60]. The mice were given an intraperitoneal injection of 5-FU (Sigma, Darmstadt, Germany) at a dose of 10  $\mu\text{L/g}$  of a stock solution of 0.4 M 5-FU in 0.9% saline. The mice were euthanized 45 min post-injection and fixed by perfusion with 3.7% paraformaldehyde in HPEM buffer (2 $\times$  HPEM: Hepes, 60 mM; Pipes, 130 mM; EGTA, 20 mM; and  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 mM) containing 0.5% Triton X for 10 min. Their brains were removed, post-fixed with a perfusion buffer for 1 h and washed in HPEM. Then, mechanical GCs dissociation was performed as described above. The incorporation of 5'-FU into nascent RNA was detected with mouse monoclonal anti-BrdU (Clone BU-33, Sigma, Darmstadt, Germany) for 1 h at 37 °C. Then, the samples were washed with 0.01% Tween 20 in PBS, incubated for 45 min with an anti-mouse FITC-conjugated secondary antibody, washed in PBS and mounted with Vectashield. Quantification of the intensity of 5'-FU fluorescence was determined within the nuclear perimeter in at least 100 GCs from three animals of each karyotype.

### 5.4. *Conventional and Immunoelectron Microscopy*

To analyze the ultrastructure of GCs, three TS and control mice were perfused with 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Their brains were removed and post-fixed overnight with the perfusion buffer. Then, coronal brain slices (300  $\mu\text{m}$  thick) were obtained using a vibratome, and small fragments of the GCL of the hippocampus were dissected out. The processing of the hippocampal samples was performed following the procedure previously reported by [25].

For immunoelectron microscopy of coilin, three CO and TS mice were perfused with 3.7% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Small fragments of the GCL of the hippocampus were isolated from 300  $\mu\text{m}$ -thick slices. The samples were processed following the protocol previously described by Pena et al. [37]. The samples were examined with a Phillips EM-208 electron microscope operated at 60 kV.

### 5.5. *Ag-NOR Staining*

Active chromosomal NORs were revealed in squashes of GCs by a silver impregnation method following the protocol described by [22]. Images were obtained using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope with a 100X objective. Ag-NOR spots were quantified in the nuclei of at least 100 GCs from three animals of each group.

### 5.6. *Western Blotting*

Mice were euthanized by decapitation and their hippocampi were dissected and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Six hippocampi from TS and CO mice were lysed and homogenized as previously described [68]. The homogenates were boiled for 10 min and sonicated for 5 cycles of 30 s On/Off at  $4^\circ\text{C}$  using a Bioruptor Plus (Diadode) and left on ice for 20 min. The total protein content of each sample was determined following the protocol described by [88]. Identical amounts of protein from each sample were loaded on a 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, electrophoresed and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Blots were incubated with a polyclonal rabbit anti-acetyl histone H4 (06-598, Upstate), polyclonal rabbit anti-tri-methylated histone H4 at K20 (07-463, Upstate) and polyclonal rabbit anti-nucleolin (ab22758, Abcam) overnight at  $4^\circ\text{C}$ . To ensure equal loading, the blots were reprobed using a mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (6C5) (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After extensive

washing, immunoblots were developed with goat anti-rabbit IRDye 680RD antibody or goat anti-mouse IRDye800CW (1:10,000; LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA)

Protein bands were detected using a LI-COR ODYSSEY IR Imaging system V3.0 (LI-COR Biotechnology) and quantified following the protocol described by [68].

