



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

Estudio del efecto de la reducción del número de copias del gen *Dyrk1A* sobre distintos fenotipos funcionales y neuromorfológicos encontrados en un modelo murino de Síndrome de Down y en ratones euploides

Tesis doctoral presentada por Susana García Cerro para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria

Santander, Febrero 2015



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

Dña. Carmen Martínez-Cué Pesini y Dña. Noemí Rueda Revilla, Profesoras Contratadas Doctoras del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN:

Que **Dña. Susana García Cerro** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: "Estudio del efecto de la reducción del número de copias del gen *Dyrk1A* sobre distintos fenotipos funcionales y neuromorfológicos encontrados en un modelo murino de Síndrome de Down y en ratones euploides".

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

Santander, 6 de febrero de 2015.

Fdo. Carmen Martínez-Cué Pesini

Fdo. Noemí Rueda Revilla

Este trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje del Departamento de Farmacología y Fisiología de la UC bajo la dirección de las Dras. Carmen Martínez-Cué Pesini y Noemí Rueda Revilla, entre diciembre de 2010 y enero de 2015.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Ministerio de Educación y Ciencia
- F. Hoffmann-La Roche Ltd

Agradecimientos

Resulta complicado comprimir en apenas un folio la gratitud que siento hacia todas aquellas personas que me han acompañado y ayudado, de una forma u otra, en esta gran etapa. Es mucho lo aprendido en estos 4 años, tanto personal como profesionalmente, por lo que puedo decir que me siento realmente afortunada.

En primer lugar querría dar las gracias a Carmen por ofrecerme un hueco en su laboratorio. Por animarme y creer en mí más que yo misma algunas veces; por mostrarse siempre dispuesta a hablar; por ser comprensiva cuando lo he necesitado, sobre todo en los momentos bajos. Pero sobre todo, por darme independencia para desarrollarme y libertad para soñar y pensar. También a Noe, ya que sus consejos valen oro. Gracias por estar siempre dispuesta a escucharme y dialogar; por ayudarme a organizarme cuando lo he necesitado; por todas las técnicas que me has enseñado; por llegar al fondo de cada cuestión y por todos los debates sobre esta tesis. Gracias a las dos por lo mucho que me habéis enseñado.

Gracias a Vero, mi “hermana de tesis”, mi compañera de batallas genial. Me has ayudado un mundo tanto fuera como dentro del laboratorio y has sido un apoyo fundamental para mí en los momentos personales más difíciles. Siempre me has devuelto el buen humor y dado fuerzas. Me llevo el mejor de los regalos posibles, una amiga. Gracias también a Pau, con la que he aprendido tantísimo personalmente. Por tu ayuda y tus enseñanzas en la poyata, por tu sinceridad y en general por todos los buenos momentos que hemos vivido tanto dentro como fuera del laboratorio, que han sido muchos. Gracias también a Eva por toda tu ayuda y tu buen hacer, por ser tan divertida, por tu preocupación, por ser tan maternal. Estoy segura de que gracias a ti, entre otras cosas, seré mucha mejor madre el día de mañana. Gracias a Andrea por tu ayuda y tu buen humor, siempre positiva y recordándome las cosas que realmente importan. También a Rebeca, quien además de tener que inculcarme la técnica más cruel, además me has enseñado a ser más serena y paciente. Y que no se me olvide María, la más auténtica y campechana. Y muchísimas gracias a “los nuevos”. A Sara, por tus historias geniales y tu buen rollo tan contagioso. A Edu, que haces que todo sea tan fácil, por ser el brasileño más agradable del mundo. Y a Marián por tu dulzura y tu amabilidad. Con vuestra frescura habéis hecho que este último año sea mucho más liviano. Con todos y cada uno de vosotros he compartido risas e incontables

Agradecimientos

momentos geniales, además de haberme enseñado cosas maravillosas que siempre estarán conmigo. La verdad es que no puedo imaginarme esta etapa sin ninguno de vosotros como equipo. Me siento muy afortunada.

Querría también mostrar mi agradecimiento al laboratorio de Maruja Hurlé, a Ana C, María, Nieves, Ana V, Mónica, Raquel, Sara, David, a la propia Maruja y en especial a Aki. Siempre me habéis ayudado en todo lo que habéis podido y más, además de sacarme una sonrisa. No podría haberme sentido mejor que con vosotros como vecinos, porque en vuestro labo me siento como en casa.

A los Hurlé, en especial a Nacho, que tanto me has enseñado. Siempre dispuestos a resolver mis dudas.

Al laboratorio de los Lafarga, que siempre abren sus puertas de par en par y te acogen, te ofrecen y comparten todo lo que tienen, te enseñan, te ayudan. Sin vuestra colaboración, consejos, ideas y soporte instrumental esta tesis no sería lo que es. Gracias.

A la gente del grupo Pazos; a Vir y a Gema de fisio.

A Ramón y Luís Alberto de la secretaría. Sois unos administradores geniales y muy divertidos.

Y muchísimas gracias a Víctor, el técnico de confocal más ingenioso y sabio, además de agradable.

Al personal de SEEA por atender a los ratoncitos con los que se ha hecho esta tesis. En especial a Mar, que tanto me ayudó a sacar la colonia hacia delante en los comienzos, y a Marta y a Lourdes por cuidarlos. Y también a los propios ratoncitos, con cuyas vidas no podría haberse realizado ni este ni muchos otros trabajos de investigación.

A Fede, mi amigo estupendo de Bilbao, siempre escuchando y dándome sabios consejos sobre la tesis. A Juan Mendizábal, que cuando me fui de allí me dijo que contase con él siempre que necesitase algo, y años después pude comprobar emocionada que así es.

A Ángel y a Isa, los mejores amigos que alguien querría tener en el mundo. Sois el mejor apoyo moral. Gracias por vuestra paciencia. Y a Cris, a Iván, a Jeza, a Mabi, a Bea, a Carol, a Lu, a Carmen, a Cin, a Ro y a Luís, siempre dispuestos a hacer que me evadiese y a animarme. Pero qué suertuda soy por haber podido estar cerca de vosotros en esta etapa de mi vida. Gracias por vuestra amistad. Y por supuesto al Centro Cántabro de Yoga y su gente sana, que sois todos maravillosos y curativos.

Por último, querría dar las gracias a mi familia, en especial a mi madre y a mi abuela, que siempre han creído tantísimo en mí y me han empujado hacia delante. Y a Toni, mi mejor amigo, mi compañero de vida. Tú has sido mi gran pilar durante todo este tiempo. Sin ti este trabajo no sería el mismo; tampoco hubiera podido mantener viva mi vocación en los momentos más bajos. Gracias por ayudarme a crecer y evolucionar en todos los sentidos posibles.

A todos y cada uno de vosotros, millones de gracias, ya que habéis hecho que sea mejor persona y científico.

**A mi madre,
a mi abuela,
a Toni.**

Índice

ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	31
1. EL SÍNDROME DE DOWN	31
1.1. Origen de la Trisomía 21	31
1.2. Alteraciones cognitivas en el Síndrome de Down	32
1.3. Alteraciones motoras en el Síndrome de Down	34
1.4. Relación entre los déficits cognitivo-conductuales y las regiones encefálicas afectadas en el Síndrome de Down	34
1.5. Neurobiología de las alteraciones cognitivas y conductuales del Síndrome de Down	36
1.6. El proceso neurodegenerativo asociado al Síndrome de Down	38
1.7. El cromosoma 21 humano y su aneuploidía: implicaciones genéticas	40
2. <i>DYRK1A</i> , UN GEN CANDIDATO PARA DISTINTOS FENOTIPOS DEL SÍNDROME DE DOWN	45
2.1. El gen <i>DYRK1A</i>	45
2.2. La proteína DYRK1A	45
2.3. Activación y regulación	46
2.4. Localización subcelular	47
2.5. Patrón espacio-temporal de DYRK1A en el sistema nervioso central	50
2.6. Papel de <i>DYRK1A</i> en el neurodesarrollo y en el funcionamiento cerebral adulto	51
2.7. Papel de <i>DYRK1A</i> en los procesos cognitivos y conductuales	53
2.8. Papel de <i>DYRK1A</i> en los procesos neurodegenerativos	54
3. MODELOS MURINOS PARA ESTUDIAR EL SÍNDROME DE DOWN	56
3.1. Modelos murinos trisómicos, totales o parciales, del MMU16	57
3.1.1. El ratón Ts65Dn como modelo de Síndrome de Down	59
3.2. Modelos murinos trisómicos para el MMU17 o MMU10/16/17	66
3.3. Modelos murinos transcromosómicos que contienen el cromosoma HSA21	68
3.4. Modelos murinos transgénicos YAC/BAC/PAC	69
3.5. Modelos murinos transgénicos y de pérdida de función de genes únicos	69
3.5.1. Modelos de ganancia de función de <i>Dyrk1A</i>	70
3.5.2. Modelo de pérdida de función de <i>Dyrk1A</i>	71
OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS	79
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	79
1.1. Manipulación y mantenimiento de los animales	79
1.2. Obtención del modelo animal	79

1.3. Cariotipado y genotipado de los animales	80
1.3.1. Preparación de las muestras	80
1.3.2. Cariotipado mediante qPCR cuantitativa	80
1.3.3. Genotipado de <i>Dyrk1A</i>	82
1.3.4. Genotipado de la mutación <i>Rd</i>	83
1.4. Grupos experimentales	84
2. VIABILIDAD DE LOS GENOTIPOS Y SOMATOMETRÍA	85
3. CARACTERIZACIÓN COGNITIVO-CONDUCTUAL	85
3.1. Reflejos sensoriales y función motora	86
3.2. Actividad espontánea: actimetría	89
3.3. Actividad general y ansiedad: campo abierto y laberinto en cruz	90
3.4. Atención y actividad exploratoria: tabla de agujeros	91
3.5. Aprendizaje y memoria espacial: laberinto acuático de Morris y test de condicionamiento del miedo	92
3.6. Análisis estadístico de los resultados	97
4. ESTUDIO DE LA LTP HIPOCAMPAL	97
5. CARACTERIZACIÓN NEUROMORFOLÓGICA	100
5.1. Perfusión y preparación de los tejidos	100
5.2. Histología e inmunohistoquímica	101
5.2.1. Tinción de Nissl	101
5.2.2. Tinción con Ioduro de propidio y DAPI	101
5.2.3. Inmunofluorescencia en tejido en suspensión	102
5.2.4. Inmunohistoquímica con peroxidasa en tejido en suspensión	104
5.3. Análisis morfométricos	105
5.3.1. Área de la capa subgranular y volumen del giro dentado del hipocampo	105
5.3.2. Volumen de los núcleos basales colinérgicos	106
5.3.3. Área de la sección del vermis, área foliar, grosor de las capas granular y molecular y longitud de la línea de las células de Purkinje del cerebelo	106
5.4. Recuentos celulares	106
5.4.1. Cuantificación de la densidad precursores neurales en la capa subgranular del hipocampo	107
5.4.2. Estimación de la densidad de progenitores granulares en diferentes estadios en la capa subgranular	107
5.4.3. Valoración de la densidad de neuronas granulares del giro dentado	108
5.4.4. Estudio de la densidad de neuronas colinérgicas en los núcleos basales	109

5.4.5. Estimación de neuronas granulares del cerebelo	109
5.4.6. Cuantificación de la densidad de células de Purkinje en el cerebelo	110
5.5. Niveles de excitación e inhibición sináptica en el hipocampo	110
5.6. Análisis estadístico de los resultados	110
6. INMUNODETECCIÓN DE <i>Dyrk1A</i> y App	111
7. INMUNODETECCIÓN DEL PÉPTIDO A β 42.....	113
RESULTADOS	117
1. NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>Dyrk1A</i> SEGÚN SU DOSIS GÉNICA.....	117
2. INFLUENCIA DE LA DOSIS GÉNICA DE <i>Dyrk1A</i> SOBRE LA VIABILIDAD Y EL FENOTIPO ANATÓMICO GENERAL	118
3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DOSIS DE <i>Dyrk1A</i> SOBRE LA COGNICIÓN	119
3.1. Prueba del condicionamiento del miedo.....	120
3.2. Laberinto acuático de Morris.....	121
4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DOSIS GÉNICA DE <i>Dyrk1A</i> SOBRE LA CAPACIDAD DE ATENCIÓN Y LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA: TABLA DE AGUJEROS	128
5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DOSIS GÉNICA DE <i>Dyrk1A</i> SOBRE LA ACTIVIDAD GENERAL Y LA ANSIEDAD.....	130
5.1. Campo abierto	130
5.2. Laberinto en cruz.....	132
6. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DOSIS GÉNICA DE <i>Dyrk1A</i> SOBRE LOS REFLEJOS SENSORIALES, LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA Y LA COORDINACIÓN MOTORA	134
7. EFECTO DE LA DOSIS DE <i>Dyrk1A</i> SOBRE LA PLASTICIDAD SINÁPTICA DEL HIPOCAMPO	138
8. INFLUENCIA DE LA DOSIS GÉNICA DE <i>Dyrk1A</i> EN EL FENOTIPO MORFOLÓGICO E HISTOLÓGICO HIPOCAMPAL	140
8.1. <i>Dyrk1A</i> y el fenotipo anatómico hipocampal	140
8.2. <i>Dyrk1A</i> y neurogénesis hipocampal adulta.....	140
8.2.1. Proliferación de progenitores neurales en la SGZ del hipocampo.....	140
8.2.2. Diferenciación celular temprana en la SGZ del hipocampo	143
8.2.3. Densidad celular en el DG del hipocampo	145
8.2.4. Influencia de la dosis de <i>Dyrk1A</i> en el balance excitador-inhibidor del DG.....	147
9. CONTRIBUCIÓN DE LA DOSIS GÉNICA DE <i>Dyrk1A</i> AL FENOTIPO CEREBELAR.....	149
9.1. Análisis histológico del cerebelo	149
9.2. Densidad de neuronas granulares	152
9.3. Densidad de las células de Purkinje	153
10. INFLUENCIA DE <i>Dyrk1A</i> EN EL PROCESO NEURODEGENERATIVO ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO	154

10.1. <i>Dyrk1A</i> y la degeneración de los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal	154
10.2. Estudio de la influencia de <i>Dyrk1A</i> sobre la expresión de App	156
10.3. Papel de <i>Dyrk1A</i> en la acumulación del péptido amiloide A β 42	158
DISCUSIÓN	165
1. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN LA COGNICIÓN	165
2. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN LA ACTIVIDAD EXPLORATORIA Y LA CAPACIDAD DE ATENCIÓN	170
3. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN LA ACTIVIDAD GENERAL Y LA ANSIEDAD	171
4. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN LOS REFLEJOS SENSORIALES, LAS HABILIDADES MOTORAS Y LA COORDINACIÓN MOTORA	174
5. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN LA PLASTICIDAD SINÁPTICA DEL HIPOCAMPO	176
6. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN EL FENOTIPO MORFOLÓGICO HIPOCAMPAL Y LA NEUROGÉNESIS	177
7. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN EL BALANCE EXCITADOR/INHIBIDOR DEL HIPOCAMPO	182
8. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN EL FENOTIPO CEREBELAR	184
9. PAPEL DE <i>Dyrk1A</i> EN EL PROCESO NEURODEGENERATIVO ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO	188
10. REFLEXIÓN FINAL	192
CONCLUSIONES	195
BIBLIOGRAFÍA	199

Abreviaturas

Aβ: β-amiloide (Amyloid-β)

AICD: Dominio intracelular de APP (APP Intracellular Domain)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ApoB: Apolipoproteína B

Arip 4: Androgen Receptor Interacting Protein 4

ASF: Factor de splicing alternativo (Alternative Splicing Factor)

App: Proteína precursora del amiloide (Amyloid Precursor Protein)

AAV2/1-shDyrk1A: Vector viral que contiene shRNA inhibidor de Dyrk1A

BAC: Cromosoma artificial de bacteria (Bacterial Artificial Chromosome)

BACE1: β-secretasa 1 (Beta-secretase 1)

BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor)

BFCNs: Neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal (Basal Forebrain Cholinergic Neurons)

CFC: Prueba del condicionamiento del miedo (Contextual Fear Conditioning)

ChaT: Colinoacetiltransferasa (Choline acetyltransferase)

CLR: Calretinina

CI: Coeficiente Intelectual

CO: Euploide

CREB: cAMP Response Element-Binding

CTFα: Fragmento C-terminal α (C-Terminal Fragment α)

DAB: 3,3' Diaminobenzidina

DCX: Doblecortina

Dde I: Desulfovibrio desulfuricans enzime I

DG: Giro dentado (Dentate Gyrus)

DSCR: Región Crítica del Síndrome de Down (Down Syndrome Critical Region)

DSCR1: Down Syndrome Critical Region 1

DYRK1A: Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1A

EA: Enfermedad de Alzheimer

E2F1: E2F factor de transcripción 1(E2F Transcription Factor 1)

EGCG: Galato de epigallocatequina (Epigallocatechin Gallate)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)

Abreviaturas

EGL: Capa granular externa (External Granular Layer)

eIF2Bε: Ekaryotic Initiation Factor 2Bepsilon

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzime-Linked ImmunoSorbent Assay)

fEPSPs: Potenciales excitatorios postsinápticos evocados (field Excitatory Postsynaptic Potentials)

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)

FKHR: Forkhead

GAD65/67: Descarboxilasa de ácido glutámico (Glutamic Acid Decarboxylase 65/67)

GL: Capa granular (Granular Layer)

GCL: Capa de células granulares (Granular Cell Layer)

HDB: Banda diagonal de Broca horizontal (Horizontal Diagonal band of Broca)

Hip 1: Huntingtin Interactin protein 1

HSA21: Cromosoma 21 humano (Homo sapiens 21)

IP: Ioduro de Propidio

iPSCs: Células madre pluripotentes inducidas (induced Pluripotent Stem Cells)

LCR: Líquido Cefaloraquideo

LTD: Depresión a largo plazo (Long-Term Depression)

LTP: Potenciación a largo plazo (Long-Term Potentiation)

MR: Medidas Repetidas

mRNA: RNA mensajero

miRNA: micro RNA

ML: Capa molecular (Molecular Layer)

MMU16: Cromosoma 16 murino (Mus Musculus 16)

Mnb: gen Minibrain

MSN: Núcleo septal medial (Medial Septal Nucleus)

Mx1: Proteína de resistencia a Mixovirus 1

NDS: Suero normal de burro (Normal Donkey Serum)

NFATc1: Nuclear Factor of Activated T-cells cytoplasmic 1

NGF: Factor de crecimiento nervioso (Nerve Growth Factor)

NLS: Señales de localización nuclear (Nuclear Localization Signal)

OLIG1: Oligodendrocyte transcription factor 1

OLIG2: *Oligodendrocyte transcription factor 2*

PAC: Cromosoma artificial del bacteriófago P1 (*P1 bacteriophage Artificial Chromosome*)

PEST: Dominio rico en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T)

PL: Capa de las células de Purkinje (*Purkinje Layer*)

PVDF: Polivinilidenodifluoruro

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RCAN1: *Regulator of Calcineurin 1*

Rd: Mutación recesiva del gen *Pdeb* (*Retinal degeneration*)

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

r.p.m.: Revoluciones por minuto

SD: Síndrome de Down

SF3b: *Splicing Factor 3b*

SGZ: Zona subgranular (*Subgranular Zone*)

Shh: Sonic hedgehog

shRNA: *short hairpin RNA*

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD1: *Superoxide Dismutase 1*

SPRED: *Sprouty-related protein EVH1 domain*

STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

SVZ: Zona subventricular (*Subventricular Zone*)

TBS: *Theta Burst Stimulation*

TS: Ts65Dn

VDB: Banda diagonal de Broca vertical (*Vertical Diagonal band of Broca*)

VGLUT1: Transportador vesicular de glutamato 1 (*Vesicular Glutamate Transporter 1*)

VZ: Zona ventricular (*Ventricular zone*)

YAC: Cromosoma artificial de levadura (*Yeast Artificial Chromosome*)

Introducción

1. El Síndrome de Down

El Síndrome de Down (SD), la aneuploidía autosómica humana compatible con la vida más común, tiene como origen la presencia de una copia extra, completa o parcial, del cromosoma 21 humano (*Homo sapiens* 21, HSA21). Esta aneuploidía afecta a 1 de cada 850-1000 nacimientos (Shin *et al.*, 2009) y se trata de la causa más habitual de discapacidad intelectual congénita.

El fenotipo de este síndrome es muy variable. Si bien hay ciertos rasgos de gran penetrancia que afectan a todos los individuos con SD como el deterioro cognitivo, las alteraciones motoras, la hipotonía muscular, las dismorfologías físicas o las neuropatologías asociadas a la enfermedad de Alzheimer (EA) entre otros, la mayoría de las alteraciones que conforman este síndrome no son constantes en todos los afectados y además presentan una penetrancia variable. Así, además de los previamente mencionados, esta aneuploidía da lugar, en algunos individuos, a hasta 300 rasgos clínicos entre los que destacan el incremento del riesgo de padecer alteraciones congénitas del aparato digestivo (ano imperforado, atresia duodenal), cardíacas, de los sistemas inmune y endocrino (leucemia, hipotiroidismo, diabetes) y alteraciones esqueléticas como el retraso en el crecimiento, la braquicefalia y la alteración de las extremidades (manos cortas y anchas y dermatoglifos característicos). Se trata, por tanto, de una compleja condición genética.

1.1 Origen de la Trisomía 21

Aproximadamente en el 95% de los casos, el SD es el resultado de una trisomía completa del HSA21 uniforme en todas las células del organismo, consecuencia de una no disyunción meiótica de origen habitualmente materno. En el 4% de los casos el SD tiene como origen una trisomía parcial debido a translocaciones, bien robertsonianas, bien recíprocas. En el 1% restante, la no disyunción se produce en las primeras divisiones embrionarias dando lugar a mosaicismo, en el que un porcentaje variable de células del individuo es aneuploide y el resto euploide.

1.2 Alteraciones cognitivas en el SD

La discapacidad intelectual asociada al SD se caracteriza por el retraso del desarrollo psicomotor, alteraciones del aprendizaje, la memoria y el lenguaje, defectos cognitivos en el procesamiento auditivo-verbal y por problemas adaptativos a la vida cotidiana (Lott y Dierssen, 2010).

Los estudios psicométricos atribuyen a las personas con SD un coeficiente intelectual (CI) entorno a 50, aunque el rango de variabilidad oscila de 30 a 70 (Vicari, 2006). Además, su CI va disminuyendo con la edad, empezando a declinar durante la adolescencia. Para comprender mejor la disfunción intelectual asociada al SD a continuación se describirán los principales procesos de aprendizaje y memoria afectados.

La **memoria implícita** es un tipo de memoria en la que las experiencias previas ayudan en la ejecución de una tarea sin que exista una percepción consciente de la existencia de esas experiencias. Este tipo de proceso cognitivo requiere poca atención, pues opera de forma automática. Por otro lado, la **memoria explícita o declarativa** supone la capacidad de aprender intencional y conscientemente y requiere la codificación de la información adquirida, estrategias de recuperación de la misma y un alto grado de atención (Bartesaghi *et al.*, 2011; Dierssen, 2012). Ambos tipos de memorias, implícita y declarativa, conforman la denominada **memoria a largo plazo**. Las personas con SD presentan una capacidad de aprendizaje normal para tareas que requieren la memoria implícita; sin embargo, muestran un deterioro acusado en su memoria explícita, con una pobre codificación de la información, una capacidad de recuperación deteriorada y déficits de atención (Carlesimo *et al.*, 1997; Vicari *et al.*, 2000).