#### 5.7. Real Time Quantitative PCR (qRT-PCR)

For qRT-PCR analysis, six control and TS mice were anesthetized and decapitated. Their hippocampi were removed, rapidly frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . RNA was isolated using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was reverse-transcribed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania) and cDNA concentration was measured in a spectrophotometer (Nanodrop Technologies ND-1000) and adjusted to  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . The rRNA expression of 45S precursor, 18S 5'junction intermediary and mature 18S and mRNA expression of genes encoding nucleolar components nucleolin (*Ncl*), fibrillarin (*Fbn1*) and UBF (*Ubf*) was determined by RT-qPCR using gene-specific SYBRGreen (TaKaRa)-based primers. Each individual sample was performed in triplicate. The threshold cycle ( $C_t$ ) was determined and the results were normalized to the housekeeping gene GAPDH. Relative expression was calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  equation [89]. SYBRGreen-based specific primers for murine RNAs were: for MeCP2 5'-gtgaaggagtcttcatacggtc-3' and 5'-tctcctgtctttacgccc-3', for Histone H1 5'-cgccgactcccagatcaagt-3' and 5'-gaccttttgggctcatcgcc-3', for 45S 5'-gaacggtggtgtgtcgtt-3' and 5'-gctgtctctctctctact-3', for 18S 5'junction precursor 5'-cgctctccttacctggtt-3' and 5'-ggagaggagcgcgacc-3', for mature 18S 5'-gatgtagtcgccgtcc-3' and 5'-ccaaggaaggcagcagc-3', for 28S 5'junction precursor 5'-cctctctctctcttctcc-3' and 5'-cctgttactcgcgttact-3', for mature 28S 5'-gtgacgcgatgaatgga-3' and 5'-tgtggttcgctggatagtagt-3', for nucleolin 5'-attggggaggaaggaagt-3' and 5'-tcagcacttcgagttgaagca-3', for fibrillarin 5'-tctgttccctggagagtctg-3' and 5'-gggttcaggctctgtact-3', for UBF 5'-ccgcgagcatacaagaat-3' and 5'-gtggtccggctagacttg-3', for nucleophosmin 5'-tcggctgtgaactaaaggct-3' and 5'-gccctgtcctaactgac-3', for coilin 5'-ccgaggtggtggaatacgt-3' and 5'-aggccagaggtcagatccaga-3' and for GAPDH 5'-aggtcgtgtgaaccgattg-3' and 5'-ttagaccatgttagttgaggtca-3'.

#### 5.8. Statistical Analysis

For comparisons, data was analyzed using Student's *t*-test. All analyses were performed using SPSS (version 22.0, Chicago, IL, USA) for Windows.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1259/s1>, **Supplementary Figure S1:** GCs from control and TS mice immunostained for coilin and co-stained with propidium iodide, **Supplementary Figure S2:** Expression of nucleolin in the hippocampi of TS and CO mice.

**Author Contributions:** A.P.-B., M.T.B., O.T. and N.R. performed the experiments and analyzed the data. M.L., M.T.B., C.M.-C. and N.R. conceived the project; designed, supervised and interpreted the experiments; and wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the following grants: “Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas” (CIBERNED; CB06/05/0037) Spain, “Instituto de Investigación Valdecilla” (IDIVAL; NVAL 19/23), Santander, Spain and Consejería de Universidades, Igualdad, Cultura y Deporte del Gobierno de Cantabria (16.VP39.64662).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the University of Cantabria Animal Care and Use Committee (Protocol code: PI-07-20; date of approval: March/09/2020).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Raquel García-Ceballos for her technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Shin, M.; Besser, L.M.; Kucik, J.E.; Lu, C.; Siffel, C.; Correa, A. The Congenital Anomaly Multistate Prevalence and Survival (CAMPS) Collaborative. Prevalence of Down Syndrome Among Children and Adolescents in 10 Regions of the United States. *Pediatrics* **2009**, *124*, 1565–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gupta, M.; Dhanasekaran, A.R.; Gardiner, K.J. Mouse models of Down syndrome: Gene content and consequences. *Mamm. Genome* **2016**, *27*, 538–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rueda, N.; Flórez, J.; Martínez-Cué, C. Mouse Models of Down Syndrome as a Tool to Unravel the Causes of Mental Disabilities. *Neural Plast.* **2012**, *2012*, 1–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hérault, Y.; Delabar, J.M.; Fisher, E.M.C.; Tybulewicz, V.L.J.; Yu, E.; Brault, V. Rodent models in Down syndrome research: Impact and future opportunities. *Dis. Model. Mech.* **2017**, *10*, 1165–1186. [[CrossRef](#)]
5. Antonarakis, S.E.; Skotko, B.G.; Ruffolo, M.S.; Strydom, A.; Pape, S.E.; Bianchi, D.W.; Sherman, S.L.; Reeves, R.H. Down syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2020**, *6*, 9. [[CrossRef](#)]
6. Sturgeon, X.; Gardiner, K.J. Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. *Mamm. Genome* **2011**, *22*, 261–271. [[CrossRef](#)]
7. Bartesaghi, R.; Guidi, S.; Ciani, E. Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Rev. Neurosci.* **2011**, *22*, 419–455. [[CrossRef](#)]
8. Contestabile, A.; Fila, T.; Ceccarelli, C.; Bonasoni, P.; Bonapace, L.; Santini, D.; Bartesaghi, R.; Ciani, E. Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus* **2007**, *17*, 665–678. [[CrossRef](#)]
9. Llorens-Martín, M.; Rueda, N.; Tejada, G.S.; Flórez, J.; Trejo, J.; Martínez-Cué, C. Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Neuroscience* **2010**, *171*, 1228–1240. [[CrossRef](#)]
10. Rueda, N.; Vidal, V.; García-Cerro, S.; Puente, A.; Campa, V.; Lantigua, S.; Narcís, O.; Bartesaghi, R.; Martínez-Cué, C. Prenatal, but not Postnatal, Curcumin Administration Rescues Neuromorphological and Cognitive Alterations in Ts65Dn Down Syndrome Mice. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 2478–2489. [[CrossRef](#)]
11. Haydar, T.F.; Reeves, R.H. Trisomy 21 and early brain development. *Trends Neurosci.* **2012**, *35*, 81–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kleschevnikov, A.M.; Yu, J.; Kim, J.; Lysenko, L.V.; Zeng, Z.; Yu, Y.E.; Mobley, W.C. Evidence that increased *Kcnj6* gene dose is necessary for deficits in behavior and dentate gyrus synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *103*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Giacomini, A.; Stagni, F.; Emili, M.; Guidi, S.; Salvalai, M.E.; Grilli, M.; Vidal-Sanchez, V.; Martínez-Cué, C.; Bartesaghi, R. Treatment with corn oil improves neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Brain Res. Bull.* **2018**, *140*, 378–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Villarroya, O.; Ballestín, R.; López-Hidalgo, R.; Mulet, M.; Blasco-Ibáñez, J.M.; Crespo, C.; Nacher, J.; Gilabert-Juan, J.; Varea, E. Morphological alterations in the hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down Syndrome correlate with structural plasticity markers. *Histol. Histopathol.* **2018**, *33*, 101–115. [[PubMed](#)]
15. Boisvert, F.-M.; Van Koningsbruggen, S.; Navascués, J.; Lamond, A.I. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 574–585. [[CrossRef](#)]
16. Cremer, T.; Cremer, M. Chromosome Territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a003889. [[CrossRef](#)]
17. Mao, Y.S.; Zhang, B.; Spector, D.L. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* **2011**, *27*, 295–306. [[CrossRef](#)]
18. Machyna, M.; Kehr, S.; Straube, K.; Kappei, D.; Buchholz, F.; Butter, F.; Ule, J.; Hertel, J.; Stadler, P.F.; Neugebauer, K.M. The coilin interactome identifies hundreds of small noncoding RNAs that traffic through Cajal bodies. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 389–399. [[CrossRef](#)]
19. Maass, P.G.; Barutcu, A.R.; Rinn, J.L. Interchromosomal interactions: A genomic love story of kissing chromosomes. *J. Cell Biol.* **2019**, *218*, 27–38. [[CrossRef](#)]
20. Karpen, G.H.; Schaefer, J.E.; Laird, C.D. A Drosophila rRNA gene located in euchromatin is active in transcription and nucleolus formation. *Genes Dev.* **1988**, *2*, 1745–1763. [[CrossRef](#)]
21. McStay, B. Nucleolar organizer regions: Genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1598–1610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zatselpina, O.V. Cytogenetic instability of chromosomal nucleolar organizer regions (NORs) in cloned mouse L929 fibroblasts. *Chromosome Res.* **2019**, *27*, 95–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Frank, D.J.; Roth, M.B. ncl-1 Is Required for the Regulation of Cell Size and Ribosomal RNA Synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **1998**, *140*, 1321–1329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hernandez-Verdun, D.; Roussel, P.; Thiry, M.; Sirri, V.; Lafontaine, D.L. The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdisc. Rev. RNA* **2010**, *1*, 415–431. [[CrossRef](#)]
25. Baltanas, F.C.; Casafont, I.; Weruaga, E.; Alonso, J.R.; Berciano, M.T.; Lafarga, M. Nucleolar disruption and Cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells. *Brain Pathol.* **2011**, *21*, 374–388. [[CrossRef](#)]