La **memoria de trabajo** es la capacidad de almacenar temporalmente la información reciente y mantenerla disponible para su uso. Se trata, por tanto, de un proceso fundamental en la ejecución de tareas cognitivas que requieren la recuperación y manipulación de la información durante cortos periodos de tiempo. Está, además, íntimamente relacionada con la memoria a largo plazo, pues la consolidación de la memoria de trabajo es una de los mecanismos que dan lugar al almacenamiento permanente de la información. Numerosos estudios han documentado que las

personas con SD presentan un deterioro de la memoria de trabajo (Vicari, 2006). Sin embargo, este deterioro no es uniforme ya que afecta en mayor medida a unas destrezas que a otras: mientras que la memoria verbal a corto plazo está alterada (Lemons y Fuchs, 2010), está relativamente preservada cuando se trata de recordar información visuo-espacial (Nash y Heath, 2011). Además, las personas con SD presentan deficiencias en la ejecución de las pruebas de memoria de trabajo espacial cuando la información es presentada de manera simultánea, mientras que ejecutan con éxito las tareas relacionadas con esta habilidad cuando la información es presentada de manera secuencial (Lanfranchi *et al.*, 2012).

Uno de los ámbitos en el que más llamativas son las alteraciones en la memoria de trabajo de la población SD son el lenguaje y el desarrollo del vocabulario. Durante el desarrollo de las habilidades lingüísticas en la infancia, los niños con SD tienen un periodo de errores fonológicos e inteligibilidad más extenso de lo habitual, ya que tienen dificultades a la hora de adquirir y retener palabras nuevas. En la edad adulta suelen presentar un léxico escaso y una sintaxis expresiva deficiente, aunque la comprensión del lenguaje está menos afectada (Chapman y Hesketh, 2000; Dykens *et al.*, 1994; Vicari, 2006). Muestran, además, problemas en la capacidad lectora, tanto en la interpretación verbal como en la memoria lingüística a corto plazo (Lemons y Fuchs, 2010; Nash y Heath, 2011). En conjunto, estas alteraciones dificultan su capacidad para comunicarse.

La **flexibilidad cognitiva** es la capacidad de reestructurar espontáneamente el conocimiento previamente adquirido de formas variadas para dar una respuesta adaptada a las exigencias que plantean situaciones cambiantes. Una mala flexibilidad cognitiva supone reproducir esquemas rígidos de forma automática, lo que da lugar a procedimientos ineficaces. Por lo tanto, esta habilidad es fundamental en el proceso de aprendizaje y la resolución de problemas. Algunos estudios han evaluado la flexibilidad cognitiva de las personas con SD mediante el análisis de sus aptitudes verbales (Campbell *et al.*, 2013; Zelazo *et al.*, 1996), concluyendo que tanto niños como adultos presentan un deterioro de esta función.

Además, algunos individuos con SD también muestran distintos trastornos neuroconductuales como el aumento de la actividad motora e impulsividad, la

agitación, el mayor riesgo de padecer el trastorno de déficit de atención e hiperactividad o los movimientos repetitivos (Capone *et al.*, 2006). En consecuencia, suelen presentar problemas de concentración, lo que tiene un importante papel en el menor rendimiento en las distintas destrezas cognitivas (Cornish y Wilding, 2010; Ekstein *et al.*, 2011).

La **función ejecutiva** es el conjunto de habilidades que permiten la regulación y el control de los procesos cognitivos (Elliott, 2003) incluyendo la memoria de trabajo, la flexibilidad cognitiva, el razonamiento, la autorregulación de las tareas y la resolución de problemas así como la formación de planes y programas y la ejecución de los mismos (Chan *et al.*, 2008). Por lo tanto, las distintas alteraciones cognitivas mencionadas darían lugar a un déficit generalizado de la función ejecutiva de las personas con SD (Porter *et al.*, 2007).

1.3 Alteraciones motoras en el SD

Como ya se mencionó anteriormente, las alteraciones del fenotipo motor son un rasgo constante en el SD. Estas alteraciones tienen una gran repercusión en la vida de las personas con SD ya que no sólo dificultan diversas exigencias diarias, sino que también perjudican indirectamente los procesos de aprendizaje y memoria. Durante la infancia esta población presenta una adquisición de las habilidades motoras tardía e incompleta lo que, en parte, es debida a la hipotonía muscular y laxitud de los ligamentos motores (Pereira *et al.*, 2013; Tudella *et al.*, 2011). Durante la edad adulta los individuos con SD también muestran alteraciones de la motricidad gruesa (brazos y piernas) (McKay y Angulo-Barroso, 2006; Nishizawa *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2013) y fina (coordinación ojo-mano) (de Campos *et al.*, 2013; de Campos *et al.*, 2011). Además, en muchos casos, presentan lentitud en sus movimientos y mala coordinación (Galli *et al.*, 2010).

1.4 Relación entre los déficits cognitivo-conductuales y las regiones encefálicas afectadas en el SD

Todas las alteraciones cognitivo-conductuales encontradas en el SD tienen como origen anomalías estructurales y funcionales presentes en el sistema nervioso central (SNC). A nivel macroscópico, las regiones cerebrales más afectadas son la frontal,

parietal y temporal, siendo en esta última la estructura más afectada el hipocampo. En contraste, otras estructuras parecen no estar afectadas en estadios tempranos, como la amígdala o los ganglios basales (Lott y Dierssen, 2010). Por otro lado, el cerebelo también presenta una marcada reducción de tamaño en las personas con SD (Aylward *et al.*, 1997).

Existe una correlación entre las alteraciones estructurales y cognitivo-conductuales características del SD. Por ejemplo, el lóbulo temporal, especialmente el hipocampo, tiene un papel fundamental en la memoria explícita (Eichenbaum, 1999; Ofen *et al.*, 2007). El hipocampo está implicado en los procesos de memoria espacial, el aprendizaje en general y los procesos de consolidación y almacenamiento de la información (Eichenbaum, 2001). Aunque no sirve de almacén de recuerdos, el hipocampo cumple la función de establecer asociaciones o enlaces entre los recuerdos de forma que puedan estar disponibles para acceder a ellos de forma consciente; es decir, una especie de "índice" de recuerdos. Por otro lado, la corteza prefrontal juega un papel importante en el procesamiento de la información, relacionándola y dotándola de significado, es decir, consolidando la función ejecutiva (Ofen *et al.*, 2007). Por lo tanto, está involucrada en la planificación de comportamientos cognitivamente complejos, en la expresión de la personalidad, en los procesos de toma de decisiones y en la adecuación del comportamiento social apropiado en cada momento. Tanto niños como adultos con SD presentan un deterioro grave en la realización de tareas dependientes de la función hipocampal o de la corteza prefrontal respectivamente (Nadel, 2003).

Por otro lado, tradicionalmente se ha atribuido al cerebelo un papel clave en la regulación del control propioceptivo-motor y del aprendizaje motor (Fine *et al.*, 2002). Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que esta estructura es necesaria para la correcta realización de distintos procesos cognitivos como la atención, la memoria espacial, la flexibilidad cognitiva y la función ejecutiva (Schmahmann, 2004; Teipel *et al.*, 2004). Por lo tanto, las anomalías neuromorfológicas encontradas en el cerebelo de las personas con SD podrían tener también un papel en los distintos fenotipos cognitivos alterados.

1.5 Neurobiología de las alteraciones cognitivo-conductuales del SD

Se considera que la causa principal de la reducción del tamaño cerebral encontrada en el SD es la hipoplasia generalizada. Esta hipocelularidad se debe principalmente a que los procesos de neurogénesis son deficitarios desde etapas tempranas del desarrollo. Además, en etapas más avanzadas de la vida de las personas con SD tiene lugar un aumento de la muerte celular, lo que también agrava la hipocelularidad encontrada desde etapas prenatales.

La proliferación celular está profundamente comprometida en el cerebro de fetos con SD, especialmente en el giro dentado (*Dentate Gyrus*, DG) del hipocampo y en el ventrículo lateral (Guidi *et al.*, 2008) y a nivel cerebelar en la capa granular externa (*External Granular Layer*, EGL) y en la zona ventricular (*Ventricular Zone*, VZ) (Guidi *et al.*, 2011). Esta reducción en la neurogénesis parece ser debida tanto a anomalías en la proliferación de precursores neurales, ya que existe una desaceleración del ciclo celular que ralentiza la división de los progenitores, como a defectos en la diferenciación que tienen como resultado una disminución en el número final de neuronas (Bahn *et al.*, 2002; Contestabile *et al.*, 2007; Esposito *et al.*, 2008; Rueda *et al.*, 2012).

Aunque la reducción en el número de neuronas encontradas en los cerebros de las personas con SD también podría ser debido a un incremento en muerte celular por apoptosis, cuya función fisiológica es la de regular el número de células producidas, este mecanismo no parece ser el responsable de la reducción en el volumen cerebral en estadios tempranos (Rueda *et al.*, 2013).

La acusada hipocelularidad en distintas áreas del SNC de las personas con SD está acompañada de alteraciones en la sinaptogénesis y la conectividad, siendo sus circuitos cerebrales mucho más pobres que los de los individuos normales. Además, la propia funcionalidad celular también está comprometida debido en parte a la reducción del tamaño del árbol dendrítico y la densidad de espinas, así como a las alteraciones en la morfología de estas últimas (Kasai *et al.*, 2003; Newpher y Ehlers, 2009).

La patología dendrítica comienza a originarse en la infancia, progresando y agravándose a medida que las personas con SD avanzan hacia la edad adulta, y termina especialmente afectada una vez comienzan a aparecer las neuropatologías típicas de la EA (Ferrer y Gullotta, 1990; Takashima *et al.*, 1989). Las neuronas de la corteza motora (Marin-Padilla, 1976; Prinz *et al.*, 1997), la corteza visual (Becker *et al.*, 1986; Takashima *et al.*, 1981) y la corteza parietal (Schulz y Scholz, 1992) presentan este patrón alterado, aunque también existen regiones que permanecen intactas como la prefrontal (Vuksic *et al.*, 2002).

En conjunto, la hipocelularidad y la hipotrofia dendrítica producen un marcado deterioro del número y la eficacia de las sinapsis de los cerebros SD que da lugar a la pérdida de neuroplasticidad cerebral, proceso esencial que subyace al aprendizaje y la memoria (Koo *et al.*, 1992; Wisniewski y Rabe, 1986; Wisniewski y Schmidt-Sidor, 1989).

A su vez, el defecto neuroplástico se ve agravado por anomalías en distintos sistemas de neurotransmisión, encontrándose alteraciones tanto en los niveles de diversos neurotransmisores, como en la expresión y la función de sus respectivos receptores. En personas con SD desde etapas fetales se han descrito alteraciones en el sistema colinérgico, GABAérgico, glutamatérgico, serotoninérgico y noradrenérgico (Godridge *et al.*, 1987; Risser *et al.*, 1997; Whittle *et al.*, 2007; Bartesaghi *et al.*, 2011).

Por otro lado, diversas neurotrofinas, entre las que está el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), se encuentran disminuidas en el cerebro de las personas con SD tanto en el hipocampo como en la corteza (Toiber *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta el papel de las mismas en la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la migración celular, su déficit probablemente contribuye a las alteraciones en la neurogénesis y plasticidad neuronal encontrada en el SD (Campenot y MacInnis, 2004; Chao *et al.*, 2006).

En resumen, la consecuencia funcional de todas las alteraciones neurobiológicas descritas es una conectividad cerebral anormal y un limitado procesamiento de la información, lo que da lugar a la disfunción cognitiva y conductual encontrada en las personas con SD.

1.6 El proceso neurodegenerativo asociado al SD

El 100 % de las personas con SD presentan a la edad de 40 años una neuropatología idéntica a la encontrada en la EA. Sin embargo, sólo entre un 50-70% de los individuos con SD desarrollan la demencia típica de la EA, que se caracteriza por un deterioro progresivo de las capacidades cognitivas y funcionales que implica a la memoria y el lenguaje, causando un grave deterioro en el desempeño de las actividades diarias en las personas afectadas (Zigman y Lott, 2007).

Al igual que ocurre en la EA, a medida que avanzan en edad, las personas con SD comienzan a manifestar neuropatologías como la atrofia cerebral (fundamentalmente del lóbulo temporal medio, el cuerpo calloso y algunas áreas corticales) (Teipel *et al.*, 2003), la disminución de la densidad celular en los núcleos basales y la reducción del número de espinas y su atrofia en las neuronas del hipocampo y la corteza (Dierssen *et al.*, 2009; Ferrer y Gullotta, 1990; Suetsugu y Mehraein, 1980).

Además, tanto en la EA como en el SD aparecen lesiones características denominadas placas seniles y ovillos neurofibrilares que conducen a la pérdida sináptica y a la degeneración neuronal. Las placas seniles son depósitos extracelulares constituidos por el péptido β -amiloide (Amyloid- β , A β) que procede de la proteólisis de la proteína precursora del amiloide (Amyloid Precursor Protein, APP) llevada a cabo por diversas secretasas (figura 1). Estos acúmulos neurotóxicos están constituidos esencialmente por los péptidos insolubles A β 40 y A β 42. Dado que el gen APP se encuentra situado en el HSA21, su sobreexpresión probablemente conduce al acúmulo excesivo de A β en el SD (Rumble *et al.*, 1989; Wilcock y Griffin, 2013). Por su parte, los ovillos neurofibrilares son agregados de la proteína Tau hiperfosforilada, una proteína que en condiciones normales está asociada a los microtúbulos y permite el transporte vesicular a través del axón, pero que en condiciones patológicas produce lesiones intracelulares. Esta alteración, a pesar de ser una constante en ambas patologías, presenta un patrón de fosforilación distinto en cada una.

Las placas seniles y los ovillos neurofibrilares no aparecen simultáneamente en las personas con SD. Si bien la presencia de A β se eleva precozmente, incluso durante la infancia (Leverenz y Raskind, 1998), su acúmulo se incrementa marcadamente a partir

de los 30 años, que es cuando empiezan a aparecer los ovillos neurofibrilares (Wisniewski *et al.*, 1985).

La hipótesis de la cascada amiloide (Hardy, 2002) propone que la acumulación progresiva de A β desde edades tempranas genera un ambiente altamente tóxico para los tejidos adyacentes que daría lugar a lesiones que incrementarían el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, lo que retroalimentaría la patología generándose más lesiones y potenciando la muerte neuronal y el deterioro cognitivo (Wilcock y Griffin, 2013). Los sistemas colinérgico y noradrenérgico son especialmente vulnerables a esta situación (Coyle *et al.*, 1986) tanto en la EA como en el SD. Dado que las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal conforman las principales inervaciones colinérgicas del hipocampo y la corteza, su pérdida funcional parece estar implicada en el deterioro de la memoria explícita y la atención observado en el SD (Kishnani *et al.*, 1999). Varios estudios han demostrado una disminución dependiente de la edad en el número de neuronas colinérgicas en los cerebros de personas con SD (Godridge *et al.*, 1987; Risser *et al.*, 1997), probablemente correlacionándose con el acúmulo de las placas difusas.

El hecho de que todas las personas con SD presenten alteraciones neuropatológicas como las descritas hasta ahora, pero que entre un 30 y un 50 % de ellos nunca lleguen a presentar signos de demencia (Devenny *et al.*, 1996; Schupf *et al.*, 2003; Schupf y Sergievsky, 2002; Schupf *et al.*, 2006) sugiere que distintos factores genéticos, epigenéticos, hormonales y ambientales también podrían tener un papel en la no aparición de demencia (Schupf y Sergievsky, 2002).

Por otro lado, en muchas personas con SD también se produce el acúmulo cerebral de α -sinucleína en forma de Cuerpos de Lewy paralelamente al desarrollo de la patología de tipo EA (Lippa *et al.*, 1999). Los agregados fibrilares que forma esta proteína en el citoplasma celular producen lesiones en las neuronas y en la glía y desencadenan procesos neurodegenerativos comunes a los encontrados en la enfermedad de Parkinson, la demencia con Cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica, que agravan los procesos patológicos previamente descritos.

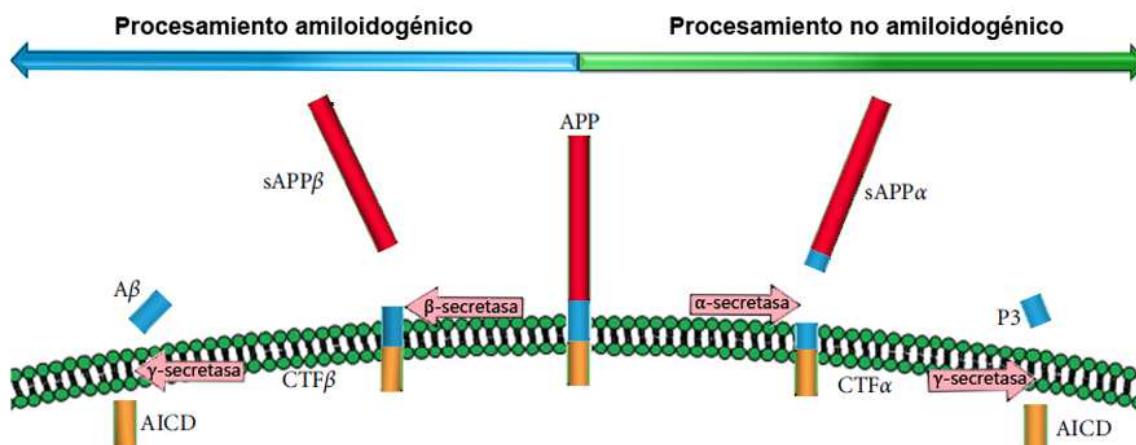


Figura 1. Procesamiento celular del APP. (Adaptado de Webb y Murphy, 2012) La proteína precursora del amiloide puede ser procesada por una vía amiloidogénica (izquierda) o una vía canónica (derecha). El procesamiento canónico por la α-secretasa tiene como resultado la secreción de un fragmento extracelular largo, denominado sAPP. Es importante destacar que la escisión del fragmento se produce dentro del fragmento de péptido Aβ (azul claro), lo que previene su formación. A continuación, el fragmento C-terminal unido a la membrana, denominado CTFα (*C-Terminal Fragment α*), es sustrato de la γ-secretasa. Esta escisión se produce dentro de la membrana, liberando el péptido extracelular corto P3 y un dominio intracelular de APP (*APP Intracellular Domain*, AICD, naranja). El procesamiento amiloidogénico se produce cuando APP interactúa con la β-secretasa. Se genera entonces el sAPPβ, y un fragmento C-terminal más largo, el CTFβ. La escisión del CTFβ por la γ-secretasa genera Aβ y AICD.

1.7 El cromosoma 21 humano y su aneuploidía: implicaciones genéticas

El HSA21 es el cromosoma humano más pequeño, siendo su densidad de genes relativamente baja. Es precisamente esta condición la que hace que su trisomía sea compatible con la vida a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de aneuploidías humanas (Reeves, 2000). Aunque la composición de su brazo corto aún no se conoce, la secuenciación de su brazo largo reveló que este cromosoma contiene 552 genes de los cuales al menos 242 codifican para proteínas y 142 son pseudogenes (Dierssen, 2012; Hattori *et al.*, 2001).

Aunque está ampliamente admitido que los distintos fenotipos de las personas con SD son el resultado de la presencia de una copia adicional del HSA21, no está tan claro cuáles son los mecanismos moleculares causantes de estas alteraciones. Así, se han propuesto dos hipótesis que tratan de explicar los efectos fenotípicos de esta aneuploidía: la “hipótesis de la amplificación de la inestabilidad del desarrollo” (Pritchard y Kola, 1999; Roizen y Patterson, 2003; Shapiro, 2001) y “la hipótesis de la dosis génica” (Ait Yahya-Graison *et al.*, 2007; Delabar *et al.*, 2006). La primera hipótesis

propone que la trisomía del HSA21 conduce a la alteración de la regulación de la homeostasis del desarrollo, originándose efectos inespecíficos producto de la sobreexpresión de cientos de genes, independientemente de cuáles sean estos en concreto (Shapiro, 1989). La hipótesis de la dosis génica propone que el fenotipo característico del SD es debido a la sobreexpresión de genes concretos y secuencias no codificantes (micro RNAs (miRNAs), secuencias reguladoras, etc.) y a los efectos epistáticos de genes localizados en otros cromosomas (Lyle *et al.*, 2009; Sommer *et al.*, 2008). Ambas teorías no son mutuamente excluyentes. De hecho, se ha llegado a proponer un modelo híbrido que plantea que ciertos genes críticos tienen poco o ningún efecto aislados, pero que ejercen un efecto visible en el fenotipo combinándose con los pequeños efectos de otros muchos genes desregulados (Reeves, 2001).

El hecho de que otras trisomías no generen síndromes similares al encontrado en el SD, lo que descarta efectos inespecíficos, y que además exista una correlación entre genotipo y fenotipo en individuos con trisomías parciales (Korbel *et al.*, 2009; Lyle *et al.*, 2009; Papoulidis *et al.*, 2014), hace que la hipótesis de la dosis génica esté más aceptada. En consecuencia, la búsqueda del origen de las alteraciones fenotípicas encontradas en el SD se ha inclinado principalmente hacia la identificación de genes candidatos en el HSA21 cuya sobreexpresión sea crucial. Para ello se han utilizado dos estrategias: i) el estudio genético de personas con trisomías parciales que presentan los principales rasgos característicos del SD y ii) la construcción de modelos murinos con trisomías parciales de diferentes regiones de cromosomas que contienen genes ortólogos a los encontrados en el HSA21.

A partir de los resultados obtenidos en estos estudios se propuso la existencia de una región génica mínima en el HSA21, denominada Región Crítica del Síndrome de Down (Down Sndrome Critical Region, *DSCR*), que debía estar en trisomía para que se manifestasen los rasgos más importantes del SD (Delabar *et al.*, 1993; Korenberg *et al.*, 1994; Rahmani *et al.*, 1989). Sin embargo, desde hace años existe un intenso debate en torno a la existencia de tal región, ya que existen personas con trisomías parciales de regiones del HSA21 que no incluyen la DSCR pero que presentan rasgos fenotípicos del SD (Lana-Elola *et al.*, 2011; Patterson, 2009). Además, en el estudio de un modelo

murino que sobreexpresa la región ortóloga a la DSCR, el Ts1Rhr (ver apartado 3.1), no se encontraron las alteraciones típicas del SD en el hipocampo (Olson *et al.*, 2007). Actualmente se entiende esta región como una “región de susceptibilidad” que puede verse modificada por otros genes del HSA21 y otros cromosomas del individuo (Lyle *et al.*, 2009). Por lo tanto, los genes que conforman esta región, aproximadamente 30, han recibido mucha atención en numerosos estudios ya que son considerados buenos candidatos a tener un importante papel en los fenotipos comunes encontrados en el SD.