26. Baltanas, F.C.; Berciano, M.T.; Tapia, O.; Narcis, J.O.; Lafarga, V.; Díaz, D.; Weruaga, E.; Santos, E.; Lafarga, M. Nucleolin reorganization and nucleolar stress in Purkinje cells of mutant PCD mice. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *127*, 312–322. [[CrossRef](#)]
27. Hernández-Ortega, K.; Garcia-Esparcia, P.; Gil, L.; Lucas, J.J.; Ferrer, I. Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathol.* **2016**, *26*, 593–605. [[CrossRef](#)]
28. Parlato, R.; Kreiner, G. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: A missing piece of the puzzle? *J. Mol. Med.* **2012**, *91*, 541–547. [[CrossRef](#)]
29. Tapia, O.; Narcis, J.O.; Riancho, J.; Tarabal, O.; Piedrafita, L.; Calderó, J.; Berciano, M.T.; Lafarga, M. Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *108*, 83–99. [[CrossRef](#)]
30. Gall, J.G. The centennial of the Cajal body. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 975–980. [[CrossRef](#)]
31. Lafarga, M.; Casafont, I.; Bengoechea, R.; Tapia, O.; Berciano, M.T. Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. *Chromosoma* **2009**, *118*, 437–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Machyna, M.; Heyn, P.; Neugebauer, K.M. Cajal bodies: Where form meets function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2013**, *4*, 17–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wang, Q.; Sawyer, I.A.; Sung, M.-H.; Sturgill, D.; Shevtsov, S.P.; Pegoraro, G.; Hakim, O.; Baek, S.; Hager, G.L.; Dundr, M. Cajal bodies are linked to genome conformation. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Arias Escayola, D.; Neugebauer, K.M. Dynamics and function of nuclear bodies during embryogenesis. *Biochemistry* **2018**, *57*, 2462–2469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shevtsov, S.P.; Dundr, M. Nucleation of nuclear bodies by RNA. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 167–173. [[CrossRef](#)]
36. Matera, A.G.; Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 108–121. [[CrossRef](#)]
37. Pena, E.; Berciano, M.T.; Fernandez, R.; Ojeda, J.L.; Lafarga, M. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *430*, 250–263. [[CrossRef](#)]
38. Berciano, M.T.; Novell, M.; Terán-Villagrà, N.; Casafont, I.; Bengoechea, R.; Val-Bernal, J.F.; Lafarga, M. Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158*, 410–420. [[CrossRef](#)]
39. Narcis, J.O.; Tapia, O.; Tarabal, O.; Piedrafita, L.; Calderó, J.; Berciano, M.T.; Lafarga, M. Accumulation of poly(A) RNA in nuclear granules enriched in Sam68 in motor neurons from the SMN $\Delta$ 7 mouse model of SMA. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9646.
40. Savino, T.M.; Gébrane-Younès, J.; De Mey, J.; Sibarita, J.-B.; Hernandez-Verdun, D. Nucleolar Assembly of the Rna Processing Machinery in Living Cells. *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 1097–1110. [[CrossRef](#)]
41. Ito, K.; Takizawa, T. Nuclear Architecture in the Nervous System: Development, Function, and Neurodevelopmental Diseases. *Front. Genet.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kemeny, S.; Tatout, C.; Salaun, G.; Pebrel-Richard, C.; Goumy, C.; Ollier, N.; Maurin, E.; Pereira, B.; Vago, P.; Gouas, L. Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells. *Chromosome* **2018**, *127*, 247–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Letourneau, A.; Santoni, F.A.; Bonilla, X.; Sailani, M.R.; Gonzalez, D.; Kind, J.; Chevalier, C.; Thurman, R.; Sandstrom, R.S.; Hibaoui, Y.; et al. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature* **2014**, *508*, 345–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kahlem, P.; Sultan, M.; Herwig, R.; Steinfath, M.; Balzereit, D.; Eppens, B.; Saran, N.G.; Pletcher, M.T.; South, S.T.; Stetten, G.; et al. Transcript Level Alterations Reflect Gene Dosage Effects Across Multiple Tissues in a Mouse Model of Down Syndrome. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1258–1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lyle, R.; Gehrig, C.; Neergaard-Henrichsen, C.; Deutsch, S.; Antonarakis, S.E. Gene expression from the aneuploidy chromosome in a trisomy mouse model of Down syndrome. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1268–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Rachidi, M.; Lopes, C. Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: A consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2008**, *12*, 168–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Do, C.; Xing, Z.; Yu, Y.E.; Tycko, B. Catherine Trans-acting epigenetic effects of chromosomal aneuploidies: Lessons from Down syndrome and mouse models. *Epigenomics* **2017**, *9*, 189–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Alldred, M.J.; Lee, S.H.; Petkova, E.; Ginsberg, S.D. Expression profile analysis of vulnerable CA1 pyramidal neurons in young-Middle-Aged Ts65Dn mice. *J. Comp. Neurol.* **2014**, *523*, 61–74. [[CrossRef](#)]
49. Kelley, C.M.; Ginsberg, S.D.; Alldred, M.J.; Strupp, B.J.; Mufson, E.J. Maternal Choline Supplementation Alters Basal Forebrain Cholinergic Neuron Gene Expression in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *Dev. Neurobiol.* **2019**, *79*, 664–683. [[CrossRef](#)]
50. Mentis, A.-F.A. Epigenomic engineering for Down syndrome. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2016**, *71*, 323–327. [[CrossRef](#)]
51. Nelson, D.M.; Jaber-Hijazi, F.; Cole, J.J.; Robertson, N.A.; Pawlikowski, J.S.; Norris, K.T.; Criscione, S.W.; Pchelintsev, N.A.; Piscitello, D.; Stong, N.; et al. Mapping H4K20me3 onto the chromatin landscape of senescent cells indicates a function in control of cell senescence and tumor suppression through preservation of genetic and epigenetic stability. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Karachentsev, D.; Sarma, K.; Reinberg DSteward, R. PR-Ser7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 431–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Shoaib, M.; Walter, D.; Gillespie, P.J.; Izard, F.; Fahrenkrog, B.; Lleres, D.; Lerdrup, M.; Johansen, J.V.; Hansen, K.; Julien, E.; et al. Histone H4K20 methylation mediated chromatin compaction threshold ensures genome integrity by limiting DNA replication licensing. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Webster, M.; Witkin, K.L.; Cohen-Fix, O. Sizing up the nucleus: Nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1477–1486. [[CrossRef](#)]