Otra estrategia empleada en la búsqueda de genes candidatos consiste en realizar estudios de expresión diferencial de genes entre células o tejidos euploides y trisómicos, procedentes tanto de muestras humanas (Ait Yahya-Graison *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2005; Prandini *et al.*, 2007) como de modelos murinos de SD (Dauphinot *et al.*, 2005; Kahlem *et al.*, 2004; Lyle *et al.*, 2004; Sultan *et al.*, 2007). Estos estudios demostraron un incremento medio de un 50 % en la expresión en numerosos genes trisómicos respecto a los euploides, tanto del HSA21 como del cromosoma 16 murino (*Mus Musculus 16*, MMU16), que tiene gran homología con el anterior. Sin embargo, la mayoría de los genes presentan variabilidad interindividual en su expresión, tanto en las muestras trisómicas como euploides (Sultan *et al.*, 2007). Estos resultados permitieron establecer tres categorías de genes con diferentes niveles de expresión en relación a los euploides (Ait Yahya-Graison *et al.*, 2007; Patterson, 2009; Prandini *et al.*, 2007; Sultan *et al.*, 2007): i) los que presentan unos niveles de sobreexpresión significativos con respecto a los euploides y poca variabilidad en su expresión. Se ha propuesto que estos genes son buenos candidatos para ser responsables de algunos rasgos fenotípicos comunes presentes en el SD (Gardiner, 2004; Prandini *et al.*, 2007; Sultan *et al.*, 2007); ii) los que presentan cierto solapamiento en sus niveles de expresión con los de los genes euploides. Estos genes podrían ser los responsables de aquellos fenotipos variables presentes en el SD y iii) aquellos genes que presentan unos niveles de expresión indistinguibles de los de los genes euploides. Estos tendrían un efecto modulador o un bajo efecto sobre los distintos fenotipos del SD.

Algunos genes considerados candidatos cuya sobreexpresión podría contribuir al desarrollo de distintas alteraciones anatomofuncionales del SNC son:

1. **SOD1** (*Superoxide Dismutase 1*) responsable de la formación de la superóxido dismutasa, enzima clave en el metabolismo de los radicales libres involucrados en los procesos de estrés oxidativo observados en el SD (Capone *et al.*, 2002; Jovanovic *et al.*, 1998).
2. **APP** que, como ya se mencionó, participa en el desarrollo de la patología de tipo Alzheimer característica del SD, pero cuya sobreexpresión contribuye también en los defectos neurogénicos (Trazzi *et al.*, 2011).
3. **DSCR1** (*Down Sndrome Critical Region 1*)/ **RCAN1** (*Regulator of Calcineurin 1*) que codifica para una proteína inhibidora de la calcineurina implicada en el estrés oxidativo neuronal y la disfunción mitocondrial propia del SD (Porta *et al.*, 2007).
4. **OLIG1** y **OLIG2** (*Oligodendrocyte Transcription Factor 1 y 2*) que codifican para factores de transcripción implicados en la neurogénesis y la oligodendrogénesis (Lu *et al.*, 2002; Takebayashi *et al.*, 2000; Zhou y Anderson, 2002) y en la regulación del número de neuronas inhibitorias durante el desarrollo embrionario en un modelo murino de SD (Chakrabarti *et al.*, 2010).
5. **DYRK1A** (*Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*) que codifica para una proteína serina/treonina quinasa con importantes sustratos y cuya manipulación genética *in vivo* es objeto de estudio en este trabajo, por lo que se profundizará en su descripción en apartados posteriores.

Además del efecto de los genes sobreexpresados, cada fenotipo concreto del SD podría depender de la naturaleza y combinación de diversos alelos. Por otro lado, la interacción entre genes del HSA21 y sus productos con el resto de genes y productos del genoma del individuo también influirán sobre el fenotipo final (Antonarakis y Epstein, 2006; Antonarakis *et al.*, 2004). Es decir, que el efecto de la sobreexpresión de un gen o el nivel de sobreexpresión del mismo puede variar en función del fondo genético del individuo.

Además, las alteraciones fenotípicas no sólo dependen de genes codificantes para proteínas como los descritos, sino que también son de vital importancia los mecanismos reguladores a nivel transcripcional o post-transcripcional de los mismos, por lo que recientemente ha cobrado gran relevancia el estudio de elementos no

codificantes como los factores de transcripción o múltiples factores epigenéticos (Sanchez-Mut *et al.*, 2012).

Actualmente se sabe que el HSA21 alberga cinco miRNAs: miR-99a, let-7c, el miR-125b-2, miR-155 y miR-802 (Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Estos pequeños RNAs no codificantes juegan un importante papel como reguladores negativos post-transcripcionales de la expresión génica, uniéndose a RNAs mensajeros (mRNA) y reprimiendo su traducción y/o degradándolos (He *et al.*, 2013). Así pues, la sobreexpresión de estos miRNAs podría conducir a la disminución en la expresión de ciertas proteínas en personas con SD y por tanto tener un importante papel en diversos fenotipos (Elton *et al.*, 2010; Keck-Wherley *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Siew *et al.*, 2013).

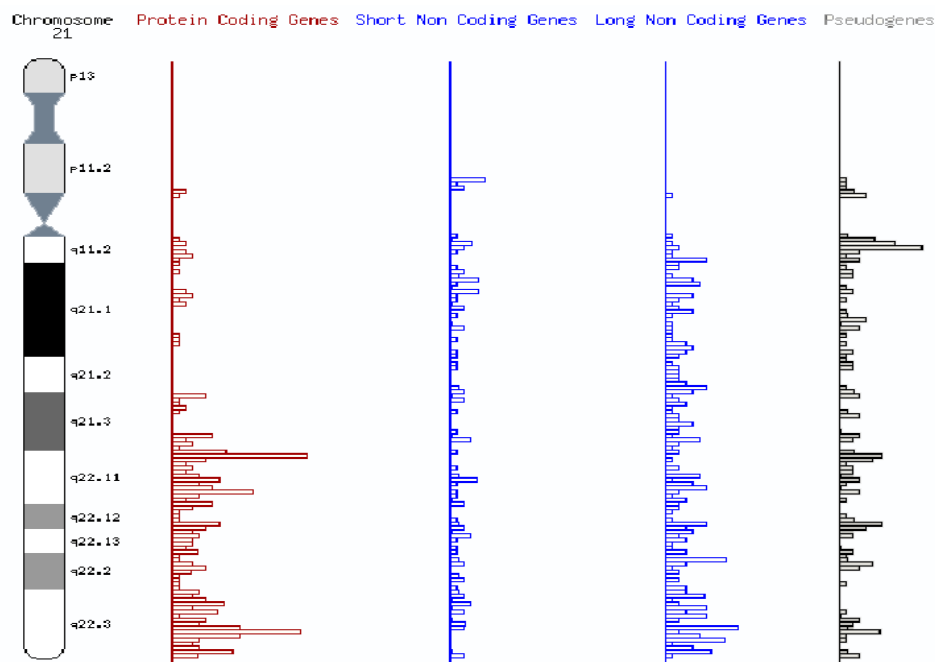


Figura 2. Esquema de la estructura del cromosoma 21 humano. Fuente: www.emsembl.org

2. *DYRK1A*, un gen candidato para el SD

Numerosos estudios apoyan el papel del gen *DYRK1A* en distintas alteraciones fenotípicas del SD, en especial los procesos cognitivos. Su localización en la DSCR, su distribución en el SNC, su dilatada interacción con la maquinaria celular y su influencia en eventos neuromorfológicos y funcionales que participan en los procesos cognitivo-conductuales, hacen que en la búsqueda de las bases patogénicas del SD, el estudio de este gen y las consecuencias de su desregulación suscite especial interés.

2.1 El gen

El gen *DYRK1A* se encuentra localizado en la región q22.13 del HSA21, formando parte de la ya descrita DSCR. Su secuencia se extiende a lo largo de 150 kb, y contiene 17 exones que codifican para un transcrito mayoritario que origina una proteína de 763 aminoácidos que por *splicing* alternativo da lugar a otra isoforma de 754 aminoácidos que no difiere funcionalmente de la primera.

2.2 La proteína

La proteína *DYRK1A*, de aproximadamente 90 KDa, forma parte de la familia *DYRK*, una familia evolutivamente muy conservada de proteínas eucariotas que se caracteriza por su actividad quinasa y su especificidad dual, ya que estas proteínas catalizan la fosforilación de residuos de serina y treonina en sus sustratos. Además, todas estas proteínas comparten cerca del dominio catalítico un motivo especialmente rico en residuos ácidos conocido como “*DYRK* homology (DH)-box”, posiblemente relacionado con la estructura terciaria de la proteína (Becker y Joost, 1999; Himpel *et al.*, 2001). El dominio quinasa de *DYRK1A* se encuentra en el centro de la estructura primaria de la proteína e incluye un motivo con 4 leucinas que podría estar implicado en la interacción de la proteína con ADN o con otras proteínas. Además, posee una región de poli-histidina que participa en su translocación al núcleo y dos señales de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS), una situada en el N-terminal y otra dentro del propio dominio catalítico (Alvarez *et al.*, 2003), lo que revela que tiene tanto actividad citoplasmática como nuclear, tal y como se describe en el apartado 2.4. En su región carboxiterminal presenta un región rica en serinas y treoninas y un

dominio rico en prolina, glutámico, serina y treonina (PEST), típicamente asociado al control de la estabilización proteica y su degradación (Rechsteiner y Rogers, 1996).

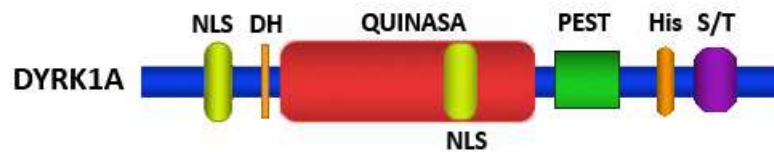


Figura 3. Representación esquemática de la proteína DYRK1A. (Adaptado de Arbonés y De la Luna, Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2011) NLS: señal de localización nuclear, DH: DYRK homology (DH)-box, His: región de poli-histidina, S/T: región rica en serinas y treoninas.

2.3 Activación y regulación

Para completar su activación, DYRK1A previamente debe autofosforilarse en el residuo tirosina Y321; sólo entonces podrá comenzar a fosforilar residuos de treonina o serina en sus sustratos (Becker y Sippl, 2011). Esta capacidad de auto-fosforilación es independiente de otros dominios y de la presencia de cofactores y se pierde cuando la proteína está completamente traducida (Lochhead *et al.*, 2005). Sin embargo, la regulación de la proteína y su actividad no se ejerce a través de este mecanismo de activación, sino que parece depender de cambios en los niveles de su expresión génica y modificaciones en su mRNA, teniendo lugar importantes consecuencias fenotípicas a partir de pequeñas variaciones en su concentración (Dierssen y de Lagrán, 2006; Kurabayashi *et al.*, 2010; Maenz *et al.*, 2008; Moller *et al.*, 2008).

La acumulación de DYRK1A depende de distintos elementos reguladores, tanto positivos como negativos entre los que se encuentran la proteína activadora 4, el A β , E2F1 (*E2F transcription factor 1*) o NFATc1 (*Nuclear Factor of Activated T-cells cytoplasmic 1*). Existe además un mecanismo adicional de control sobre su actividad mediante la interacción de DYRK1A con otras proteínas. Tal es el caso de la proteína 14-3-3 β , que es capaz de duplicar su actividad catalítica mediante su unión a un residuo de serina auto-fosforilado en el dominio C-terminal de DYRK1A (Alvarez *et al.*, 2007); o las proteínas SPRED (*Sprouty-related protein EVH1 domain*), que interaccionan con el dominio catalítico de DYRK1A e inhiben su fosforilación (Li *et al.*, 2010).

2.4 Localización subcelular

DYRK1A es una quinasa con un amplio rango de distribución celular. Son muchos los sustratos descritos a nivel nuclear y citosólico para esta proteína (ver tabla 1) lo que sugiere una extensa participación en numerosos procesos fisiológicos y patológicos.

En el cerebro de ratón, Dyrk1A está presente en el núcleo y el citoplasma de neuronas y células gliales (Hammerle *et al.*, 2008; Marti *et al.*, 2003). En el pollo se ha descrito un cambio de localización de Dyrk1A del núcleo al citoplasma durante la diferenciación de las células de Purkinje (Hämmerle *et al.*, 2003). También se ha encontrado esta doble localización subcelular en neuronas humanas, aunque en astrocitos y células vasculares sólo se ha encontrado a nivel citoplasmático (Wegiel *et al.*, 2004). Es decir, que según la naturaleza celular y la estructura anatómica, DYRK1A ejercería distinto papel funcional.

A nivel neuronal, su localización nuclear se relaciona con la capacidad de fosforilar diferentes factores de transcripción y por tanto regular su actividad; entre ellos CREB (*cAMP Response Element-Binding*) y NFATc, ambos muy vinculados a procesos cognitivos (Arron *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001), o factores de *splicing*, como la subunidad SAP155 del SF3b (*Splicing Factor 3b*) y ASF (*Alternative Splicing Factor*) (de Graaf *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008). A nivel citoplasmático, DYRK1A se encuentra localizado en el soma neuronal y las dendritas. Tanto en humanos como en ratones, la mayor parte de la proteína se encuentra asociada al citoesqueleto (Kaczmarek *et al.*, 2014), participando en la migración, la diferenciación y la maduración de las células progenitoras neuronales (Mazur-Kolecka *et al.*, 2012), en la morfogénesis neuronal (Martinez de Lagran *et al.*, 2012), en el crecimiento y la diferenciación del árbol dendrítico (Hammerle *et al.*, 2003) o en el reciclaje de vesículas y la transmisión sináptica (Chen-Hwang *et al.*, 2002; Wegiel *et al.*, 2004); todos estos procesos están alterados en el SD.

DYRK1A es una proteína de gran versatilidad funcional cuyo papel no sólo depende de su localización celular sino también del momento en que se expresa, pues participa tanto en procesos relacionados con el desarrollo celular como con su respectivo

potencial funcional. La tabla 1 resume los sustratos de DYRK1A, así como su localización y su función.

Tabla 1. Sustratos de DYRK1A. Adaptado y actualizado de Dierssen y De Lagrán (2006).

<i>Sustrato</i>	<i>Localización Subcelular</i>	<i>Función</i>	<i>Referencia</i>
14-3-3	Nuclear/Citosólica	Regulación del andamiaje Protección de proteólisis Desfosforilación y secuestro de proteínas diana	(Álvarez <i>et al.</i> , 2007; Kim <i>et al.</i> , 2004)
Amphiphysin 1	Citosólica	Regulación del aparato endocítico	(Murakami <i>et al.</i> , 2006)
APP	Citosólica/Nuclear	Migración de precursores neuronales Degradación de β -catenina Regulador transcripcional	(Park <i>et al.</i> , 2007; Ryoo <i>et al.</i> , 2007)
Arip 4 (<u>A</u>ndrogen <u>R</u>eceptor <u>I</u>nteracting <u>P</u>rotein 4)	Nuclear	Regulación de la transcripción mediada por hormonas tiroideas	(Sitz <i>et al.</i> , 2004)
Caspasa 9	Citosólica (mitocondrial)	Componente de la vía intrínseca apoptótica mitocondrial	(Seifert <i>et al.</i> , 2008)
Ciclina D1	Nuclear	Regulación del ciclo celular y la diferenciación neuronal	(Chen <i>et al.</i> , 2013; Soppa <i>et al.</i> , 2014)
Ciclina L2	Nuclear	Regulación transcripcional relacionado con el <i>splicing</i> de pre-mRNA	(de Graaf <i>et al.</i> , 2004)
CREB	Nuclear	Desarrollo y diferenciación neuronal Plasticidad sináptica	(Yang <i>et al.</i> , 2001)
Dinamina 1	Citosólica	Regulación del ensamblaje del aparato endocítico	(Chen-Hwang <i>et al.</i> , 2002; Huang <i>et al.</i> , 2004b)
eIF2Bϵ (<u>E</u>karyotic <u>I</u>nitiation <u>F</u>actor <u>2</u>Bepsilon)	Nuclear/Citosólica	Regulación del inicio de la traducción del mRNA	(Woods <i>et al.</i> , 2001)
FKHR (<u>F</u>ork<u>h</u>ead)	Nuclear	Control de la expresión génica mediada por insulina Regulación de la apoptosis mediada por factores de supervivencia	(Chang <i>et al.</i> , 2007; Matsuo <i>et al.</i> , 2001; von Groote-Bidlingmaier <i>et al.</i> , 2003)
Gli 1	Citosólica/Nuclear	Regulación transcripcional	(Morita <i>et al.</i> , 2006)
Glycogen Synthase	Citosólica	Regulación del metabolismo de la glucosa	(Skurat y Dietrich, 2004)

Hip 1 (<i>Huntingtin Interactin protein 1</i>)	Citosólica	Papel en endocitosis y mantenimiento del esqueleto de actina	(Kang <i>et al.</i> , 2006)
Histona H3	Nuclear	Formación de nucleosomas Remodelación de la cromatina	(Himpel <i>et al.</i> , 2000)
MAP1B	Citosólica	Regulación de dinámica de microtúbulos en axones en crecimiento	(Scales <i>et al.</i> , 2009)
Munc18-1		Regulación de la exocitosis de vesículas sinápticas	(Park <i>et al.</i> , 2012b)
NFATc	Nuclear/Citosólica	Regulación del desarrollo y organogénesis Plasticidad sináptica	(Arron <i>et al.</i> , 2006; Gwack <i>et al.</i> , 2006)
N-WASP		Regulación de la polimerización de la actina y su dinámica	(Park <i>et al.</i> , 2012a)
p27	Nuclear	Regulación del ciclo celular y la diferenciación neuronal	(Soppa <i>et al.</i> , 2014)
p53	Nuclear	Implicado en la regulación del ciclo celular y la apoptosis	(Park <i>et al.</i> , 2010)
Presenilina 1	Citosólica	Componente del complejo γ -secretasa	(Ryu <i>et al.</i> , 2010)
RCAN1		Regulación en la formación de agregados característicos de enfermedades neurodegenerativas	(Jung <i>et al.</i> , 2011; Song <i>et al.</i> , 2013)
Septina 4	Citosólica	GTPasa	(Sitz <i>et al.</i> , 2008)
SIRT1	Nuclear	Supervivencia celular Acoplamiento estado metabólico celular a regulación génica	(Guo <i>et al.</i> , 2010)
Sprouty2	Citosólica	Regulador negativo de la señalización por receptores tirosina quinasa	(Aranda <i>et al.</i> , 2008)
STAT3 (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>)	Nuclear	Activación de transcripción	(Matsuo <i>et al.</i> , 2001)
Synaptojanin 1	Citosólica	Reciclaje de vesículas sinápticas endocíticas	(Adayev <i>et al.</i> , 2006)
α-Synuclein	Citosólica	Posible implicación en la regulación de la síntesis de dopamina Enfermedad de Parkinson	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
Tau	Citosólica	Regulación de la dinámica de microtúbulos Enfermedad de Alzheimer	(Park <i>et al.</i> , 2007; Ryoo <i>et al.</i> , 2007; Woods <i>et al.</i> , 2001)

2.5 Patrón espacio-temporal de DYRK1A en el SNC

La proteína DYRK1A presenta un patrón de expresión diferencial en las distintas estructuras cerebrales, variando a su vez temporalmente según se trate de estadios tempranos del desarrollo o durante etapas más avanzadas del desarrollo o edad adulta. Así, en cerebros humanos en estadios embrionarios esta quinasa se encuentra distribuida uniformemente en todo el SNC, mientras que en adultos su expresión se restringe enormemente, encontrándose especialmente expresada en las capas superficiales de la neocorteza, en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, el núcleo caudado y el tálamo (Guimera *et al.*, 1999; Guimera *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996). Todas estas estructuras presentan anomalías anatomofuncionales en el SD.

En el cerebro de ratón, el patrón espacio-temporal es ligeramente distinto al humano, expresándose de manera ubicua en estadios embrionarios y pasando a expresarse durante la etapa adulta sobre todo en áreas concretas como el bulbo olfatorio, el cerebelo, la corteza cerebral, la capa de células piramidales del hipocampo y varios núcleos hipotalámicos (Guimera *et al.*, 1996; Hammerle *et al.*, 2008; Marti *et al.*, 2003). En ratón se ha encontrado, además, un patrón específico de expresión temporal de DYRK1A en el cerebro durante la etapa embrionaria, siendo esta proteína expresada en cuatro fases secuenciales: i) expresión transitoria en progenitores proneurogénicos, ii) expresión en progenitores neurogénicos dependiente del ciclo celular, iii) expresión transitoria en neuronas “recién nacidas” y iv) expresión persistente en neuronas diferenciadas (Hammerle *et al.*, 2008). En consecuencia, DYRK1A podría ser un elemento clave en la maquinaria que acopla los eventos secuenciales acontecidos durante el desarrollo neuronal (desde la progresión del ciclo celular a la dendritogénesis).

La existencia de variaciones estructurales y temporales en la expresión de esta quinasa, junto con el hecho de que los elevados niveles de DYRK1A encontrados en estadios tempranos se van reduciendo en etapas postnatales, sugiere que DYRK1A en estadios tempranos juega un importante papel en el neurodesarrollo, participando en la proliferación y maduración celular, mientras que en el adulto su rol es fundamentalmente funcional, colaborando en los procesos cognitivos y motores. Por

lo tanto, la sobreexpresión de DYRK1A alteraría todos estos procesos y tendría importantes consecuencias neuropatológicas en el SD.

2.6 Papel de *DYRK1A* en el neurodesarrollo y en el funcionamiento cerebral adulto

La primera evidencia que vinculó el gen *DYRK1A* al desarrollo del SNC fue el estudio de su ortólogo en mosca, el gen *minibrain* (*mnb*). Los mutantes de *Drosophila* para este gen presentaban una marcada reducción en el número final de neuronas y una importante disminución de los lóbulos ópticos y los hemisferios cerebrales centrales (Tejedor *et al.*, 1995). Así pues, dado que Dyrk1A es una quinasa muy conservada evolutivamente, se procedió a al estudio del papel de su gen ortólogo en vertebrados.

En el ratón *Dyrk1A*^{+/-}, haploinsuficiente para el gen (ver apartado 3.5.2), se encontró el mismo patrón que en *Drosophila*: un número menor de neuronas y una reducción en el tamaño del cerebro, con especial afectación de algunas áreas (Fotaki *et al.*, 2002). En modelos murinos que sobreexpresan este gen, únicamente o junto con otros genes, también se encontraron variaciones en el tamaño cerebral y la densidad neuronal (Ahn *et al.*, 2006; Belichenko *et al.*, 2009a; Branchi *et al.*, 2004; Guedj *et al.*, 2012; Sebrerie *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque todos los modelos estudiados presentaron alteraciones, los resultados revelados sobre el tamaño cerebral fueron muy heterogéneos. En cualquier caso, la sobreexpresión de *Dyrk1A* en todos ellos sugiere la participación de este gen en dichos fenotipos.

Dyrk1A está relacionado no sólo con el control del crecimiento cerebral y sus distintas regiones durante el desarrollo, sino también con la proliferación celular (Guedj *et al.*, 2012). Existen numerosas evidencias moleculares de la participación de *Dyrk1A* en procesos proliferativos y neurogénicos. Por ejemplo, recientemente se ha constatado el efecto de la dosis del gen sobre el ciclo celular, ya que Dyrk1A controla la relación entre la ciclina D1 y los niveles de p21, determinantes para guiar a las células hacia la entrada del ciclo celular o hacia un estado de reposo (Chen *et al.*, 2013). Por lo tanto, la desregulación de la quinasa podría ser responsable de la alteración de la proliferación celular relacionándose con los defectos neurogénicos característicos del SD. Además, la sobreexpresión de *Dyrk1A* deteriora el ciclo celular en progenitores neuronales del hipocampo de rata mediante la fosforilación de p53 (Park *et al.*, 2010).