55. Castillo-Iglesias, M.S.; Berciano, M.T.; Narcis, J.O.; Val-Bernal, J.F.; Rodriguez-Rey, J.C.; Tapia, O.; Lafarga, M. Reorganization of the nuclear compartments involved in transcription and RNA processing in myonuclei of type I spinal muscular atrophy. *Histochem. Cell Biol.* **2019**, *152*, 227–237. [[CrossRef](#)]
56. Singleton, M.K.; Gonzalez, M.L.; Leung, K.N.; Yasui, D.H.; Schroeder, D.I.; Dunaway, K.; LaSalle, J.M. MeCP2 is required for global heterochromatic and nucleolar changes during activity-dependent neuronal maturation. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *43*, 190–200. [[CrossRef](#)]
57. Flanagan, T.W.; Brown, D.T. Molecular dynamics of histone H1. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 468–475. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, T.; Cooper, S.; Brockdorff, N. The interplay of histone modifications—Writers that read. *EMBO Rep.* **2015**, *16*, 1467–1481. [[CrossRef](#)]
59. Rieder, D.; Trajanoski, Z.; McNally, J.G. Transcription factories. *Front. Genet.* **2012**, *3*, 221. [[CrossRef](#)]
60. Casafont, I.; Palanca, A.R.; Lafarga, V.; Mata-Garrido, J.; Berciano, M.T.; Lafarga, M. Dynamic Behavior of the RNA Polymerase II and the Ubiquitin Proteasome System During the Neuronal DNA Damage Response to Ionizing Radiation. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *53*, 6799–6808. [[CrossRef](#)]
61. Caudron-Herger, M.; Pankert, T.; Seiler, J.; Nemeth, A.; Voit, R.; Grummt, I.; Rippe, K. Alu element-containing RNAs maintain nuclear structure and function. *EMBO J.* **2015**, *34*, 2758–2774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Carmo-Fonseca, M. Assembly of the nucleolus: In need of revision. *EMBO J.* **2015**, *34*, 2731–2732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Mayer, C.; Bierhoff, H.; Grummt, I. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 933–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sheltzer, J.M.; Torres, E.M.; Dunham, M.J.; Amon, A. Transcriptional consequences of aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 12644–12649. [[CrossRef](#)]
65. Mennel, H.D.; Moller, I. Morphometric investigation on nuclear and nucleolar arrangement and AgNOR content in the rat hippocampus under normal and ischemic conditions. *Exp. Toxic Pathol.* **1994**, *46*, 491–501. [[CrossRef](#)]
66. Yazdani, M.; Deogracias, R.; Guy, J.; Poot, R.A.; Bird, A.; Barde, Y.-A. Disease Modeling Using Embryonic Stem Cells: MeCP2 Regulates Nuclear Size and RNA Synthesis in Neurons. *Stem. Cells* **2012**, *30*, 2128–2139. [[CrossRef](#)]
67. Hansen, J.C.; Ghosh, R.P.; Woodcock, C.L. Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life* **2010**, *62*, 732–738. [[CrossRef](#)]
68. García-Cerro, S.; Rueda, N.; Vidal, V.; Lantigua, S.; Martínez-Cué, C. Normalizing the gene dosage of Dyrk1A in a mouse model of Down syndrome rescues several Alzheimer’s disease phenotypes. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *106*, 76–88. [[CrossRef](#)]
69. Vihervaara, A.; Duarte, F.M.; Lis, J.T. Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, *19*, 385–397. [[CrossRef](#)]
70. Pestinger, V.; Wijeratne, S.S.K.; Rodriguez-Melendez, R.; Zempleni, J. Novel histone biotinylation marks are enriched in repeat regions and participate in repression of transcriptionally competent genes. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 328–333. [[CrossRef](#)]
71. Singh, M.P.; Wijeratne, S.S.K.; Zempleni, J. Biotinylation of lysine 16 in histone H4 contributes toward nucleosome condensation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *529*, 105–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Canzonetta, C.; Mulligan, C.; Deutsch, S.; Ruf, S.; O’Doherty, A.; Lyle, R.; Borel, C.; Lin-Marq, N.; Delom, F.; Groet, J.; et al. DYRK1A-dosage imbalance perturbs NRSF/REST levels, deregulating pluripotency and embryonic stem cell fate in Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *83*, 388–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Bakshi, R.; Hassan, M.Q.; Pratap, J.; Lian, J.B.; Montecino, M.A.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Imbalzano, A.N.; Stein, G.S. The human SWI/SNF complex associates with RUNX1 to control transcription of hematopoietic target genes. *J. Cell Physiol.* **2010**, *225*, 569–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Antonarakis, S.E.; Lyle, R.; Dermitzakis, E.T.; Reymond, A.; Deutsch, S. Chromosome 21 and Down syndrome: From genomics to pathophysiology. *Nat. Rev. Genet.* **2004**, *5*, 725–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Zidovska, A.; Weitz, D.A.; Mitchison, T.J. Micron-scale coherence in interphase chromatindynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 15555–15560. [[CrossRef](#)]
76. Caragine, C.M.; Haley, S.C.; Zidovska, A. Nucleolar dynamics and interactions with nucleoplasm in living cells. *eLife* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)]
77. Falahati, H.; Pelham-Webb, B.; Blythe, S.; Wieschaus, E. Nucleation by rRNA Dictates the Precision of Nucleolus Assembly. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 277–285. [[CrossRef](#)]
78. Das, S.; Cong, R.; Shandilya, J.; Senapati, P.; Moindrot, B.; Monier, K.; Delage, H.; Mongelard, F.; Kumar, S.; Kundu, T.K.; et al. Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 417–424. [[CrossRef](#)]
79. Palanca, A.R.; Casafont, I.; Berciano, M.T.; Lafarga, M. Reactive nucleolar and Cajal body responses to proteasome inhibition in sensory ganglion neurons. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1842*, 848–859. [[CrossRef](#)]