Así mismo, los progenitores neurales adultos del ratón *Dyrk1A*^{+/-} presentan defectos en su auto-renovación (Tejedor y Hammerle, 2011).

Por otro lado, hay numerosas evidencias del papel de este gen en la diferenciación neuronal. Se ha descrito que en etapas tempranas de la diferenciación neuronal, *Dyrk1A* fosforila la proteína Notch atenuando su señalización en líneas celulares. Durante la neurogénesis, las células en las que se activa la señalización de Notch permanecen como progenitores, mientras que aquellos en los que disminuye la actividad de Notch se diferencian en neuronas. Por lo tanto, la sobreexpresión de *Dyrk1A* podría contribuir al silenciamiento de la vía, impidiendo la correcta diferenciación neuronal (Fernandez-Martinez *et al.*, 2009; Tejedor y Hammerle, 2011).

Existen también evidencias del papel de este gen en el desarrollo neurítico (Gockler *et al.*, 2009). *Dyrk1A* se concentra en la parte apical de las dendritas durante la diferenciación de las neuronas, participando en la dendritogénesis neuronal (Hammerle *et al.*, 2003; Hammerle *et al.*, 2008). Además, en el cono dendrítico *Dyrk1A* co-localiza con uno de sus sustratos, la proteína dinamina 1, que participa en el tráfico de vesículas sinápticas y está implicada también en el crecimiento neurítico. Por otro lado, la reducción del número de copias de este gen en los ratones *Dyrk1A*^{+/-} produce una reducción del tamaño y ramificación de las neuronas piramidales de la corteza (Benavides-Piccione *et al.*, 2005) y una disminución en el número de espinas (Martinez de Lagran *et al.*, 2007). Además, estudios realizados en cultivos celulares de neuronas corticales de un modelo de ratón que sobreexpresa únicamente *Dyrk1A* (*TgDyrk1A*, ver apartado 3.5.1) demostraron características dendríticas similares a las encontradas en personas con SD, como la disminución del crecimiento de las neuritas y la sinaptogénesis así como defectos en la dinámica de actina en las espinas dendríticas (Martinez de Lagran *et al.*, 2012). Por último, recientemente se ha demostrado que la morfología dendrítica de las neuronas piramidales de las capas profundas de la corteza prefrontal de un modelo de ratón transgénico que sobreexpresa *Dyrk1A* está también alterada (*mBACtgDyrk1A*, ver apartado 3.4) (Thomazeau *et al.*, 2014).

Otro de los procesos en los que también se ha implicado a *Dyrk1A* es la función sináptica neuronal. Este hecho parece ser debido a su papel en el reciclaje de vesículas sinápticas por fosforilar proteínas implicadas en la maquinaria endocítica celular como

la anifisina 1, la dinamina 1 y la endofisina 1 entre otras (Adayev *et al.*, 2006; Chen-Hwang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006) o por su participación en la sinaptogénesis. Las neuronas piramidales de la corteza de los ratones *Dyrk1A*^{+/-} presentaban alteraciones en los componentes pre- y post-sinápticos de la transmisión dopaminérgica (Martinez de Lagran *et al.*, 2007). Además, *Dyrk1A* está involucrado en el desequilibrio de sinapsis excitadoras e inhibitoras encontradas en el SD, encontrándose un mayor número de sinapsis inhibitoras y un menor número de sinapsis excitadoras en esta condición. Un reciente estudio ha demostrado que los marcadores de estos dos tipos de sinapsis varían según la dosis génica de *Dyrk1A* (Souchet *et al.*, 2014).

Por último, *Dyrk1A* ejerce un papel regulador negativo en la vía apoptótica de la retina en desarrollo, fosforilando para ello la caspasa 9 y ejerciendo un efecto protector frente a la muerte celular (Laguna *et al.*, 2008). Estudios posteriores en la misma línea demostraron que la triplicación de *Dyrk1A* es necesaria y suficiente para causar el fenotipo alterado de la retina característico del SD en un modelo de ratón trisómico (mBACtg*Dyrk1A*, ver apartado 3.4), relacionándose con alteraciones en la apoptosis mediada por la caspasa 9 durante el desarrollo (Laguna *et al.*, 2013). Además, también se ha demostrado la relación de *Dyrk1A* con la supervivencia de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra mediante la restricción de la actividad de la vía intrínseca apoptótica (Barallobre *et al.*, 2014). Por lo tanto, aunque todavía no se ha confirmado este hallazgo en otras estructuras del SNC, en modelos animales de SD no debe descartarse que *Dyrk1A* tenga también un papel en la supervivencia celular y por lo tanto en la reducción en el número de neuronas y el tamaño de distintas áreas del cerebro y cerebelo encontrados en el SD (Laguna *et al.*, 2013).

2.7 Papel de *DYRK1A* en los procesos cognitivos y conductuales

Dada la participación de *Dyrk1A* en la neuroproliferación, la dendritogénesis, la formación de espinas dendríticas y la sinaptogénesis, dando lugar a un consiguiente deterioro de la plasticidad sináptica, la sobreexpresión de este gen origina alteraciones durante el desarrollo e importantes defectos funcionales en la etapa adulta. Todos estos efectos, tempranos y tardíos, conducen a una conectividad cerebral deficiente, lo que impacta profundamente en los procesos cognitivos y da lugar a las alteraciones en

el aprendizaje y la memoria propias del SD. Asimismo, el hecho de que algunos de sus sustratos, como CREB o NFATc, estén implicados en procesos cognitivos también apoya su papel en la cognición (Arron *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2001).

Además, como se ha mencionado anteriormente, en la etapa adulta la expresión de este gen presenta diferencias anatómicas tanto en humano como en ratón, restringiéndose su expresión a regiones del SNC concretas relacionadas con funciones cognitivas específicas. Por ejemplo, su expresión en áreas relacionadas con el control motor como el cerebelo, la medula espinal y núcleos motores en ratón (Marti *et al.*, 2003) fue interpretada como la participación del gen en procesos motores. Sin embargo, como se describió el apartado 1.4, actualmente el cerebelo se relaciona también con múltiples procesos cognitivos como el aprendizaje y la plasticidad sináptica, lo que sugiere la implicación de *Dyrk1A* también en estas funciones (Manto, 2006; Rochefort *et al.*, 2013; Strick *et al.*, 2009). Por otro lado, la expresión de *Dyrk1A* en humanos y ratón en áreas relacionadas con el aprendizaje y la memoria como la neocorteza cerebral o el hipocampo, sugieren su implicación directa en las alteraciones de procesos cognitivos (Guimera *et al.*, 1996; Hammerle *et al.*, 2008; Marti *et al.*, 2003; Wegiel *et al.*, 2004).

El hecho de que modelos murinos que sobreexpresan *Dyrk1A* (de forma aislada o junto a otros genes) muestren también alteraciones en el procesamiento de la información y un deterioro conductual, como la hiperactividad (ver sección 3), vincula nuevamente el gen a estas funciones (Reeves *et al.*, 1995; Sago *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2010b). Por otro lado, en modelos murinos en los que la dosis de *Dyrk1A* fue manipulada, disminuyéndose o sobreexpresándose (ver apartado 3.5), también se encontraron defectos en la plasticidad sináptica y alteraciones cognitivas relevantes (Altafaj *et al.*, 2001; Arqué *et al.*, 2008; Thomazeau *et al.*, 2014), lo que apoya la hipótesis de la importancia de este gen en los procesos de aprendizaje y memoria.

2.8 Papel de *DYRK1A* en los procesos neurodegenerativos

Como ya se comentó en el apartado 1.6, una de las principales características neuropatológicas del SD es la aparición temprana de síntomas propios de la EA, caracterizada por la formación de placas seniles amiloides y ovillos neurofibrilares. Así,

existen numerosas evidencias de la participación de *DYRK1A* en los procesos neurodegenerativos asociados al SD, tales como la degeneración colinérgica, la degeneración neurofibrilar producida por la hiperfosforilación de Tau, el acúmulo amiloide debido a la fosforilación de APP y la formación de cuerpos de Lewy por la fosforilación que esta quinasa realiza en la α -sinucleína.

El papel de *Dyrk1A* en las tautopatías se describió por primera vez cuando se demostró que la quinasa fosforilaba el residuo treonina 212 de Tau en un ensayo *in vitro* (Liu *et al.*, 2008; Park y Chung, 2013; Woods *et al.*, 2001). Posteriormente se describieron hasta 11 residuos más de Tau cuya fosforilación es catalizada por Dyrk1A. También se han encontrado evidencias *in vivo* de su rol fisiológico en la hiperfosforilación de Tau en ratones transgénicos que sobreexpresaban únicamente *Dyrk1A* (Tg*Dyrk1A*, ver apartado 3.5.1) (Ryoo *et al.*, 2007), en ratones con trisomía parcial que tienen triplicado el gen *Dyrk1A* entre otros (Ts65Dn, ver apartado 3.1) (Liu *et al.*, 2008), en animales ancianos de un modelo murino transcromosómico (Tc1, ver apartado 3.3) (Sheppard *et al.*, 2012) y en la corteza temporal de pacientes con SD (Liu *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2013). Estos resultados indican que la sobreexpresión de Dyrk1A contribuye en la acumulación de ovillos neurofibrilares y su consecuente neurotoxicidad (Park y Chung, 2013).

La copia extra de *APP* y su sobreexpresión parece ser la principal causa de la aparición temprana de amiloidosis en el cerebro de personas con SD. Sin embargo, existen estudios experimentales que revelan la participación de *DYRK1A* en este proceso, precisamente interaccionado con APP. *DYRK1A* fosforila APP en Thr668 *in vitro* y en células de modelo de ratón que sobreexpresa el gen *DYRK1A* humano (hBACtg*Dyrk1A*, ver apartado 3.5.1) (Ryoo *et al.*, 2008). Esta fosforilación parece facilitar la escisión de APP por la β -secretasa 1 (*Beta-secretase 1*, BACE1) y la γ -secretasa, por lo que se produce una elevada acumulación de los péptidos neurotóxicos A β 40 y A β 42 (Lee *et al.*, 2003; Vingthdeux *et al.*, 2005; Wegiel *et al.*, 2011). Por lo tanto, la sobreexpresión de *DYRK1A* fosforila en exceso APP, que a su vez está también sobreexpresado, lo que conduce a una cascada de acumulación de A β .

Al igual que ocurre en la EA, la degeneración de las vías colinérgicas tiene un papel fundamental en el neuroenvejecimiento del SD. El ratón Ts65Dn, con una trisomía

parcial que incluye al gen *Dyrk1A*, presenta alteraciones en la memoria y el aprendizaje relacionadas con la degeneración colinérgica (Granholm *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2003), por lo que la quinasa quizá también podría tener un papel en este proceso. Estudios *in vitro* han revelado que la reducción de la expresión proteica de *Dyrk1A* en células trisómicas derivadas del córtex de ratón rescata la expresión de la colinoacetiltransferasa (*Choline acetyltransferase*, ChAT), por lo que existen indicios de la vinculación del gen a la degeneración del sistema colinérgico (Hijazi *et al.*, 2013).

Por último, existen también evidencias de la contribución de *Dyrk1A* en el acúmulo de otros elementos tóxicos asociados al envejecimiento en el SD, como la agregación y fibrilización de α -sinucleína en los cuerpos de Lewy, mediante su fosforilación en el residuo ser87 (Kim *et al.*, 2006). Estos acúmulos tienen un efecto pro-apoptótico y son un importante desencadenante de cascadas neurodegenerativas (Ihara *et al.*, 2007; Sitz *et al.*, 2008).

3. Modelos murinos para estudiar el Síndrome Down

A la hora de vislumbrar la enorme complejidad anatomofisiológica del SD y diseñar alternativas terapéuticas, los modelos murinos de SD han supuesto un pilar fundamental, pues reproducen muchas de las alteraciones fenotípicas de este síndrome.

Existe una gran similitud entre el genoma del ratón y el humano, siendo muchas las regiones sinténicas compartidas entre ambos. De los aproximadamente 552 genes que contiene el brazo largo del HSA21, 166 son ortólogos a genes localizados en regiones sinténicas pertenecientes a tres cromosomas murinos: el MMU16 (110 genes ortólogos, incluyendo al gen *Dyrk1A*), el MMU17 (19 genes ortólogos) y el MMU10 (37 genes ortólogos) (Mural *et al.*, 2002; Sturgeon y Gardiner, 2011). Así pues, basándose en estas homologías, se han seguido diversas estrategias en la generación de modelos murinos (figura 4), abarcando desde i) la generación de ratones portadores de una copia extra total o parcial del MMU16 o un HSA21 casi completo, ii) la introducción de regiones acotadas del HSA21 (lo que permite estudiar la cooperación entre varios genes) y iii) el incremento, normalización o reducción en el número de copias de genes

únicos, como es el caso de *Dyrk1A*, para estudiar tanto su función fisiológica como su contribución a los distintos fenotipos del SD.

A continuación se describen distintos modelos murinos de SD, haciendo especial hincapié en aquellos que incluyen la manipulación genética de *Dyrk1A*.

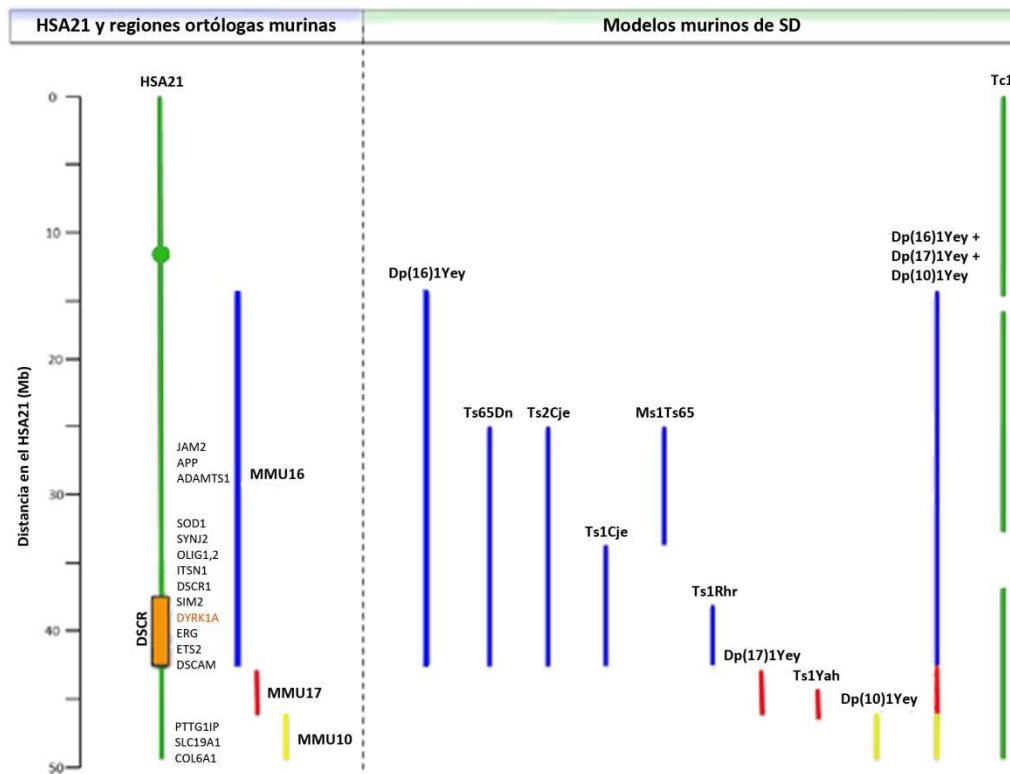


Figura 4. Representación esquemática del HSA21 y las regiones ortólogas murinas del MMU16 (azul), MMU17 (rojo) y MMU10 (amarillo) y de la extensión de la trisomía en los diferentes modelos murinos de SD. El círculo negro indica el centrómero y el rectángulo naranja la posición aproximada de la DSCR. Figura modificada de (Lana-Elola *et al.*, 2011; Rueda *et al.*, 2012).

3.1 Modelos murinos trisómicos, totales o parciales, del MMU16

El primer modelo de ratón de SD, generado por translocación robertsoniana espontánea, fue el **Ts16**. Este ratón contiene una copia completa del MMU16 (Gropp *et al.*, 1975) que representa aproximadamente el 80% del HSA21. Sin embargo, este cromosoma murino también presenta sintenias con otras regiones de los cromosomas humanos HSA3, HSA8 y HSA16 lo que compromete mucho su valor experimental, pues presenta genes no triplicados en SD. Por otro lado, los embriones Ts16 mueren *in útero*, por lo que no es posible el estudio de rasgos fenotípicos adultos. A pesar de ello,

este modelo ha permitido el estudio de importantes alteraciones inherentes al desarrollo como la morfogénesis cerebral o las malformaciones cardíacas.

La siguiente estrategia fue desarrollar modelos con trisomías parciales del MMU16 que sobreviviesen a la etapa adulta. Surgió así el ratón **Ts65Dn**, viable, longevo y que es en la actualidad el modelo más utilizado y mejor caracterizado de SD (Davisson *et al.*, 1993). Este ratón fue generado por una translocación recíproca no robertsoniana entre los cromosomas MMU16 y MMU17 por lo que es portador de una trisomía parcial para el MMU16, concretamente desde el gen *Mrp139* hasta el gen *Znf295* y contiene aproximadamente 92 genes ortólogos a genes del HSA21 (Sturgeon y Gardiner, 2011). Sin embargo, el ratón Ts65Dn también es portador de una trisomía segmentaria del MMU17 que comprende 60 genes no homólogos al HSA21 (Duchon *et al.*, 2011), es decir, sobreexpresa un grupo de genes no triplicados en el SD. A pesar de ello, hasta el momento es el modelo murino de SD que comparte un mayor número de alteraciones fenotípicas del SD, especialmente a nivel del SNC, siendo por ello el más ampliamente estudiado y una importante herramienta en la comprensión de las alteraciones anatomofisiológica del SD durante las etapas de la vida pre- y post-natales. Por otro lado, su trisomía parcial contribuye enormemente a la hora de encontrar genes dosis dependientes de especial relevancia en el SD, como es el caso de *Dyrk1A*. Puesto que se trata del modelo murino empleado en el presente trabajo, en el apartado 3.1.1 se describirá su fenotipo detalladamente.

Existen además otros modelos con trisomía parciales, como el ratón **Ts2Cje**, que porta el mismo segmento del MMU16 triplicado que el Ts65Dn pero translocado en el cromosoma 12 (Villar *et al.*, 2005). El ratón **Ts1Cje** presenta una trisomía de una porción menor del MMU16 que contiene 81 genes localizados en la región que se encuentra entre los genes *Sod1* y *Znf295*. Este ratón también ha sido ampliamente caracterizado y presenta fenotipos menos alterados que los encontrados en el modelo Ts65Dn (Sago *et al.*, 1998). El ratón **Ms1Ts65**, obtenido a partir del cruce entre los modelos murinos Ts65Dn y Ts1Cje, tiene una trisomía parcial de 33 genes situados en el MMU16 que comprende el segmento entre los genes *App* a *Sod1* (Sago *et al.*, 2000). Por otro lado, para evaluar el efecto de la DSCR se generó el ratón **Ts1Rhr**, modelo trisómico para la región *Cbr1-Orf9* del MMU16, que incluye 33 genes de la misma. Este

ratón no presenta ni el fenotipo craneofacial ni los defectos cognitivos del modelo Ts65Dn. Sin embargo, al deleccionar la región *Cbr1-Orf9* al ratón Ts65Dn éste no mostró ninguna alteración en una prueba de aprendizaje espacial, por lo que se concluyó que la DSCR es necesaria pero no suficiente para la aparición de las alteraciones de los procesos de aprendizaje y memoria encontradas en el SD. Por último, recientemente se ha creado un ratón trisómico para la región del MMU16 que contiene todos los genes ortólogos (110) a los del HSA21 (entre los genes *Lipi* y *Zfp295*): el ratón **Dp(16)1Yey/+**.

3.1.1 El ratón Ts65Dn como modelo de SD: neurobiología y alteraciones cognitivo-conductuales

Como ya se comentó anteriormente, el ratón Ts65Dn (TS) es el modelo murino de SD más ampliamente estudiado y utilizado, pues además de ser un ratón viable presenta muchas de las alteraciones fenotípicas de las personas con SD, abarcando desde el fenotipo cognitivo hasta la patología de tipo EA. La tabla 2 resume las principales similitudes fenotípicas entre el ratón TS y el SD.

Al igual que en la especie humana, los machos TS son estériles. Por su parte, las hembras son fértiles y transmiten la trisomía a su descendencia con una frecuencia aproximada del 35%, que es menor de la esperada debido a que existe una elevada mortalidad perinatal de este ratón (Roper *et al.*, 2006b). Por otro lado, tanto el ratón TS como las personas con SD presentan anomalías similares en su sistema inmunológico (Lorenzo *et al.*, 2013; Paz-Miguel *et al.*, 1999). Respecto al fenotipo anatómico grueso, el ratón TS adulto presenta cambios en la forma y el tamaño del cráneo similares a los encontrados en las personas con SD, como son la presencia de una mandíbula reducida, la braquicefalia, la reducción del cráneo, la distancia interorbital acortada y la reducción rostral (Richtsmeier *et al.*, 2002). También se han observado deficiencias estructurales y mecánicas en el esqueleto apendicular de los ratones TS, como una menor densidad y resistencia ósea, debidas a alteraciones en el desarrollo óseo y la homeostasis (Blazek *et al.*, 2011).

Desde un punto de vista conductual, este ratón no presenta alteraciones en habilidades sensorimotoras tales como la fuerza de las extremidades anteriores, las

habilidades posturales, el equilibrio o la coordinación motora (Rueda *et al.*, 2012). Sin embargo, estos animales sí presentan alteraciones en la forma de andar similares a las encontradas en niños con SD (Baxter *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 1999; Hampton *et al.*, 2004).

Además, el ratón TS es hiperactivo en la oscuridad (Escorihuela *et al.*, 1995; Holtzman *et al.*, 1996; Reeves *et al.*, 1995) y en situaciones aversivas que habitualmente provocan precaución e inhibición en animales normales, como ocurre en las pruebas del campo abierto y el laberinto elevado en cruz (Coussons-Read y Crnic, 1996; Escorihuela *et al.*, 1995; Martínez-Cue *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2007). Esta hiperactividad es probablemente debido a un déficit de atención (Driscoll *et al.*, 2004), lo que repercute en su aprendizaje.

El ratón TS muestra acusados déficits en su aprendizaje y memoria, especialmente en tareas dependientes del hipocampo, tales como el aprendizaje espacial en laberinto acuático de Morris o en el laberinto radial (Demas *et al.*, 1996; Escorihuela *et al.*, 1998; Martínez-Cue *et al.*, 2005; Martínez-Cué *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 1995; Sago *et al.*, 2000). El ratón TS también presenta déficits en su memoria de trabajo en las pruebas de alternancia espontánea en el laberinto en T o en Y (Belichenko *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009), el laberinto acuático de Morris (Escorihuela *et al.*, 1998; Martínez-Cué *et al.*, 2014) y el laberinto radial (Belichenko *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2010b; Demas *et al.*, 1996; Salehi *et al.*, 2009). Además, su memoria asociativa contextual está afectada en la prueba del condicionamiento del miedo (*Contextual Fear Conditioning*, CFC) (Salehi *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010b) y su memoria de reconocimiento en la prueba del reconocimiento de objetos (Fernandez *et al.*, 2007). Todas ellas son tareas fuertemente dependientes del hipocampo (Morris *et al.*, 1982; Morris *et al.*, 1990), aunque para su correcta ejecución también es necesaria la adecuada función de otras estructuras como el cerebelo (Dickson *et al.*, 2010; Gandhi *et al.*, 2000; Petrosini *et al.*, 1996).