80. Lafarga, V.; Tapia, O.; Sharma, S.; Bengoechea, R.; Stoecklin, G.; Lafarga, M.; Berciano, M.T. CBP-mediated SMN acetylation modulates Cajal body biogenesis and the cytoplasmic targeting of SMN. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *75*, 527–546. [[CrossRef](#)]
81. Cioce, M.; Boulon, S.; Matera, A.G.; Lamond, A.I. UV-induced fragmentation of Cajal bodies. *J. Cell Biol.* **2006**, *175*, 401–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Gilder, A.S.; Do, P.M.; I Carrero, Z.; Cosman, A.M.; Broome, H.J.; Velma, V.; Martinez, L.A.; Hebert, M.D. Coilin participates in the suppression of RNA polymerase I in response to cisplatin-induced DNA damage. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1070–1079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Hebert, M.D.; Poole, A.R. Towards an understanding of regulating Cajal body activity by protein modification. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 761–778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hebert, M.D.; Shpargel, K.B.; Ospina, J.K.; Tucker, K.E.; Matera, A.G. Coilin Methylation Regulates Nuclear Body Formation. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 329–337. [[CrossRef](#)]
85. Navascués, J.; Bengoechea, R.; Tapia, O.; Casafont, I.; Berciano, M.; Lafarga, M. SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. *J. Struct. Biol.* **2008**, *163*, 137–146. [[CrossRef](#)]
86. Hetman, M.; Pietrzak, M. Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci.* **2012**, *35*, 305–314. [[CrossRef](#)]
87. Hainmueller, T.; Bartos, M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nat. Rev. Neurosci.* **2020**, *21*, 153–168. [[CrossRef](#)]
88. Lowry, O.H.; Rosebrouh, N.H.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275. [[CrossRef](#)]
89. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]