A nivel neuroanatómico, el tamaño cerebral del ratón TS está reducido durante el periodo embrionario; sin embargo, a diferencia de los individuos con SD, no lo está tras el nacimiento o durante la edad adulta (Aldridge *et al.*, 2007; Belichenko *et al.*, 2007; Chakrabarti *et al.*, 2007; Holtzman *et al.*, 1996). No obstante, en ratones adultos sí se

han encontrado alteraciones en algunas regiones, concretamente en el volumen del hipocampo (Bianchi *et al.*, 2010b; Llorens-Martín *et al.*, 2010; Lorenzi y Reeves, 2006).

Por otro lado, el cerebelo del ratón TS también presenta una marcada reducción de volumen, al igual que ocurre en las personas con SD (Baxter *et al.*, 2000). Si bien, el cerebelo de este modelo de ratón, no presenta alteraciones en el momento del nacimiento, a partir de los 6 días ya comienza a presentar déficits en su crecimiento (Roper *et al.*, 2006a). Estas estructuras deterioradas en el ratón TS tienen un papel fundamental en procesos cognitivos. Como ya se comentó anteriormente, se necesita la integridad anatómicofuncional del hipocampo tanto para un adecuado aprendizaje espacial como para la codificación, la consolidación y la recuperación de la nueva información memorizada (Eichenbaum, 2001). Por otro lado, el cerebelo tiene un importante papel en procesos cognitivos superiores, incluyendo la atención, la flexibilidad cognitiva y la memoria (Schmahmann, 2004; Teipel *et al.*, 2004).

La citada reducción de volumen de distintas estructuras del encéfalo está relacionada con una reducción en la densidad celular de éstas áreas, tal y como ocurre en las personas con SD. Además, el número reducido de células empobrece sustancialmente la conectividad cerebral. Aunque a la edad de un mes se ha encontrado que el ratón TS muestra un número normal de neuronas en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (Lorenzi y Reeves, 2006), la densidad neuronal sí es menor en edades avanzadas (17-18 meses) (Insausti *et al.*, 1998; Kurt *et al.*, 2004). Además, el DG de este modelo de SD tiene un número reducido de células granulares a todas las edades estudiadas (Bianchi *et al.*, 2010b; Contestabile *et al.*, 2007; Insausti *et al.*, 1998; Lorenzi y Reeves, 2006; Rueda *et al.*, 2005). También se ha descrito una densidad celular reducida durante las etapas prenatal (E18.5) y postnatal temprana (P8) en el neocórtex (Chakrabarti *et al.*, 2007). El cerebelo de este ratón también muestra un menor número de células granulares y de Purkinje desde etapas postnatales tempranas hasta la edad adulta (Baxter *et al.*, 2000; Contestabile *et al.*, 2009a; Roper y Reeves, 2006).

Por otro lado, a partir de los 6 meses de edad el ratón TS presenta una disminución en los niveles de los marcadores colinérgicos en el prosencéfalo basal. Además, estos animales presentan una disminución del tamaño de sus neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal (*Basal Forebrain Cholinergic Neurons*, BFCNs), lo que sugiere que

presentan una degeneración dependiente de la edad de este grupo de neuronas (Contestabile y Ciani, 2008; Cooper *et al.*, 2001; Granholm *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2003). El sistema colinérgico, como ya se ha mencionado, es también un sustrato anatómico del aprendizaje y la atención (Bartus, 2000; Baxter y Chiba, 1999).

La reducción en el número de neuronas encontradas en distintas áreas podría ser debido a alteraciones en procesos de neurogénesis y/o a un incremento en la apoptosis. Tanto en roedores como en humanos la proliferación celular continúa durante toda la vida en la zona subventricular (*Subventricular Zone*, SVZ) y en la zona subgranular (*Subgranular Zone*, SGZ) del DG (Kempermann *et al.*, 2002; Kempermann *et al.*, 1997; van Praag *et al.*, 1999; van Praag *et al.*, 2002). En la SGZ las nuevas neuronas migran hacia la capa granular (*Granular Cell Layer*, GCL) y establecen conexiones con la capa molecular (*Molecular Layer*, ML) donde recibirán las entradas sinápticas excitatorias aferentes de la vía perforante (van Praag *et al.*, 2002). Cada vez hay más evidencias que indican que la neurogénesis hipocampal adulta está implicada en el establecimiento de la potenciación a largo plazo (*Long-Term Potentiation*, LTP) y que juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo (Bianchi *et al.*, 2010a; Malberg *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2002). Numerosos trabajos han demostrado alteraciones en los procesos de neurogénesis en el ratón TS. Durante las etapas embrionarias estos animales presentan una marcada reducción en la proliferación de los precursores neurales en la zona neocortical ventricular (Chakrabarti *et al.*, 2007). Además, desde el nacimiento hasta la edad adulta, tanto en la SVZ (Bianchi *et al.*, 2010a; Bianchi *et al.*, 2010b; Trazzi *et al.*, 2011) como en el DG (Bianchi *et al.*, 2010b; Clark *et al.*, 2006; Contestabile *et al.*, 2007; Llorens-Martín *et al.*, 2010; Lorenzi y Reeves, 2006; Rueda *et al.*, 2005), el ratón TS presenta una reducción en la proliferación celular. En el cerebelo, los ratones TS recién nacidos también muestran una reducción de la proliferación de los precursores de las células granulares de la capa granular de hasta un 40% (Contestabile *et al.*, 2009a; Contestabile *et al.*, 2009b; Roper *et al.*, 2006a).

Las alteraciones en la proliferación encontradas en las distintas estructuras a distintas edades en el ratón TS parecen ser debidas a la ralentización del ciclo celular, tal y como

se ha demostrado en la región CA3 del hipocampo en estadios embrionarios, en el DG en etapas postnatales (Chakrabarti *et al.*, 2007; Contestabile *et al.*, 2007) y en el cerebelo (Contestabile *et al.*, 2009a), siendo las fases G1 y G2 las más afectadas. Por otro lado, existen evidencias de que la diferenciación celular también está alterada en ese modelo, ya que un menor número de células alcanzan el fenotipo neuronal en su el cerebelo (Contestabile *et al.*, 2009a).

La muerte celular programada también podría tener un papel en la hipocelularidad encontrada en este modelo, ya que este proceso está involucrado en el desarrollo del sistema nervioso y su mantenimiento. Sin embargo, algunos estudios no han revelado ninguna evidencia de cambios en marcadores moleculares o celulares de la apoptosis, lo que sugiere que la muerte celular programada probablemente no está relacionada con la hipocelularidad encontrada en el cerebro de este ratón trisómico (Rueda *et al.*, 2011, 2013).

El desarrollo dendrítico también se encuentra alterado en el ratón TS, de hecho, estos animales presentan una hipotrofia muy similar a la descrita en el SD. Las neuronas piramidales del neocórtex del ratón TS adulto muestran una reducción en la longitud y arborización de las dendritas así como en la densidad de las espinas (Dierssen *et al.*, 2003). La densidad de espinas también está reducida en las células granulares del DG (Belichenko *et al.*, 2004; Popov *et al.*, 2011). Además, las espinas del DG se caracterizan por varias anomalías morfológicas, incluyendo un aumento del tamaño de las cabezas y una disminución en la longitud de los cuellos de las espinas (Belichenko *et al.*, 2004).

Por otro lado, este modelo murino de SD también presenta importantes alteraciones a nivel sináptico. Así, el número de sinapsis es menor y, además, sus propiedades fisiológicas están alteradas. En concreto, los ratones TS de 9 días de edad presentan una menor densidad sináptica en la neocorteza y en CA1 (Chakrabarti *et al.*, 2007) y en la edad adulta en el DG y las regiones CA1 y CA3 del hipocampo (Kurt *et al.*, 2004). También se ha demostrado que la distribución y naturaleza de las conexiones están alteradas en diversas regiones cerebrales, siendo el balance excitador/inhibidor del ratón TS finalmente defectuoso (Martínez-Cué *et al.*, 2014; Rueda *et al.*, 2012). Este

modelo murino presenta un menor número de sinapsis asimétricas (excitadoras) en la corteza temporal, el DG y las regiones CA1 y CA3 (Belichenko *et al.*, 2004; Kurt *et al.*, 2000). También el número de sinapsis glutamatérgicas está reducido en su hipocampo (Rueda *et al.*, 2010). En cuanto a las sinapsis de carácter inhibitor, se ha descrito un aumento del número de marcadores de sinapsis GABAérgicas en el DG de este ratón (Martínez-Cué *et al.*, 2013). Además, su corteza somatosensorial presenta un aumento del número de interneuronas GABAérgicas (Perez-Cremades *et al.*, 2010), lo que implica un incremento de sinapsis inhibitoras. Por último, se ha descrito que el prosencéfalo del ratón TS presenta una mayor neurogénesis de neuronas inhibitoras (Chakrabarti *et al.*, 2010) que da lugar de nuevo al incremento del impulso inhibitor.

Tal y como ocurre en los individuos con SD, la neuroquímica cerebral de los ratones TS también está afectada, lo que tiene consecuencias no sólo en la cohesión de la red cerebral, sino también en la propia neurogénesis y supervivencia celular. Existe constancia de que los sistemas de neurotransmisión GABAérgicos, glutamatérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos y noradrenérgicos están alterados, tanto a nivel de la expresión de sus neurotransmisores como de receptores (Rueda *et al.*, 2012). En el sistema GABAérgico se ha demostrado una reducción en la expresión del número de subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A en el hipocampo (Belichenko *et al.*, 2009b) y de la subunidad $\alpha 1$ de este receptor en sinaptosomas del cerebro del ratón TS (Fernandez *et al.*, 2009). Además, en el caso de la transmisión excitadora, la vía de señalización del receptor NMDA está también alterada en este modelo animal (Siarey *et al.*, 2006). Por otro lado, el ratón TS también presenta alteraciones en los niveles de diversas neurotrofinas, lo que repercute en la supervivencia, la diferenciación y la migración neuronal. Así, mientras los niveles de BDNF y el factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*, NGF) están reducidos en el hipocampo, los niveles de la neurotrofina 3 (NT-3) están aumentados (Bianchi *et al.*, 2010b; Fukuda *et al.*, 2010; Pollonini *et al.*, 2008; Salehi *et al.*, 2006).

En conjunto, todas las alteraciones neurobiológicas descritas en este modelo deterioran la conectividad cerebral y su neuroplasticidad, lo que daría lugar a déficits cognitivos (Contestabile *et al.*, 2010). De hecho, de forma generalizada, es aceptado que la anomalía en la anatomía sináptica y las modificaciones en los circuitos

neuronales representan las bases neurobiológicas de las alteraciones del aprendizaje y memoria en el SD.

Como ya se ha mencionado, en el cerebro del ratón TS existe un desequilibrio en el balance excitador/inhibidor, dando lugar a una sobreinhibición sináptica. Este hecho compromete tanto la LTP como la depresión a largo plazo (*Long-Term Depression*, LTD) cerebral, sustratos electrofisiológicos de la plasticidad sináptica y del aprendizaje. De acuerdo con esto, al examinar la neuroplasticidad hipocampal del ratón TS se encontró una reducción en la LTP inducida en la región CA1 y el DG (Belichenko *et al.*, 2007; Costa y Grybko, 2005; Fernandez *et al.*, 2007; Kleschevnikov *et al.*, 2004; Siarey *et al.*, 1999; Siarey *et al.*, 1997) y un incremento de la LTD (Siarey *et al.*, 1999). Por otro lado, la activación de los receptores NMDA hipocampales está reducida durante la inducción de la LTP, lo que repercute en la eficacia sináptica (Kleschevnikov *et al.*, 2004). Además, varios estudios han demostrado que la sobreinhibición en el hipocampo es dependiente de los receptores GABA_A y GABA_B (Belichenko *et al.*, 2004; Costa y Grybko, 2005; Kleschevnikov *et al.*, 2012b) ya que la LTP se recupera tras la administración de antagonistas de estos receptores (Belichenko *et al.*, 2007; Fernandez *et al.*, 2007; Kleschevnikov *et al.*, 2012a).

Por último, los procesos neurodegenerativos encontrados en las personas con SD también han sido ampliamente estudiados en el ratón TS. Si bien es cierto que en este modelo no se han encontrado las placas amiloides, los ovillos neurofibrilares o las sinucleopatías características de individuos con SD que presentan neuropatología EA, sí se han encontrado procesos neurotóxicos similares, como la neuroinflamación, el aumento del estrés oxidativo y otras alteraciones encontradas en la EA, incluyendo la acumulación de App, péptidos A β , la hiperfosforilación de Tau y la degeneración y atrofia de BFCNs (Cooper *et al.*, 2001; Corrales *et al.*, 2013; Corrales *et al.*, 2014; Kim y Suh, 2009; Qian *et al.*, 2013; Seo y Isacson, 2005). Además, el ratón TS presenta una sobreactivación de la microglía tanto en el hipocampo como en el prosencéfalo basal, lo que se relaciona con el aumento de la inflamación cerebral y la pérdida de neuronas colinérgicas en esta última región (Kim y Suh, 2009).

Por otro lado, este modelo presenta triplicado los genes *Sod1* y *App*, relacionados respectivamente con el estrés oxidativo y la patología tipo EA. *Sod1* codifica para la

superóxido dismutasa, por lo que su sobreexpresión tiene como consecuencia la sobreproducción de radicales libres altamente reactivos y tóxicos. La sobreproducción de la proteína App da lugar a la acumulación excesiva de péptidos amiloides en la corteza y en el hipocampo de estos animales (Corrales *et al.*, 2013; Netzer *et al.*, 2010). Además, en el ratón TS la sobreexpresión de App ha sido relacionada con la degeneración de las neuronas colinérgicas y noradrenérgicas que proporcionan inputs moduladores al hipocampo (Millan Sanchez *et al.*, 2012). Esta desaferenciación colinérgica y noradrenérgica, que se ve agravada con la edad, probablemente compromete la función del hipocampo de este ratón.

Por último, el cerebro de los ratones TS también presentan hiperfosforilación de Tau (Liu *et al.*, 2008). En general se cree que la hiperfosforilación anormal de Tau da lugar a la degeneración de las neuritas y, en humanos y algunos modelos animales de EA, también a la formación de ovillos neurofibrilares (Fillat *et al.*, 2010; Oddo *et al.*, 2003).

3.2 Modelos murinos trisómicos para el MMU17 o MMU10/16/17

Recientemente se han generado dos modelos murinos trisómicos para genes ortólogos al HSA21 localizados en el MMU17: el ratón **Ts1Yah**, trisómico para 12 genes del MMU17 sinténicos a la región subtelomérica del HSA21 (Pereira *et al.*, 2009), y el ratón **Dp(17)1Yey/+**, que es trisómico para toda la región del MMU17 sinténica al HSA21 y que contiene 19 genes ortólogos (Sturgeon y Gardiner, 2011; Yu *et al.*, 2010a; Yu *et al.*, 2010b). En cuanto a los modelos murinos trisómicos para MMU10, ha sido generado un modelo con una trisomía segmentaria sinténica para 37 genes ortólogos al HSA21 localizados en el MMU10, denominado ratón **Dp(10)1Yey/+** (Sturgeon y Gardiner, 2011; Yu *et al.*, 2010a).

Una vez diseñados tres modelos trisómicos para cada una de las regiones sinténicas al HSA21 en el MMU10 (Dp(10)1Yey/+), el MMU16 (Dp(16)1Yey/+) y el MMU17 (Dp(17)1Yey/+), éstos se cruzaron para dar lugar al denominado **(Dp(10)1Yey/+;Dp(16)1Yey/+;Dp(17)1Yey/+)**, primer ratón trisómico para todas las regiones sinténicas al HSA21 (Yu *et al.*, 2010a). Este ratón presenta déficits neurológicos similares a los del TS, lo que corrobora nuevamente la validez de este modelo, incluyendo defectos en el aprendizaje y memoria y LTP (Yu *et al.*, 2010b). No

obstante, este modelo aún no está totalmente caracterizado, por lo que el ratón TS sigue siendo el más utilizado.

Tabla 2. Principales características fenotípicas comunes entre el SD y el ratón TS. Adaptado de Rueda *et al.* (2012).

	<i>SD</i>	<i>Ts65Dn</i>
Aprendizaje y memoria espacial	Alterados	Alterados
Memoria de referencia y de trabajo	Alterada	Alterada
Habilidades lingüísticas	Alteradas	
Reconocimiento de nuevos objetos		Alterado
Discriminación contextual		Alterada
Atención e actividad	(i) Déficit de atención	(i) Déficit de atención (ii) Hiperactividad
Condicionamiento operante		Alterado
Habilidades motoras	Adquisición tardía	Adquisición tardía
Coordinación motora	Alterada	(?)
Volumen cerebral	Reducido	Reducido
Densidad neuronal	Reducida	Reducida
Volumen cerebelar	Reducido	Reducido
Densidad neuronal cerebelar	Reducida	Reducida
Neurogénesis	(i) Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales (ii) Alteraciones en la neurodiferenciación (iii) Alteraciones en la neurogénesis cerebelar	(i) Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales (ii) Alteraciones en la neurodiferenciación (iii) Alteraciones en la neurogénesis cerebelar
Dendritas y espinas dendríticas	(i) Alteraciones en la morfología (ii) Densidad reducida	(i) Alteraciones en la morfología (ii) Densidad reducida
Densidad sináptica		(i) Reducida

		(i) Aumento del número de sinapsis inhibitorias (ii) Disminución del número de sinapsis excitatorias (iii) Redistribución de las sinapsis inhibitorias (iv) Aumento del número de interneuronas GABAérgicas
Inhibición		
Electrofisiología	(i) Anomalías EEG (ii) Alteraciones en los potenciales evocados	Alteraciones en la LTP y en la LTD hipocampal
GABA	Reducido en fetos	(i) Incremento del número de interneuronas GABAérgicas (ii) Alteraciones en la composición de los receptores GABA _A
Neurotransmisores excitatorios	Niveles disminuidos de glutamato y aspartato en adultos	Alteraciones en la vía de señalización del receptor NMDA
Neuroinflamación	(i) Microglía sobreactivada (ii) Aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias	Microglía sobreactivada
Estrés oxidativo	Aumentado	Aumentado
Neuropatología EA	(i) Pérdida de neuronas colinérgicas (ii) Placas de β -amiloide y ovillos neurofibrilares	(i) Degeneración de las neuronas colinérgicas (ii) Niveles de App y β -amiloide elevados

3.3 Modelos transcromosómicos que contienen parcialmente el cromosoma HSA21

El **Tc1** es un modelo trisómico portador de una copia extra casi completa (aproximadamente del 90%) del HSA21 humano (O'Doherty *et al.*, 2005). Este ratón muestra malformaciones cardíacas similares a las observadas en personas con SD, así como los déficits de aprendizaje y memoria característicos de este síndrome (O'Doherty *et al.*, 2005). Sin embargo, tiene el inconveniente de presentar unos niveles variables de mosaicismo, siendo impredecible su distribución en los tejidos o las variaciones entre animales.

3.4 Modelos transgénicos YAC/BAC/PAC

Los modelos descritos hasta ahora incluyen trisomías parciales portadoras de un amplio número de genes, lo que dificulta determinar la contribución específica de genes concretos. Como alternativa se generaron modelos a partir de cromosomas artificiales de levadura (*Yeast Artificial Chromosome*, YAC), de bacteria (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) y del bacteriófago P1 (*P1 bacteriophage Artificial Chromosome*, PAC) portadores de fragmentos cortos con unos pocos genes de la DSCR del HSA21 (Smith *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1995).

Así, el modelo **hYActg152F7**, que contiene 5 genes triplicados, entre los que se encuentra *DYRK1A*, presenta alteraciones en los procesos de aprendizaje y memoria e hiperactividad. Curiosamente, este ratón muestra un aumento en el volumen cerebral región-específico, sobre todo de la región ventral, incluyendo la región tálamo-hipotalámica, mostrando también una mayor densidad celular (Branchi *et al.*, 2004; Rachidi *et al.*, 2007; Sebride *et al.*, 2008). Además, el modelo **hYActg230E8**, con 7 genes sobreexpresados, incluyendo también *DYRK1A*, presenta un incremento en el tamaño del cerebelo (Rachidi *et al.*, 2007).

Por otro lado, el modelo **hYActg141G6**, que contiene varias copias extras de los mismos genes que el hYActg152F7 a excepción de *DYRK1A*, no muestra alteraciones cerebrales o cognitivas (Guedj *et al.*, 2009), lo que sugiere que la sobreexpresión de *DYRK1A* colabora profundamente en la patología del SNC asociada al SD.

3.5 Modelos transgénicos y de pérdida de función de genes únicos

Los modelos animales que presentan tanto haploinsuficiencia como copias extras de ciertos genes del HSA21 o sus homólogos en ratón o rata son una gran herramienta para profundizar en sus funciones fisiológicas concretas, pudiéndose de esta forma estudiar su contribución a los distintos fenotipos del SD. Así pues, son muchos los modelos transgénicos de este tipo, como el TgAPP (Harris-Cerruti *et al.*, 2004), el TgSOD1 (Gahtan *et al.*, 1998) o el TgEts2 (Sumarsono *et al.*, 1996) que sobreexpresan *APP*, *SOD1* y *Ets2* respectivamente. En cuanto a *Dyrk1A*, el gen cuya contribución fenotípica al SD es objeto de estudio en el presente trabajo, son varios los modelos

manipulados genéticamente *in vivo* que han sido generados para su estudio. A continuación se profundizará brevemente en ellos.

3.5.1 Modelos de ganancia de función de *Dyrk1A*

El modelo **hBACtgDYRK1A** (*DYRK1A* BAC), que sobreexpresa únicamente el gen *DYRK1A* humano, presenta alteraciones en su memoria y aprendizaje y una plasticidad sináptica deficiente tanto en su LTP como en su LTD (Ahn *et al.*, 2006). Además, el cerebro de estos animales también presenta hiperfosforilación de Tau, un incremento en la fosforilación de App y el aumento de los niveles de A β cerebrales (Ryoo *et al.*, 2008; Ryoo *et al.*, 2007).

Recientemente se ha generado el ratón **mBACtgDyrk1A**, un nuevo modelo BAC que sobreexpresa una copia del gen *Dyrk1A* murino (Guedj *et al.*, 2012). Este ratón presenta una reducida viabilidad y un retraso en su desarrollo, ya que muestra una disminución del peso y la longitud corporal hasta la edad de 30 días. A nivel cerebral su hipocampo, tálamo, algunos ventrículos, las capas II/III, V y VI de la corteza somatosensorial y la corteza entorrinal mostraron un volumen mayor respecto a los individuos con un número normal de copias. Sin embargo, no se encontraron alteraciones en el tamaño cerebelar. El ratón mBACtgDyrk1A también presenta variaciones en la densidad celular específicas para cada región. Además, estos animales presentaban alteraciones en los niveles de diversas proteínas relacionadas con el control del ciclo celular y con la neuritogénesis y sinaptogénesis en su corteza cerebral. Los ratones mBACtgDyrk1A también muestran un incremento en el número de espinas en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, una plasticidad sináptica deficitaria (Thomazeau *et al.*, 2014), un desequilibrio en el balance excitador/inhibidor y déficits motores y en el aprendizaje y memoria espacial (Souchet *et al.*, 2014).