El síndrome de Down (SD) es la causa genética más común de discapacidad intelectual y se produce por la triplicación total o parcial del cromosoma humano 21 (HSA21). Con el fin de estudiar las bases celulares y moleculares de los déficits cognitivos del SD, en este Trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado el modelo murino Ts65Dn (TS), que contiene una triplicación parcial del cromosoma murino 16 (Mmu16) y reproduce numerosos fenotipos similares a los encontrados en el SD, como las alteraciones en la memoria y el aprendizaje dependiente de hipocampo. En el SD y en el ratón TS, las células granulares (CG) del hipocampo, que tienen un papel fundamental en la formación de nuevas memorias, muestran diversas anomalías morfológicas, electrofisiológicas y funcionales. En esta Tesis Doctoral se han evaluado diversas alteraciones celulares producidas por un exceso de dosis génica o asociadas al incremento de estrés oxidativo en esta población neuronal del ratón TS. En el primer estudio se evaluó el efecto del exceso de dosis génica sobre la arquitectura nuclear de las CG del ratón TS. Nuestros resultados muestran que las CG del ratón TS presentan una reducción en el tamaño del núcleo celular, alteraciones en el perfil epigenético, un incremento de heterocromatinización y una disminución en la actividad transcripcional global. Además, las CG del ratón TS presentaban alteraciones en el patrón de fusión nucleolar y en el ensamblaje de los cuerpos nucleares de Cajal. En el segundo estudio se analizaron alteraciones asociadas al exceso de estrés oxidativo en distintos componentes celulares de las CG del ratón TS. Los resultados demostraron que el aumento de estrés oxidativo en el hipocampo de estos animales está asociado a alteraciones en componentes del sistema antioxidante, un aumento de la peroxidación lipídica y alteraciones en la estructura mitocondrial de las CG. Además, las CG del ratón TS también mostraron un aumento del daño en el DNA y alteraciones en los sistemas de degradación intracelular como el proteasoma y el sistema lisosomal, asociadas al estrés oxidativo. En conjunto, las alteraciones celulares encontradas en este trabajo pueden contribuir a las anomalías neuromorfológicas y funcionales de esta población neuronal en edades tempranas y, en edades más tardías, favorecer el envejecimiento acelerado, la neuropatología de tipo Alzheimer y la neurodegeneración implicadas en la disfunción cognitiva característica del ratón TS y los individuos SD.

Down syndrome (DS) or trisomy of chromosome 21 (HSA21) is the most frequent genetic cause of intellectual disability. To study the mechanisms involved in neurobiological and cognitive alterations of DS, in this Doctoral Thesis, we used the Ts65Dn (TS) mouse model, which carries a triplication of a fragment of the murine chromosome 16 (Mmu16) and reproduces several DS phenotypes including deficits in hippocampal-dependent learning and memory. In DS and TS mice, hippocampal granule cells (GCs), which are essential for memory formation, show several morphological, electrophysiological, and functional alterations. In this Doctoral Thesis, cellular alterations produced by an excess of gene dose or associated with an increase in oxidative stress have been evaluated in this neuronal population of the TS mouse. In the first study, the effect of the extra copy of the Mmu16 fragment on the nuclear architecture of the hippocampal CGs of the TS mouse was evaluated. The results of this study show that the TS CGs present a reduction in the size of the cell nucleus, alterations in the epigenetic profile, an increase in heterochromatinization, and a decrease in global transcriptional activity. In addition, TS GCs presented alterations in the nucleolar fusion pattern and the assembly of the nuclear Cajal bodies. In the second study, oxidative stress-associated alterations in different cellular components of the CGs of the TS mouse were analyzed. The results demonstrated that the increase in oxidative stress in the hippocampus of TS mice is associated with alterations in different components of the antioxidant system, increased lipid peroxidation, and structural mitochondrial anomalies in the CGs. In addition, the GCs of TS mice also showed an increase in DNA damage and alterations of the intracellular degradative systems such as the proteasome and the lysosomal system, associated with oxidative stress. Collectively the cellular alterations found in this work may contribute to the neuromorphological and functional abnormalities of this neuronal population at early ages and, at later stages of the lifespan, they can also accelerate aging, neurodegeneration, and the development of Alzheimer's disease neuropathology implicated in the cognitive dysfunction of TS mice and DS individuals.