Otro modelo murino de sobreexpresión de *Dyrk1A* es el ratón **TgDyrk1A** que contiene cDNA del gen *Dyrk1A* de rata (Altafaj *et al.*, 2001). Este ratón presenta numerosas alteraciones cognitivas y conductuales, como el retraso en la adquisición de la actividad locomotora adulta, alteraciones en la coordinación motora, hiperactividad en condiciones aversivas y déficits de aprendizaje y memoria (Altafaj *et al.*, 2001;

Martinez de Lagran *et al.*, 2004). Recientemente se ha relacionado la sobreexpresión de *Dyrk1A* de este modelo con la modificación del número de neuronas motoras colinérgicas y la unión neuromuscular, lo que estaría relacionado con las alteraciones motoras encontradas en este ratón (Arque *et al.*, 2013). En cultivos celulares de neuronas piramidales de la corteza cerebral de este ratón se han encontrado alteraciones en la formación de neuritas y la sinaptogénesis (Martinez de Lagran *et al.*, 2012). Además, el ratón *TgDyrk1A* muestra alteraciones importantes en la neurogénesis adulta, como una reducción en la tasa de proliferación celular, una progresión del ciclo celular defectuosa, una migración y diferenciación neuronal alteradas y una reducción en la supervivencia de las células.

3.5.2 Modelo de pérdida de función de *Dyrk1A*

Los ratones que no contienen ningún alelo funcional de *Dyrk1A* (*Dyrk1A*^{-/-}) no son viables ya que fallecen en estadios embrionarios tempranos. Sin embargo, los ratones heterocigotos para *Dyrk1A* (*Dyrk1A*^{+/-}), con un único alelo funcional, sobreviven, aunque su viabilidad postnatal está reducida en aproximadamente un 30% y presentan un importante retraso en el desarrollo (Fotaki *et al.*, 2002). El cerebro de estos ratones muestra una reducción de tamaño, aunque no de forma homogénea, ya que la disminución del mesencéfalo y el romboencéfalo es más pronunciada en comparación con el prosencéfalo. Además, las regiones ventrales están más afectadas, incluyendo al hipotálamo, el puente troncoencefálico y el bulbo raquídeo, en comparación con las estructuras dorsales, como el cerebelo o la neocorteza. Aunque la citoarquitectura y los componentes neuronales no están alterados en la mayoría de sus regiones cerebrales, la densidad celular de algunas zonas es mayor, mientras que el número de neuronas en el colículo superior es menor. El fenotipo de sus células piramidales de la corteza está alterado, encontrándose reducido el tamaño celular y de sus árboles dendríticos así como el número de sus espinas (Benavides-Piccione *et al.*, 2005).

En cuanto a su comportamiento, el ratón *Dyrk1A*^{+/-} muestra un leve retraso en el desarrollo de algunos reflejos, una marcada hipoactividad, un deterioro en el desarrollo neuromotor y una profunda alteración de parámetros motores específicos en estadios adultos (Fotaki *et al.*, 2002; Fotaki *et al.*, 2004). Además, estos ratones

también presentan un deterioro cognitivo en el desarrollo de estrategias espaciales y en la memoria de reconocimiento (Arqué *et al.*, 2008). En edades avanzadas, estos animales presentan marcadas alteraciones motoras en la capacidad de tracción, el reflejo prensil, el equilibrio y un ligero deterioro de la memoria visuo-espacial a pesar de mostrar una disminución de células del CA1-CA3 y el DG (Arque *et al.*, 2009).

La reducción del número de copias de *Dyrk1A* en este ratón también afecta a las neuronas dopaminérgicas nigroestriales reduciendo su número en edades avanzadas y alterando los mecanismos reguladores de la muerte celular durante el desarrollo, hecho que sugiere que este gen podría tener un papel en los trastornos motores ligados a patologías dopaminérgicas. Es por esta razón por lo que actualmente este ratón también constituye un modelo de estudio de la enfermedad de Parkinson (Barallobre *et al.*, 2014; Martinez de Lagran *et al.*, 2007).

Objetivos

La presente tesis doctoral tiene como **principal objetivo** determinar el papel del gen *Dyrk1A* en los principales fenotipos del SD a través del análisis del efecto de la normalización de su dosis en el ratón TS. El **segundo objetivo** consiste en caracterizar la función fisiológica del gen *Dyrk1A* mediante el estudio de diversos fenotipos en animales euploides cuya dosis del gen fue reducida a una única copia.

Los objetivos concretos son:

1. Evaluar el **efecto cognitivo** de la normalización de la dosis de *Dyrk1A* en el modelo TS y de su haploinsuficiencia en animales euploides mediante el análisis de la capacidad de aprendizaje asociativo, de aprendizaje y memoria espacial y de atención.
2. Estudiar el efecto de ambas modificaciones genéticas sobre la **actividad general** y la **ansiedad**.
3. Analizar el efecto sobre el **patrón conductual** incluyendo los reflejos sensoriales, la actividad espontánea y la coordinación motora.
4. Determinar los mecanismos subyacentes a los fenotipos cognitivo-conductuales encontrados mediante:
 - 4.1. La valoración de la plasticidad sináptica de los animales a través del estudio de su **LTP hipocampal**.
 - 4.2. El análisis de su **fenotipo morfológico e histológico hipocampal** incluyendo el análisis morfométrico y la determinación de células proliferativas, células en estadios tempranos de diferenciación, así como la densidad celular total y el balance excitador/inhibidor de su DG.
 - 4.3. El estudio del **fenotipo morfológico e histológico cerebelar** comprendiendo el examen anatómico de esta estructura y el análisis de la densidad granular y de células de Purkinje.
5. Por último, valorar el efecto de la dosis de *Dyrk1A* sobre el **proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento** mediante el estudio de la degeneración de los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal, la expresión de la proteína App y el acúmulo del péptido neurotóxico A β 42 en diversas áreas cerebrales.

Material y métodos

1. Animales de experimentación

1.1 Manipulación y mantenimiento de los animales

Los estudios realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria. Su manipulación y cuidado fueron llevados a cabo respetando la Declaración de Helsinki y la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea (86/609/EEC).

Los ratones se estabularon en grupos de dos o tres, en jaulas transparentes de Plexiglás (20 x 22 x 20cm) en condiciones estándar de laboratorio, a una temperatura de 22 ± 2 °C, un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad y acceso a comida y agua *ad libitum*. El ciclo luz/oscuridad se invirtió (luz apagada a las 8:00 A.M. y encendida a las 8:00 P.M), de modo que los estudios de comportamiento se llevaron a cabo durante el período activo de los ratones.

1.2 Obtención del modelo animal

Todos los apareamientos se llevaron a cabo en el Servicio de Estabulación y Experimentación de la Universidad de Cantabria.

En primer lugar, las hembras TS parentales se obtuvieron cruzando hembras TS suministradas por The Robertsonian Chromosome Resources (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) con machos híbridos C57BL/6Ei-C3H/HeSNJ (B6EiCSn) F1.

Estas hembras se cruzaron con machos diploides portadores de una copia mutante no funcional del gen *Dyrk1A* que fueron generados y cedidos por el laboratorio de Mariona Arbonés (Institut de Biologia Molecular de Barcelona, IBMB). El fondo genético de estos animales es C57BL/6J-129Ola, donde el alelo *Dyrk1A* deficiente carece de un fragmento que fue reemplazado con el gen de resistencia a la neomicina mediante recombinación homóloga (Fotaki *et al.*, 2002).

Para la realización de este trabajo se cruzaron ratones diploides haploinsuficientes para el gen *Dyrk1A* con hembras TS. Como resultado se obtuvieron cuatro genotipos distintos que fueron objeto de estudio: individuos euploides con dos copias funcionales del gen *Dyrk1A* (CO +/+), animales euploides pero haploinsuficientes para el gen *Dyrk1A* (CO +/-), individuos trisómicos parciales para el cromosoma MMU16 con

3 copias funcionales de diversos genes incluido el gen *Dyrk1A* (TS +/++) y, por último, ratones trisómicos para los mismos genes que el grupo TS +/+ pero con sólo dos copias funcionales de *Dyrk1A* (TS +/-); todos ellos con un fondo genético híbrido C57BL/6J-129Ola.

1.3 Cariotipado y genotipado de los animales

1.3.1 Preparación de las muestras

El ADN genómico necesario para el cariotipado y genotipado de los animales se consiguió mediante la digestión de fragmentos de cola de ratón. Así, muestras de aproximadamente 2 mm fueron recogidas en el momento del destete de los animales (día posnatal 21) y colocadas en un tubo de 1.5 ml tipo Eppendorf. Se añadieron 300 µl de NaOH 50mM y se incubaron durante 30 minutos en un bloque seco a 98°C. Las muestras se agitaron y se volvieron a incubar durante 30 minutos a 98°C. Se repitió este último paso hasta conseguir una digestión completa. Una vez terminada la digestión se añadieron 30 µl de Tris 1M (pH=8) para neutralizar la reacción. A continuación se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 r.p.m. (revoluciones por minuto) en una centrifuga Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hanau, Alemania) y se recogió el sobrenadante. Finalmente se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermoscientific, Waltham, MA, USA) (A260) y se diluyó en H₂O miliQ hasta una concentración de 20ng/µl si iban a ser usadas para PCR cuantitativa en tiempo real (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) y a 100ng/µl para PCR convencional.

1.3.2 Cariotipado mediante qPCR cuantitativa

Con el fin de discernir entre ratones diploides (CO) y trisómicos (TS) los animales fueron cariotipados mediante qPCR utilizando el protocolo descrito por Liu *et al.* (2003). Como marcadores fueron empleados los genes codificantes para la proteína App y de resistencia a Mixovirus 1 (Mx1). Ambos se encuentran situados cerca de los extremos proximal y distal, respectivamente, del segmento del cromosoma MMU16 y, por tanto, son susceptibles de estar triplicados. Como gen de referencia se utilizó el gen de la apolipoproteína B (*ApoB*) que está situado en el cromosoma murino MMU12

y, por consiguiente, siempre está presente en doble dosis en todos los animales del estudio.

La amplificación del ADN genómico de cada animal se llevó a cabo utilizando cebadores sentido y antisentido específicos y sondas de tipo TaqMan. Para cuantificar simultáneamente el número de copias de un gen problema y las del de referencia se utilizaron fluorocromos con longitudes de onda diferentes: HEX para el gen *ApoB* y FAM para *App* y *Mx1*. La reacción efectuada por cada par de genes a comparar fue la siguiente: 8 µl de ADN genómico diluido a 20 ng/µl (160ng/pocillo), 10 µl de 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA), 0.2 µl de cada cebador del gen problema a una concentración de 40 µM (Metabion, Martinsried, Alemania), 0.2 µl 40 µM de cada cebador del gen control y 0.6 µl de cada sonda a una concentración de 5 µM (Applied Biosystems).

Tabla 3. Cebadores y sondas de tipo TaqMan utilizadas para la qPCR

	<i>App</i>	<i>Mx1</i>	<i>ApoB</i>
Cebador	5'-TGC TGA AGA TGT	5'-TCT CCG ATT AAC CAG	5'-CAC GTG GGC TCC
Sentido	GGG TTC GA-3'	GCT AGC TAT-3'	AGC ATT-3'
Cebador	5'-GAC AAT CAC GGT TGC	5'-GAC ATA AGG TTA GCA	5'-TCA CCA GTC ATT
Antisentido	TAT GAC AA-3''	GCT AAA GGA TCA-3'	TCT GCC TTT G-3'
Sonda	5'- FAM -CAA AGG CGC CAT CAT CGG ACT CA- TAMRA-3'	5'- FAM -CTT TCC TGG TCG CTG TGC A- TAMRA-3'	5'- HEX -CCA ATG GTC GGG CAC TGC TCA A- TAMRA-3'

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mx3000P (Stratagene, CA, USA) utilizando placas de PCR de 96 pocillos (Teknovas, Bizkaia, España) y película adhesiva óptica MicroAmp (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación empleadas fueron: un primer ciclo a 50°C durante 2 minutos, un segundo ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Los resultados obtenidos con el programa MxPro-3005P se analizaron con el método $\Delta\Delta C_t$, representando la expresión génica relativa de cada uno de los genes *App* y *Mx1*,

normalizados con *ApoB*. La valoración de cada uno de los genes problema se determinó en dos experimentos independientes donde cada muestra se evaluó por duplicado dentro de una misma placa.

1.3.3 Genotipado de *Dyrk1A* por PCR y electroforesis en gel

Con el fin de diferenciar animales homocigotos portadores de alelos funcionales de *Dyrk1A* de los heterocigotos portadores de una copia nula se amplificó su ADN genómico mediante PCR. Se utilizó la combinación de cebadores NeoT (5' ATT CGC AGC GCA TCG CCT TCT ATC GCC 3'), MNB-IV sentido (5' AGA GTG GAG CAA GAA TGG GTC 3') y MNB-IV antisentido (5' CGT GAT GAG CCC TTA CCT ATG 3'). En primer lugar, se constituyó un *pool* con los diferentes cebadores (10 µl MNB-IV sentido 10 µM, 20 µl MNB antisentido 10 µM, 15 µl NeoT 10 µM y 55 µl H₂O). Para efectuar la amplificación, la reacción por muestra fue la siguiente: 13.3 µl de H₂O, 4 µl de dNTPs 2.5 mM (Takara, Otsu, Shiga, Japón), 2.5 µl de tampón 10x (Ex Taq Buffer, Takara), 0.2 µl Taq polimerasa (Ex Taq, Takara), 4 µl del *pool* de cebadores y 1 µl con 100 ng de ADN genómico. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 2 minutos a 95°C, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 61°C y 30 segundos a 72°C, y finalmente 10 minutos a 74°C y a continuación se mantuvieron a 4°C hasta la recogida de las muestras. Los tamaños de los diferentes productos de amplificación se discriminaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, que contenía 1.5 g de agarosa, 100 ml de TBE 0.5% (5 g/l de Tris; 2.752 g/l de ácido bórico; 2 ml de EDTA 0.5M pH 8) y 4.5 µl de Red Safe (Intron Biotechnology, Seoul, Korea). Como tampón de carga se utilizó una solución 6X consistente en glicerol 30 % y azul de bromofenol 0.025 % en H₂O. Para determinar el peso molecular de cada banda se cargaron 5 µl de marcador genético (Gen Ruler Low Range DNA Ladder, Ready to Use, Fermentas, Vilna, Lituania) en una calle del gel. El revelado del gel se realizó con el lector Gel Doc (Gel Doc XR system, Bio Rad) acoplado a un ordenador con el software *Quantity One* (Bio Rad). Los tamaños de los productos de PCR resultantes fueron: una banda de 150 pb para *Dyrk1A* normal y de 350 pb para el mutante inactivo. Por lo tanto, los animales homocigotos CO *+/+* y TS *+/+/+*, con dos y tres copias funcionales del gen respectivamente, mostraban una única banda de 150 pb, mientras que los animales CO *+/-* y TS *+/+/-* portadores de una copia no funcional presentaban dos bandas,

una de 150 pb correspondiente al alelo normal, y una de 350 pb representativa del alelo no funcional (figura 5).

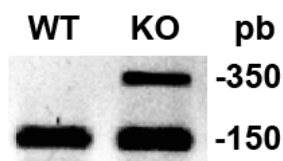


Figura 5. Bandas representativas encontradas en los distintos genotipos de *Dyrk1A*.

1.3.4 Genotipado de la mutación *Rd* por PCR y electroforesis en gel

Dado que un porcentaje de ratones C3H/HeSnJ contienen una mutación recesiva del gen *Pdeb*, denominada *Rd*, que produce degeneración retiniana, todos los animales fueron genotipados por PCR estándar para detectar individuos homocigotos para esta mutación (Bowes *et al.*, 1993). Los sujetos con este genotipo fueron omitidos de la experimentación.

La metodología de amplificación fue similar a la descrita en el apartado anterior. Los cebadores sentido y antisentido fueron 5'CAT CCC ACC TGA GCT CAC AGA AAG 3' y 5'GCC TAC AAC AGA GGA GCT TCT AGC 3' respectivamente. La reacción por cada muestra constó de: el volumen de ADN necesario para alcanzar una cantidad de 50–100 ng de ADN genómico; 16.4 – x µl (en función del volumen de disolución de ADN añadido) de H₂O; 4 µl de dNTPs 2.5 mM (dNTP mix, Takara); 2.5 µl de tampón 10x (10x Ex Taq Buffer, Takara); 1 µl de cada cebador y 0.1 µl de Taq Polimerasa (Ex Taq, Takara). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 35 ciclos de 3 minutos a 96°C, 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 58°C, 45 segundos a 74°C y 10 minutos a 74°C. Se comprobó la correcta amplificación con una electroforesis en gel de agarosa al 2%. El tamaño de la banda esperado para los genes *Pdeb/Rd* es de 298 pb. A continuación se procedió a la digestión enzimática del amplicón con el enzima de restricción Dde I (*Desulfovibrio desulfuricans* *enzyme* I). Para ello, a cada 8 µl del producto de la PCR se añadieron 0.5 µl del enzima Dde I (10 U/µl; Roche diagnostics, Mannheim, Alemania); 1 µl de tampón 10x para enzimas de restricción (Sure/Cut Buffer H for Restriction enzymes, Roche diagnostics) y 0.5 µl de H₂O. La digestión se realizó durante 24h a 37°C. Se incluyó un control negativo en el que se sustituyó el enzima Dde I por H₂O y por tanto carente de digestión. Finalmente se realizó una

electroforesis en un gel de agarosa al 2% con todos los productos. El gen mutado *Rd* presenta distintos puntos de digestión que no presenta la versión normal *Pdeb*. Así, los tamaños de banda esperados eran los siguientes: 298 pb para el control negativo, 289 para el gen normal y 3 bandas de 136, 105 y 47 pb para el gen mutado *Rd* (figura 6).

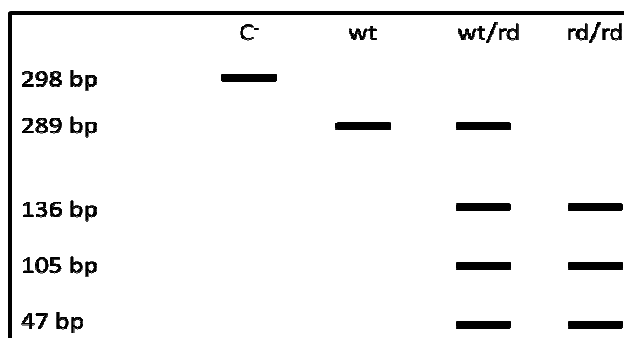


Figura 6. Bandas representativas encontradas en los distintos genotipos.

1.4 Grupos experimentales

Para evaluar la contribución fenotípica del gen *Dyrk1A* en los cuatro genotipos descritos anteriormente (CO +/+, CO +/-, TS +/+/, TS +/-/-) se utilizaron 3 cohortes (tablas 4 y 5). Una, de aproximadamente 6 meses de edad, destinada a evaluar aspectos cognitivo-conductuales, diversos parámetros morfológicos (anatómicos y celulares), y los niveles proteicos del gen *Dyrk1A* en los distintos genotipos. Se empleó una segunda cohorte de animales de la misma edad en el análisis electrofisiológico de la LTP hipocampal. Finalmente una tercera, de aproximadamente 13 meses de edad, se utilizó para el estudio de la influencia de la dosis génica de *Dyrk1A* en distintos procesos neurodegenerativos asociados al envejecimiento del SD.

Tabla 4. Cohortes empleadas en el presente trabajo.

1ª Cohorte	2ª Cohorte	3ª Cohorte
• Pruebas cognitivo-conductuales • Inmunohistoquímica • Morfometría • Western blot Dyrk1a	• Electrofisiología	• ELISA β42 • Western blot App

Tabla 5. Número de animales empleados en cada estudio.

Cohorte	Edad	Experimento	CO +/+	CO +/-	TS +/+/+	TS +/+/-
I	5-6 meses	Pruebas conductuales	12	12	12	12
	6-7 meses	Inmunohistoquímica hipocampal	6	5	6	6
		Inmunohistoquímica cerebelar	8	7	8	8
		Western blot Dyrk1A	6	6	6	6
II	5-6 meses	Electrofisiología	6	6	6	6
III	13 meses	ELISA Aβ42	6	6	6	6
		Western blot App	6	6	6	6

2. Viabilidad de los genotipos y somatometría

La viabilidad de los distintos grupos experimentales se examinó en función del número de individuos que nacieron en cada camada. Se evaluaron un total de 100 animales machos procedentes de aproximadamente 35 camadas que fueron agrupados según su genotipo. La viabilidad de cada grupo se expresó como porcentaje respecto al total de individuos. Para valorar las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se usó la prueba de χ^2 .

El efecto del genotipo sobre el peso de los animales se evaluó en 20 ratones macho de cada grupo. Los animales fueron pesados mensualmente desde el momento de su destete hasta los 5 meses de edad. Los datos obtenidos en cada grupo experimental fueron representados en curvas de crecimiento y comparados entre sí mediante MANOVAs de medidas repetidas (MR) seguidos de pruebas de Bonferroni.

3. Caracterización cognitivo-conductual

Para reducir el estrés de los animales, todos los estudios se llevaron a cabo en un laboratorio separado espacialmente de la zona de estabulación y en la misma franja horaria. Además, las pruebas conductuales se sucedieron gradualmente de menor a mayor nivel de estrés. Todas las pruebas se realizaron a ciegas con respecto al genotipo con el fin de prevenir posibles sesgos.

3.1 Reflejos sensoriales y función motora

Para valorar las habilidades sensoriales y motoras de los animales se realizó una batería de pruebas siguiendo el procedimiento descrito por Escorihuela *et al.* (1995).

a) Respuesta de alcance

Mediante esta prueba se valoró la función del cerebelo, sistema vestibular y laberíntico de los animales. Consistió en sujetar suavemente al ratón por la cola y, desde una altura de 10-15 cm, acercarlo a una superficie lisa. Se valoró el momento en que el animal extendía las patas delanteras otorgando una puntuación de: (4) si el animal las extendía en cuanto se iniciaba el acercamiento a la superficie, (3) si las extendía antes de contactar con los bigotes en la superficie, (2) si lo hacía después de que los bigotes contactaran, (1) si las extendía tras el contacto del morro con la superficie y (0) si no las extendía.

b) Prueba de sensibilidad táctil

Esta prueba evalúa la sensibilidad táctil a partir de la reacción refleja al roce de los bigotes. Se realizaron tres ensayos en los que se pasaba un bastoncillo de algodón por los bigotes del ratón. Se puntuó (1) cuando el animal colocaba la pata ipsilateral en el bigote estimulado por el bastoncillo y (0) cuando no lo hacía. La puntuación máxima fue de (3).

c) Respuesta de sobresalto

Mediante esta prueba se evaluó la respuesta a un estímulo auditivo. Para ello se colocó el animal en una jaula limpia y se golpearon dos elementos metálicos a una distancia de 10 cm por encima de su cabeza. Se otorgó una puntuación de (3) si el animal presentaba una respuesta positiva y saltaba más de 1 cm, (2) si el salto era de menos de 1 cm, (1) si aparecía el reflejo de sobresalto (reflejo de Preyer), que consiste en retraer el pabellón auditivo, y (0) si no respondía en absoluto.

d) Reflejo de enderezamiento

Para evaluar posibles alteraciones vestibulares se colocó al animal sobre una superficie situada a 10 cm de altura. Cogiendo al animal por la cola, se realizó un giro de 180°

dejándole caer sobre una superficie blanda. Se evaluó la capacidad del ratón de enderezarse en el aire y caer sobre las cuatro patas. Se otorgó una puntuación de (0) si caía sobre las cuatro patas, (1) si caía sobre un lado, (2) si caía de espaldas y (3) si no se daba la vuelta al ser colocado de espaldas sobre una superficie plana (reflejo de enderezamiento en superficie).

e) Fuerza de agarre

Para esta prueba se utilizó una rejilla de barras de acero inoxidable situada de manera que presentara una inclinación de 45°. Se colocó al ratón sobre ella y se tiró suavemente de la cola valorando la fuerza con que el ratón se asía con las patas delanteras ejerciendo resistencia a ser separado de ella. Se puntuó (4) si el agarre era muy eficaz, (3) si se asía activamente, (2) si lo hacía de forma moderada, (1) si se agarraba levemente y (0) si no se agarraba.

f) Equilibrio

Para valorar el equilibrio se utilizaron dos tipos de barra que suponían grados diferentes de dificultad: una de madera plana de 50 cm de largo, 9 mm de ancho y 12 mm de grosor y una de aluminio redonda de 1 cm de diámetro y 50 cm de largo. Ambas barras se situaron a 40 cm del suelo sujetando los extremos con unos soportes de 2 x 2 cm² que permitían al ratón colocarse sobre ellos en el caso de alcanzar alguno de los extremos. En ambas barras se marcó una zona central de 10 cm. Se realizaron dos ensayos de 20 segundos en cada barra empezando por la de madera y con un período de 2-4 minutos entre los ensayos. El ratón se depositaba en el centro de la barra, con las cuatro patas sobre ella. En caso de caída se anotaba la latencia en segundos. La puntuación fue: (0) si el animal caía antes de 20 segundos, (1) si se mantenía en la barra sin salir de los límites centrales, (2) si salía de la zona central sin llegar a los extremos y (3) si llegaba a los extremos. La puntuación máxima para cada una de las barras fue de (6).

g) Reflejo prensil y capacidad de tracción

Ambos parámetros se valoraron en un mismo ensayo. Se colocó al ratón colgado por las patas delanteras en el centro de una percha metálica de 2 mm de diámetro y 40 cm

de longitud, a una altura de 32 cm del suelo (figura 7). Se realizaron 3 ensayos de 5 segundos de duración cada uno con un período interensayo de 1 minuto. La puntuación del reflejo prensil fue de (0) si el ratón se caía y de (1) si permanecía colgado durante los 5 segundos que duraba en ensayo. La puntuación máxima fue de (3). En la prueba de capacidad de tracción se otorgaba una puntuación de (0) si el animal no subía ninguna de las patas traseras a la barra, (1) si subía una pata, (2) si subía las dos patas y (3) si era capaz de alcanzar el extremo de la percha. La puntuación máxima fue de (9).

h) Coordinación motora: prueba de la percha

Se utilizó la misma percha que en la prueba anterior pero, en este caso, la barra horizontal se dividió en 8 zonas de 5 cm cada una (figura 7). Se situó al ratón en el centro de la barra colgado por las patas delanteras. Se hizo un único ensayo de 60 segundos en el que se midieron: la latencia de caída, el número de desplazamientos (se consideró desplazamiento cuando el ratón cruzaba una de las zonas marcadas) y la latencia en llegar a uno de los extremos.



Figura 7. Prueba de equilibrio sobre barra de madera (A) y de aluminio (B). Prueba de la percha (C).

i) Coordinación motora: rotarod

Esta prueba se utilizó para evaluar la coordinación motora de los animales siguiendo el protocolo descrito por Sango *et al.*, (1995). Para ello se utilizó un rotarod (Ugo Basile, Comerio, VA, Italia) que consta de un rodillo de plástico de 37 cm de longitud y superficie estriada, dividido por 6 discos de plástico que permiten medir la ejecución de 5 animales a la vez (figura 8). Este aparato gira a distintas velocidades y tiene incorporados cinco contadores individuales de tiempo que se detienen cuando el animal cae del rodillo.

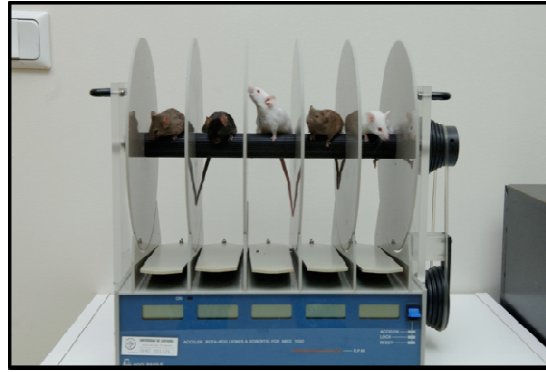


Figura 8. Prueba de coordinación motora en el rotarod

Se llevaron a cabo seis ensayos en una única sesión. El primer ensayo consistió en un entrenamiento en el que el animal debía mantenerse sobre el rodillo durante 60 segundos a una velocidad de 5 r.p.m., si el animal caía antes de completar este tiempo se volvía a colocar en el aparato hasta que se mantenía sobre el rodillo durante los 60 segundos. A continuación se realizaron otros cinco ensayos a velocidades de 10, 20, 30 y 50 r.p.m. respectivamente. El tiempo máximo de permanencia fue de 60 segundos. El último ensayo consistió en un ciclo de aceleración en el que el rodillo iba girando progresivamente a más velocidad (hasta llegar a un máximo de 50 r.p.m.). El tiempo máximo de permanencia permitido fue de 300 segundos (coincidiendo con el momento en el que se alcanzaba la velocidad máxima).

3.2 Actividad espontánea: actimetría

En esta prueba se evaluó la variación circadiana de la actividad locomotora espontánea de los animales durante un ciclo completo de luz-oscuridad mediante unos actímetros (Inframot, TSE, Thuringia, Alemania). El sistema TSE InfraMot está diseñado para registrar la actividad a lo largo del tiempo detectando la radiación infrarroja que emite el cuerpo de los animales al desplazarse espacialmente. Se registró la actividad total de los animales durante un ciclo continuo de 24 horas (12 horas de luz y 12 de oscuridad) en su jaula habitual. Se midió la actividad de 4 jaulas simultáneamente; una jaula bajo cada unidad sensora. Durante el tiempo que duró la recogida de datos se mantuvo la sala en silencio para evitar interferencias externas con la actividad. Se obtuvo un índice de actividad para cada animal por hora.

3.3 Actividad general y ansiedad: campo abierto y laberinto en cruz

a) Campo abierto

Para estudiar la actividad general y la ansiedad en el campo abierto se siguió el procedimiento descrito por Escorihuela *et al.*, (1995).

El campo abierto consistía en una superficie cuadrada de 55 cm de lado rodeada por paredes de 25 cm de altura, fabricado en madera de color blanco (figura 9). En una única sesión de 5 minutos se midió la actividad horizontal (distancia recorrida en el centro y en la periferia del aparato, tiempo en ambas zonas y velocidad del animal durante la prueba) y vertical (incorporaciones o número de veces que el ratón se endereza sobre sus patas traseras). El aparato se iluminó con dos fuentes de luz para someter al animal a una situación estresante. Todos los ensayos fueron grabados en video y posteriormente analizados con el programa de análisis de imagen Anymaze (ANY-maze®, Stoelting CO, USA).

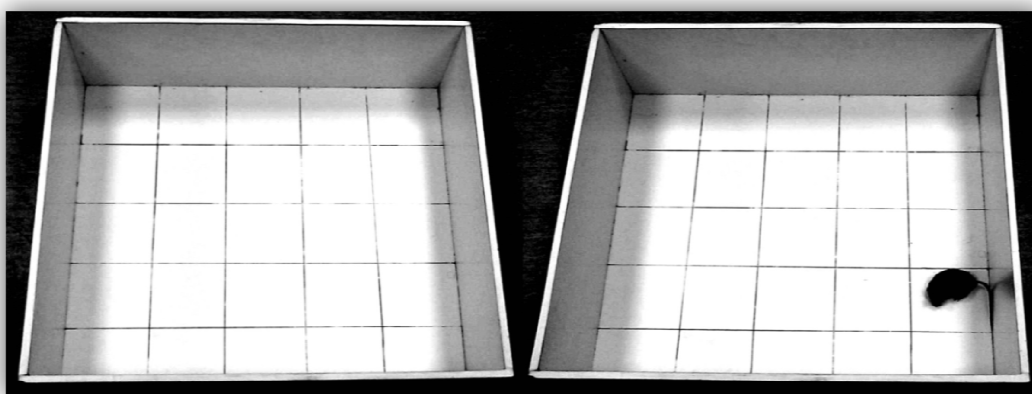


Figura 9. Prueba del campo abierto.

b) Laberinto elevado en cruz

Para valorar distintos parámetros relacionados con la ansiedad utilizamos la prueba del laberinto elevado en cruz siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Cué *et al.*, (2005). Este aparato está formado por dos brazos abiertos (5 cm de ancho x 30 cm de largo) y dos cerrados con láminas de metacrilato (5 cm de ancho x 30 cm de largo) elevados a 40 cm sobre el suelo (figura 10). La prueba consistió en un único ensayo de 5 minutos en el que se colocó al ratón en el centro del aparato y se contabilizaron el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados.

Como criterio se consideró que la entrada a cada brazo se debía producir con las 4 patas. Por otro lado se analizaron los componentes cognitivos de la ansiedad, es decir, las conductas de evaluación de riesgo que realizaron los animales, como son el número de alzamientos (*rearings*), las conductas de aproximación-retirada desde las zonas protegidas del laberinto (*stretchings*) y el número de veces que asomaban la cabeza por los brazos abiertos (*head-dippings*). Todos los ensayos fueron grabados en video y posteriormente se analizó la distancia recorrida en brazos abiertos y cerrados y la velocidad de cada animal con el programa de análisis de imagen Anymaze.



Figura 10. Prueba del laberinto elevado en cruz. En la imagen se observa al animal realizando un head-dipping (A), entrando en un brazo abierto (B) y realizando una conducta de aproximación-retirada (C).

3.4 Atención y actividad exploratoria: tabla de agujeros

Se evaluó la actividad exploratoria en la tabla de agujeros siguiendo el protocolo previamente descrito por Martínez-Cué *et al.*, (2002). Para ello se utilizó una caja de madera (32 x 32 x 30 cm) con cuatro agujeros equidistantes de 3 cm de diámetro (figura 11). Dos de los agujeros contenían objetos (una llave, un trozo de cuerda, una arandela de plástico) y dos estaban vacíos. En un único ensayo de 5 minutos se midieron: el número de exploraciones, es decir, las veces que el animal metía la cabeza en los agujeros (número de head-dippings), el tiempo que exploraba cada agujero, y la actividad general en el aparato: la distancia recorrida y el número de incorporaciones. Para evaluar la atención de los animales se calculó el número de repeticiones de exploraciones de agujeros previamente explorados (índice ABA).

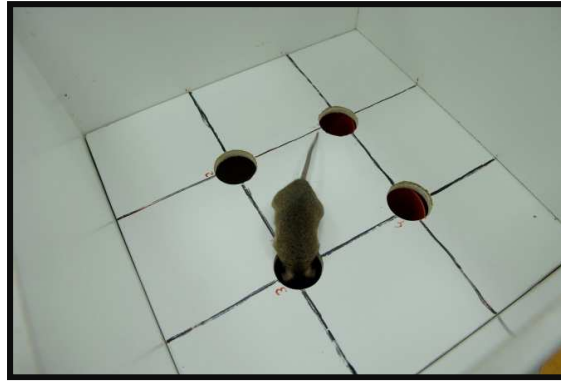


Figura 11. Prueba de la tabla de agujeros. En la imagen se observa un animal realizando una exploración o head-dipping.

3.5 Aprendizaje y memoria espacial: laberinto acuático de Morris y test de condicionamiento del miedo

a) Laberinto acuático de Morris

La valoración del aprendizaje y la memoria espacial se realizó utilizando una versión modificada del laberinto acuático de Morris (Morris, 1984). Este experimento permite evaluar distintos aspectos del aprendizaje espacial tales como la memoria de trabajo y la memoria a largo plazo o de referencia, examinando la latencia de escape del animal, o el aprendizaje procedimental, estudiando en este caso el patrón espacial de búsqueda. El análisis de la ejecución de los ratones a lo largo de los ensayos (la media de cada ensayo en las 8 sesiones) proporciona una medida de memoria de trabajo porque el animal busca la plataforma en los primeros ensayos, codifica su localización y la recuerda durante el resto de los ensayos de cada sesión. Por lo tanto, para una ejecución adecuada es necesaria la recuperación de la información recientemente adquirida o memoria de trabajo (Olton y Papas, 1979). Por otro lado, en cada nueva sesión el animal debe aprender una nueva localización de la plataforma, por lo tanto el análisis de la ejecución de los ratones a lo largo de las sesiones (la media de todos los ensayos de cada sesión) proporciona una medida de la memoria de referencia. Según van progresando las sesiones el animal debe construir una representación estable del entorno, es decir, un mapa de coordenadas, que puede ser considerado como el componente de memoria de referencia de la tarea, diferente de la representación de la posición más reciente en la que la plataforma estaba situada. Por último, a lo largo de las sesiones el animal debe aprender a inhibir conductas inadecuadas, como nadar

cerca de las paredes del tanque (tigmotaxis) y elegir una estrategia para buscar la plataforma en el tanque; esto constituiría el aprendizaje de procedimiento.

El aparato consistió en un tanque metálico circular de 120 cm de diámetro que contenía agua teñida con dos litros de leche hasta una altura de 25 cm y a una temperatura constante de 22-24°C. En el interior del tanque se colocó una plataforma de metacrilato transparente de 9 cm de lado situada a 22 cm de la pared del tanque (figura 12). Cada dos sesiones se cambió el agua. El experimento consistió en ocho sesiones de adquisición, y cuatro sesiones de aprendizaje guiado (figura 13). A continuación se detalla el protocolo experimental.

Sesiones de adquisición

En las sesiones de adquisición (sesión 1 a la 8), la plataforma permaneció sumergida 2 cm por debajo del nivel del agua (figura 12 A). Durante estas sesiones, la posición de la plataforma varió cada día entre cuatro posiciones posibles (E, SO, centro y NO) (figura 13). En cada sesión de adquisición los animales realizaron 4 pares de ensayos con un total de 8 ensayos en cada una de estas posiciones. Al comienzo de cada ensayo se introducía al ratón en el agua con la cabeza mirando hacia la pared del tanque, y se le permitía nadar hasta localizar la plataforma durante un período máximo de 60 segundos. Si el ratón encontraba la plataforma, se le dejaba permanecer sobre ella durante 20 segundos, y en caso de no localizarla se sacaba al ratón del agua y se le situaba encima de ella durante el mismo período de tiempo. En cada par de ensayos el animal era introducido en el tanque de agua por una de las cuatro posiciones posibles (N, S, E, O) que se establecían al azar. Inmediatamente después del primer ensayo de cada par se volvía a introducir al animal en el tanque por la misma posición de entrada (segundo ensayo de cada par). Al finalizar el segundo ensayo de cada par el ratón se situaba en una jaula con serrín y cerca de una estufa durante 30 minutos. Dentro de una misma sesión, cada par de ensayos se realizó con un intervalo de 30-45 minutos entre ellos. Fuera del laberinto había varias señales visuales fijas, constantemente visibles desde el aparato. Para evaluar la memoria de trabajo se midió la latencia de llegada a la plataforma a lo largo de los 8 ensayos efectuados cada día, mientras que si este mismo parámetro se analiza a lo largo de las sesiones se puede medir la capacidad de memorizar información espacial a largo plazo. Se examinaron, además, otros

parámetros cognitivos como la eficiencia de la trayectoria de escape elegida, la velocidad de natación o la tendencia tigmotáctica. Todas estas valoraciones se llevaron a cabo con el programa Anymaze.

Sesiones de aprendizaje guiado

Para descartar la influencia de factores motivacionales o sensorimotrices que interfieran en la búsqueda de la plataforma se realizaron 4 sesiones de aprendizaje guiado. En este caso la plataforma era visible ya que el nivel de agua del tanque se situó 2 cm por debajo de la plataforma (figuras 12 B y 13). Además su posición se indicó mediante una bandera de 9 x 5 cm de colores llamativos, situada sobre un mástil de 10 cm de altura colocado en una de las esquinas de la plataforma. Se realizaron 4 sesiones (sesión 9 a la 12) de 4 pares de ensayos cada una. El procedimiento experimental fue idéntico al empleado en las sesiones de adquisición.

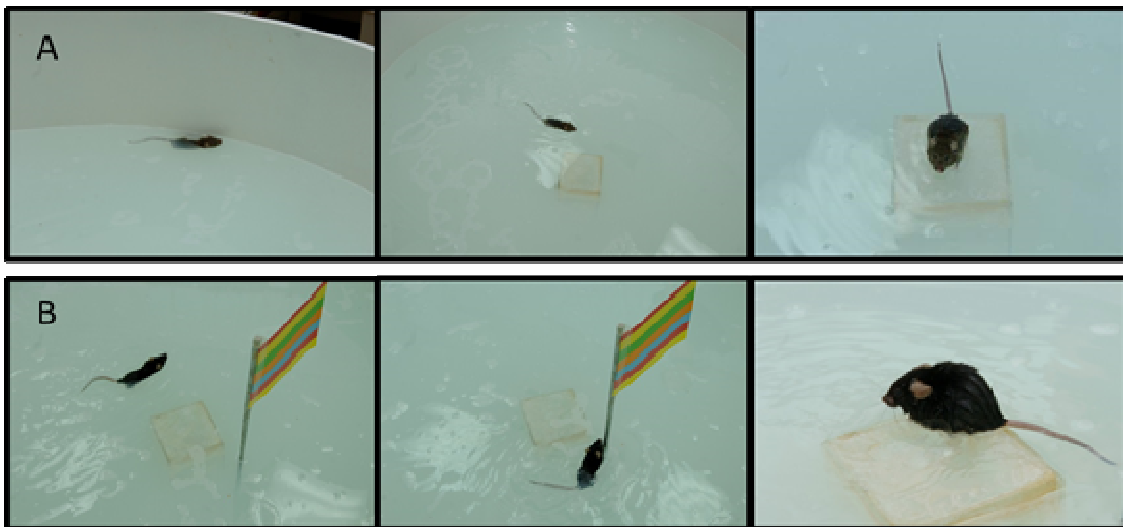
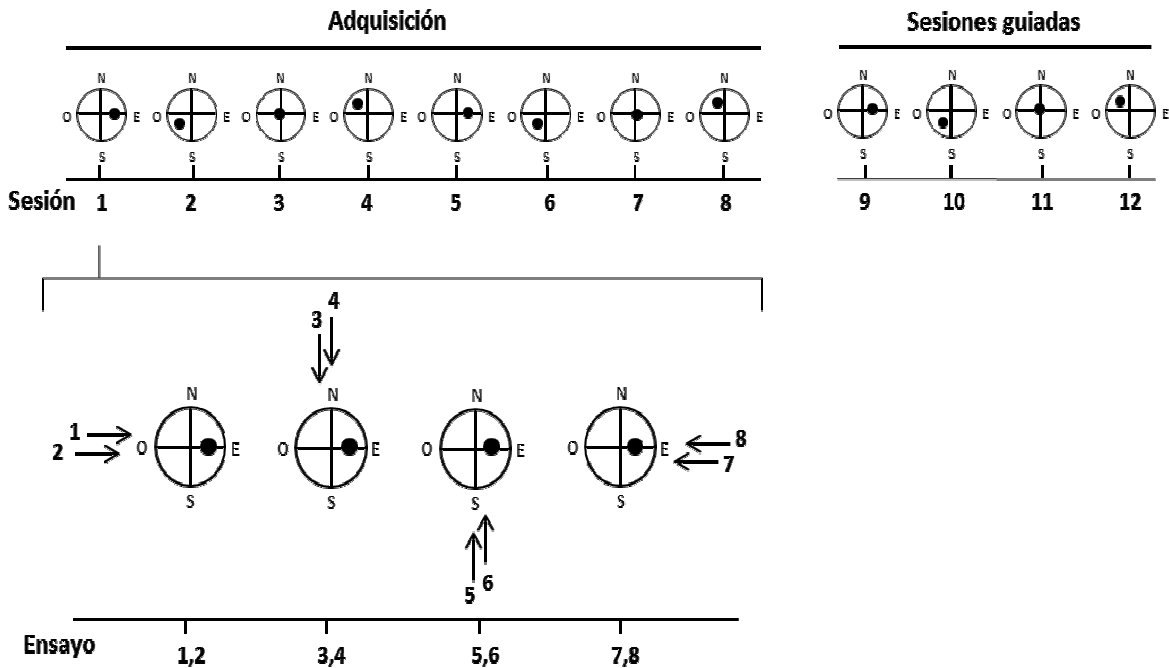


Figura 12. Prueba del laberinto acuático de Morris. Secuencia de una sesión de adquisición en la que el animal nada hasta encontrar la plataforma localizada 2 cm por debajo del nivel del agua (A). Secuencia en una sesión de aprendizaje guiado en la que la plataforma se encuentra por encima del nivel del agua y está señalada con una bandera (B).

Figura 13. Esquema del protocolo utilizado en la prueba del laberinto acuático de Morris.



b) Test de condicionamiento del miedo a un contexto

Esta prueba de condicionamiento tiene como objetivo medir la memoria de asociación entre un estímulo aversivo (descarga eléctrica en las patas) y otro neutro de naturaleza espacial (un contexto) y auditiva (un sonido). Tras varias asociaciones de los estímulos neutros con los estímulos aversivos, los ratones muestran un patrón conductual de inmovilización natural cuando se enfrentan al estímulo contextual o sonoro. Por tanto, el tiempo de inmovilización que los ratones muestran ante el contexto o el sonido condicionado es un índice de la memoria de asociación entre los estímulos.

Para realizar esta prueba se utilizó el protocolo descrito por Salehi *et al.* (2009) y se utilizó el sistema de condicionamiento del miedo Fear Conditioning Apparatus (Stoelting) y el programa de seguimiento de vídeo Anymaze. El aparato consistió en una urna de metacrilato de 18 x 18x 30 cm y un suelo de rejilla metálica a través del cual se pueden administrar descargas eléctricas, colocado dentro de una cámara insonorizada de 44 x 54 x 54 cm con una fuente de sonido en su interior (figura 14).

La prueba constó de tres sesiones realizadas en días sucesivos: una de condicionamiento, una de evaluación de la asociación tono-descarga y, por último, una de valoración de la asociación contexto-descarga. En la primera sesión, se colocó a los animales en el aparato, en el que se habían colocado paredes con rayas blancas y negras verticales (estímulo contextual) y se les dejó explorar libremente durante 3 minutos. A continuación, se realizaron 5 ensayos de condicionamiento tono-contexto-descarga. En cada uno de estos ensayos, siempre en el mismo contexto con paredes con rayas blancas y negras, se emitió un sonido durante 20 segundos (70 dB, 2 KHz) y 18 segundos después se administró una descarga eléctrica (0.5 mA, 50 Hz, 2 segundos). En la segunda sesión (test de asociación tono-descarga) los animales fueron colocados en el mismo aparato pero se cambió el contexto en el que se había producido el entrenamiento la sesión anterior; las paredes rayadas se sustituyeron por paredes de color gris neutro. Se realizaron 3 ensayos sin estímulo aversivo, en los que se emitió un tono de las mismas características que el día anterior. En la última sesión (test de asociación contexto-descarga), se colocó a los animales durante 5 minutos en el mismo contexto de la sesión de entrenamiento (paredes con rayas verticales) y no se emitió ningún tono o descarga. El tiempo de inmovilidad de los animales en las sesiones 2 y 3 fue evaluado mediante el software Anymaze.

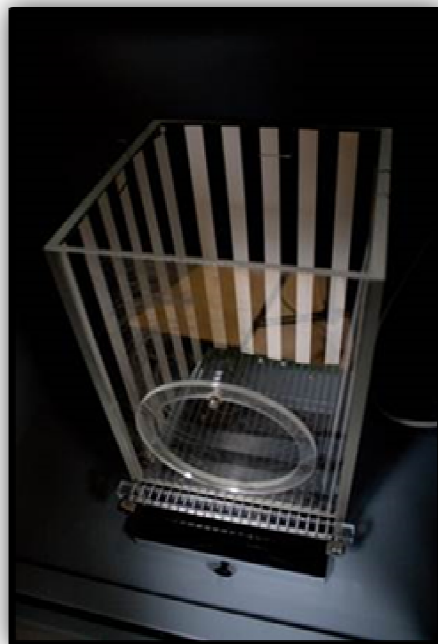


Figura 14. Fear Conditioning Apparatus

3.6 Análisis estadístico de los resultados

El programa Anymaze se utilizó para registrar y medir todos los parámetros requeridos en todas las pruebas conductuales salvo los reflejos sensoriales y la función motora en las que la valoración se realizó de manera visual y con ayuda de un cronómetro cuando fue necesario (p. ej. latencias de caída).

Los datos del laberinto Acuático de Morris se analizaron usando MANOVAs MR ('sesión' x 'Trisomía' x '*Dyrk1A*' o 'ensayo' x 'Trisomía' x '*Dyrk1A*'). Los datos del resto de estudios conductuales se analizaron mediante MANOVAs ('Trisomía x *Dyrk1A*') para evaluar el efecto de estos factores sobre cada variable dependiente. Las medias de cada grupo experimental fueron comparadas *post hoc* mediante la prueba de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 21 (Armonk, NY, USA).

4. Estudio de la LTP hipocampal

La influencia de la dosis de *Dyrk1A* sobre la capacidad de las neuronas del hipocampo de potenciar a largo plazo fue evaluada mediante electrofisiología extracelular *in vitro* empleando una variación del protocolo descrito por Costa y Grybko, (2005). Esta técnica permite registrar la fuerza sináptica resultante tras la aplicación de un estímulo eléctrico, lo que supone simular el proceso neurofisiológico que tiene lugar en el cerebro *in vivo* durante los procesos de aprendizaje y memoria. Así, evaluando la magnitud del cambio de potencial eléctrico postsináptico y su mantenimiento a lo largo del tiempo, se puede determinar la neuroplasticidad de cada grupo objeto de estudio.

En el hipocampo, el principal circuito neuronal involucrado en la fijación de recuerdos a largo plazo es el circuito trisináptico. La primera de sus sinapsis tiene lugar entre las fibras aferentes de corteza entorrinal que contactan con las dendritas de las neuronas granulares del GD. Los axones de las neuronas granulares constituyen el tracto de las fibras musgosas y establecen una segunda sinapsis con las neuronas piramidales de la región CA3. Posteriormente, los axones de las neuronas de CA3, llamadas colaterales de Schaffer, contactan con CA1, dando lugar a la tercera sinapsis del circuito.

Adicionalmente, el axón de las neuronas de CA1 es proyectado de nuevo al *subiculum*, desde donde una proyección contacta de nuevo con corteza entorrinal.

En el presente estudio, los registros electrofisiológicos in vitro se llevaron a cabo en la vía colateral de Schaffer, en rodajas de hipocampo cuya ruta trisináptica permanecía intacta.

a) Obtención de las rodajas de hipocampo

Para obtener las rodajas de hipocampo en las que se realizaron los registros electrofisiológicos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y sus cerebros fueron rápidamente extraídos. Se diseccionó uno de los hemisferios y se extrajo el hipocampo. A continuación fue seccionado con un *chopper* (Proquinorte, Bilbao, España) en rodajas coronales de 400 μm . Los cortes se dejaron estabilizar en una placa Petri con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial (NaCl 120 mM, KCl 3.5 mM, NaH_2PO_4 1.25 mM, MgSO_4 1.3 mM, CaCl_2 2.5 mM, glucosa 10 mM y NaHCO_3 26 mM, $\text{pH} = 7.5$) oxigenado (95% O_2 , 5% CO_2) a temperatura ambiente durante al menos 1 hora antes de comenzar los registros electrofisiológicos.

b) Fabricación de los electrodos de registro

Los electrodos utilizados para registrar la actividad eléctrica se fabricaron a partir de micropipetas de borosilicato de 1 mm de diámetro (WPI, Worcester, MA, USA), que se obtuvieron mediante un estirador vertical automático de pipetas (Scientific Instrument Lab, Narishige, Japón). La longitud y la forma óptimas de la punta del electrodo se obtuvieron aplicando una intensidad de calor de 4.5 y una fuerza magnética de 0. El electrodo se rellenó con NaCl 2M (impedancia entre 1-4 $\text{M}\Omega$) y se conectó al sistema de amplificación.

c) Inducción de LTP en el área CA1 del hipocampo

Se transfirió una rodaja de hipocampo a una cámara de perfusión (Harvard Apparatus, Worcester, MA, USA) donde se mantuvo a una temperatura de 30°C con un flujo constante de LCR oxigenado de 1 ml/minuto. Con ayuda de una lupa, se situó un electrodo bipolar de estímulo en el *stratum radiatum* de la región CA1 del hipocampo con el fin de aplicar un tren de estímulos y así activar fibras axonales procedentes del

área CA3 (figura 15). A continuación, situando un electrodo de registro a unas 600-800 μm del primero (también en la región CA1), se registraron los potenciales excitatorios postsinápticos evocados (*field Excitatory Postsynaptic Potentials*), fEPSPs) generados como respuesta de las poblaciones neuronales sinaptantes.

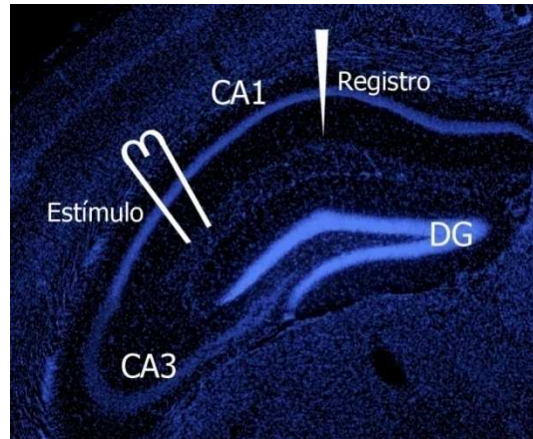


Figura 15. Esquema de la posición de los electrodos de estímulo y de registro en el hipocampo durante el registro de la LTP.

El proceso de registro constó de tres fases:

- 1) Establecimiento de la línea basal: para ello se aplicaron pulsos (100 μs) con una frecuencia de 0.033 Hz (1 pulso cada 30s) durante 20 minutos.
- 2) La potenciación a largo plazo fue inducida por *theta burst stimulation* (TBS), que consiste en la aplicación de un tren de estímulos con elevada frecuencia. Se aplicaron 10 trenes de 5 pulsos (100 μs , 100 Hz) con 200 ms entre el inicio de cada tren de pulsos.
- 3) Se volvieron a aplicar los parámetros de la condición basal: 1 pulso (100 μs) cada 30 s (0.033 Hz) durante 80 minutos.

La señal eléctrica obtenida fue continuamente supervisada mediante un osciloscopio (HM302-2, Hameg GmbH, Frankfurt, Alemania) y amplificada (AC-DC Amplifier AE-2, Cibertec, Madrid, España) hasta 100 veces. En el proceso de amplificación la señal se filtró para eliminar las frecuencias demasiado bajas (<1 Hz) y demasiado altas (>3 KHz). La señal fue digitalizada (CED Micro 1401, Cambridge Electronic Design Limited, CED Limited, Cambridge, UK) y registrada en un ordenador con el programa Spyke2 5.04 (CED Limited).

d) Análisis y estadística de los registros

El análisis de los registros electrofisiológicos se realizó con ayuda del programa Spike 2 versión 5.12a (Cambridge Electronic Design limited, Cambridge, UK). Las pendientes de los fEPSPs se expresaron como porcentajes de cambio respecto a los valores de amplitud basal obtenidos en la primera fase del experimento, antes de aplicar el TBS.

Los resultados de cada grupo experimental se expresaron como media $\pm$ E.E.M. (Error Estándar de la Media). El análisis estadístico se realizó mediante un MANOVA MR ('tiempo' x 'Trisomía' x 'Dyrk1A'). Las medias de cada grupo experimental se compararon *post hoc* mediante la prueba Bonferroni. Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 21.

5. Caracterización neuromorfológica

Para estudiar la influencia de la dosis génica de *Dyrk1A* en los mecanismos que subyacen al aprendizaje y la memoria se caracterizaron diferentes aspectos celulares y morfológicos usando técnicas de inmunohistoquímica.

5.1 Perfusión y preparación de los tejidos

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (pentobarbital sódico 20 mg/ml, etanol 10%, propilenglicol 20%), sacrificados y perfundidos por vía intracardiaca primero con salino (0.9 %) y luego con paraformaldehído al 4%, pH 7.0, en PBS 1X (PBS 10X: NaCl 80 g/l, KCl 2 g/l, Na₂HPO₄ 6.1 g/l). Para este procedimiento se utilizó una bomba peristáltica ISMATEC ISM 829 (IDEX Health&Science, Wertheim, Alemania) a un flujo constante de 5 ml/minuto. Después de la perfusión, todos los cerebros fueron post-fijados con paraformaldehído a 4°C durante 24 horas y posteriormente transferidos a una solución de sacarosa al 30% en PBS 1X para su deshidratación. Una vez deshidratados, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C.

Para realizar la inmunohistoquímica en flotación y las tinciones se realizaron secciones coronales de 50 μ m de grosor en criostato de todo el hipocampo y de 30 μ m de grosor para el cerebro basal. La seriación sistemática de las estructuras a cuantificar es indispensable en el cálculo de parámetros estereológicos. Así, los cortes se fueron

depositando de forma seriada en pocillos de placas de cultivo, rellenos previamente con solución crioprotectora (etilenglicol 25%, glicerol 25%, PBS 1X 50%), en 9 series para el hipocampo y en 5 series para el septo medial y los núcleos de la banda diagonal de Broca. Finalmente se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Los marcajes realizados en el vermis cerebelar se llevaron a cabo en secciones de 5 µm de tejido criopreservado y se recogieron en portaobjetos polarizados (Thermo Scientific Superfrost Plus), que posteriormente fueron almacenados a -20°C.

5.2 Histología e inmunohistoquímica

La tinción y detección de proteínas en tejido congelado mediante inmunohistoquímica se ha realizado sobre secciones coronales de cerebro en el caso del hipocampo y los núcleos colinérgicos y sagitales en el caso del cerebelo. Se seleccionaron las áreas de interés con ayuda del atlas estereotáxico del cerebro de ratón Franklin y Paxinos (1997).

5.2.1 Tinción de Nissl

La estimación de parámetros morfológicos tales como el área de la SGZ y el volumen del DG del hipocampo (ver apartado 5.3) se realizó sobre secciones teñidas con la tinción de Nissl, ya que permite delimitar de una forma sencilla dichas regiones. Esta tinción se llevó a cabo en una de las series elegida de forma aleatoria. Los cortes de hipocampo se lavaron en PB 0.1 N (PB 0.1 N: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.65 g/l; K_2HPO_4 14 g/l) y se montaron en portaobjetos gelatinizados. Tras secarse durante 48 horas, los portaobjetos fueron sumergidos durante 12 minutos en azul de toluidina 0.01%, un colorante que se une al RNA contenido en los ribosomas y por tanto tiñe el núcleo, el nucléolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso. A continuación se realizó un lavado breve en agua destilada y se procedió a la fase deshidratación, en la que se sumergieron las muestras durante 2 minutos en cubetas sucesivas con soluciones de alcoholes de gradación ascendente (70°, 96° y dos baños de 100° respectivamente). Después se pasaron por dos baños sucesivos con el disolvente orgánico xileno, también durante 2 minutos. Finalizada la exposición, las muestras se cubrieron con la resina sintética DPX (Panreac, Barcelona, España) y un cubreobjetos y se dejaron secar durante 2 días.

5.2.2 Tinción con Ioduro de propidio y DAPI

Todos los marcajes empleados en la caracterización neuromorfológica cerebelar se llevaron a cabo sobre tejido adherido a portaobjetos polarizados. Las muestras se aatemperaron y se delimitó la zona de interés con un rotulador hidrófobo. A continuación, se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS 1X en agitación. Después se sumergieron los portaobjetos en PBS-Tw 0.05% durante 5 minutos. Se secaron y se colocaron en una cámara húmeda oscura. En cada tejido se colocó una gota de PBS 1X con DAPI, una molécula que se intercala con el ADN, 1:1000 durante 12 minutos para marcar los núcleos celulares. Posteriormente se lavaron 3 veces las muestras con PBS 1X durante 5 minutos. Para diferenciar células de Purkinje los tejidos se marcaron además con Ioduro de propidio (IP), una molécula que se intercala con el RNA, durante 20 minutos a una concentración 1:2000. Se lavaron con PBS 1X y finalmente se montaron con el medio de montaje Vectashield.

5.2.3 Inmunofluorescencia en tejido en suspensión

En la inmunohistoquímica en suspensión (*free floating*) los cortes se procesan flotando libremente en líquido en una placa específica para inmunohistoquímica. De esta manera pueden tratarse todos los tejidos de una serie en un pocillo y todos los animales de un mismo estudio simultáneamente garantizando la máxima penetración y homogeneidad.

Para realizar la inmunofluorescencia de cada uno de los marcadores del hipocampo (Ki67, Doblecortina, Calretinina, Glutamato Vesicular 1 y Descarboxilasa del ácido glutámico 65/67) se seleccionó aleatoriamente una de las nueve series que se habían cortado previamente para cada animal y se introdujeron en los pocillos de la placa. Se lavaron los cortes con PB 0.1 N durante 10 minutos. A continuación, se preincubaron con PBTBSA: PB 0.1N con tritón (Tritón X-100 Electrophoresis Reagent, Sigma-Aldrich, MO, USA) al 1% para permeabilizar el tejido y con albúmina de suero bovino (Bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich, MO, USA) al 1%, para bloquear las uniones inespecíficas. Se incubaron las secciones con el anticuerpo primario (tabla 6) en PBTBSA durante 1 hora a temperatura ambiente y 72 horas a 4°C. En el caso de la doble inmunohistoquímica los tejidos se incubaron con ambos anticuerpos primarios a

la vez. Después se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBTBSA. Seguidamente se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 7) 1:1000 en PBTBSA en agitación orbital durante 1 hora a temperatura ambiente y 24 horas a 4°C. Después se realizaron 5 lavados con PB 0.1 N de 10 minutos y se incubaron las secciones con la tinción nuclear DAPI (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 1:1000 en PB 0.1 N en agitación orbital durante 12 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones de tejido con PB 0.1 N. Para eliminar la autofluorescencia debida a la acumulación de lipofuscina, un lipopigmento que se encuentra en altas concentraciones en ratones de edad avanzada o con signos de envejecimiento temprano, como el ratón TS, se realizó un tratamiento con el reactivo Autofluorescence eliminator reagent (Millipore, Billerica, MA, USA) a todos los tejidos. Para ello, se incubaron las secciones durante 5 minutos en etanol al 70%. Después se incubaron durante 5 minutos con el reactivo descrito. A continuación, se realizaron tres lavados de 1 minuto con etanol al 70% y finalmente se lavaron los tejidos con PB 0.1 N. Por último, se montaron los cortes en un portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con un cubreobjetos utilizando como resina Gerbatol (Glicerol 0.3 g/ml; Mowiol 0.13 g/ml; Tris-HCl 0.2 M pH 8.5 al 66%).

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunohistoquímica

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Origen
<i>Anti-KI67</i>	Thermo-scientific	1:750	Conejo
<i>Anti-Doblecortina</i>	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	1:250	Cabra
<i>Anti-Calretinina</i>	Swant (Marly, Suiza)	1:3000	Conejo
<i>Anti-Glutamato Vesicular 1</i>	Millipore	1:2500	Cobaya
<i>Anti-Descarboxilasa del ácido glutámico 65/67</i>	Millipore	1:350	Conejo
<i>Anti-Acetilcolinesterasa</i>	Millipore	1:100	Cabra

Tabla 7. Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunohistoquímica

Anticuerpo	Casa comercial	Origen
<i>Anti-conejo Alexa Fluor® 594</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Burro
<i>Anti-conejo Alexa Fluor® 488</i>	Invitrogen	Burro
<i>Anti-cabra Alexa Fluor® 594</i>	Invitrogen	Burro
<i>Anti-cobaya Alexa Fluor® 488</i>	Invitrogen	Cabra
<i>Anti-cabra biotinilado</i>	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)	Conejo

Tabla 8. Otros marcajes

	Casa comercial	Dilución
<i>Azul de toluidina</i>	Sigma	0.1%
<i>DAPI</i>	Calbiochem (San Diego, CA, USA)	1:1000
<i>IP</i>	Invitrogen	1:2000

5.2.4 Inmunohistoquímica con peroxidasa en tejido en suspensión

Para evaluar la influencia de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre la degeneración de BFCNs se usó como marcador la enzima ChAT, una molécula específica de las terminaciones nerviosas colinérgicas que participa en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina. En este caso la inmunohistoquímica se realizó en flotación y el sistema utilizado para revelar la proteína de interés fue un anticuerpo secundario biotinilado. Tras seleccionar al azar una de las 5 series disponibles, las secciones se lavaron en PBS 1X con tritón al 0.2% (PBS-TX) para permeabilizar el tejido. Se inactivó la actividad peroxidasa endógena del tejido con H₂O₂ al 3% en PBS-TX y se volvió a lavar el tejido con PBS-TX. Se bloquearon las uniones inespecíficas preincubando con una solución de PBS-TX y 20% de suero normal de burro (*Normal Donkey Serum*, NDS, Chemicon International, Temecula, CA, USA) durante 1 hora en agitación orbital. Después se realizaron lavados con PBS-TX y se incubaron las secciones con el anticuerpo primario anti acetilcolin transferasa (tabla 6) diluido 1:100 en PBS-TX con NDS al 10 % durante 24 horas a temperatura ambiente en agitación orbital. Al día siguiente se realizaron de nuevo lavados con PBS-TX y se procedió a la incubación con un anticuerpo secundario biotinilado (tabla 7) diluido 1:250 en PBS-TX con NDS al 5% durante 2 horas a

temperatura ambiente. Tras lavar con PBS-TX, los cortes fueron tratados durante 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación orbital con el complejo Avidina-Biotina Peroxidasa (Standard Vecstain ABC Kit, Vector Laboratories). Posteriormente, se realizaron lavados con PBS sin tritón. El revelado de estos complejos se realizó utilizando la especificidad de la reacción de peroxidación en presencia de cromógeno 3,3' Diaminobenzidina (DAB). Finalmente, se montaron las secciones en portaobjetos. Una vez secos, los tejidos se deshidrataron pasándolos por alcoholes de gradación ascendente y tras pasar por un baño de xileno, se cubrieron utilizando la resina sintética DPX.

5.3 Análisis morfométricos

Para determinar la influencia del gen *Dyrk1A* en el tamaño y morfología cerebral, se examinaron diferentes áreas encefálicas.

5.3.1 Área de la capa subgranular y volumen del giro dentado del hipocampo

Para calcular el área de la SGZ y el volumen del GD se fotografió esta región en cada sección marcada con la tinción de Nissl con un microscopio óptico (Zeiss Axioskop 2 plus, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA) a una magnificación de 4x y se empleó el método estereológico Cavalieri tal y como describen Llorens-Martin *et al.*, (2006). Según este procedimiento, el volumen de un objeto se estima mediante la suma de las áreas de las secciones que conforman una serie y multiplicando por la distancia constante que las separa. Como se mencionó anteriormente, en el caso del hipocampo había 9 series en las que cada sección tenía 50 µm de grosor, por lo que la distancia entre sección y sección en una misma serie fue de 450 µm. Se midió el área del DG y la longitud de la SGZ en cada sección con ayuda del software ImageJ NIH (versión 1.33; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) y de una tableta digital (Mouse Pen 8x6, Genius, Taipei, Taiwan). Con las medidas halladas se estimaron las magnitudes deseadas siguiendo las formulas:

$$VDG = T \cdot \sum A_i \text{ y } ASGZ = T \cdot \sum L_i$$

Siendo T la distancia entre cada sección de una serie, $\sum A_i$ el sumatorio de todas las áreas medidas y $\sum L_i$ el sumatorio de todas las longitudes.

5.3.2 Volumen de núcleos basales colinérgicos

Con el fin de realizar posteriormente la cuantificación estereológica de BFCNs se determinó el volumen del núcleo septal medial (*Medial septal nucleus*, MSN) y los brazos horizontal y vertical del núcleo de la banda diagonal de Broca (*Vertical*, VDB, and *Horizontal*, HDB, *Diagonal band of Broca*) a partir de fotografías tomadas con un microscopio óptico Zeiss a una magnificación de 4x. Para ello se empleó también el método estereológico Cavalieri tal y como se describe en el apartado anterior, pero en este caso se tuvo en cuenta que cada sección tenía un grosor de 30 μm y que la distancia entre dos secciones en una misma serie fue de 150 μm , ya que la estructura total se recogió en 5 series.

5.3.3 Área de la sección del vermis, área foliar, grosor de las capas granular y molecular y longitud de la capa de las células de Purkinje del cerebelo

Para estimar las diferentes áreas y longitudes mencionadas, se tomaron fotografías de secciones sagitales del vermis cerebelar teñidas con DAPI a una magnificación de 4x con un microscopio óptico Zeiss. A partir de estas imágenes y con el software ImageJ NIH, se construyeron panorámicas del vermis cerebelar sobre las que se efectuaron las mediciones morfométricas correspondientes. La media del grosor de las distintas capas fue calculada dividiendo la longitud total de la capa en una sección sagital medial por el área total de la capa. La línea de las células de Purkinje se incluyó en la estimación del grosor de la ML. Dado que en este caso no se empleó ninguna técnica estereológica, las variaciones en estos parámetros se expresaron como porcentaje de cambio respecto al grupo control (Baxter *et al.*, 2000).

5.4 Recuentos celulares

Para poder caracterizar la influencia de la dosis de *Dyrk1A* sobre la diferenciación, proliferación y supervivencia celular se cuantificaron diferentes poblaciones neuronales mediante técnicas estereológicas como el método del disector o aplicando factores de corrección como el método Abercrombie (1946).

5.4.1 Cuantificación de la densidad precursores neurales en la capa subgranular del hipocampo (Ki67)

Para la identificación de las células proliferativas en la SGZ se empleó como marcaje la proteína Ki67, que se expresa en las células proliferativas en todas las fases del ciclo celular activo (G1, S, G2 y M) y está ausente en el resto de células (G0). Para determinar la densidad aproximada de esta población neuronal se empleó una variación del método del disector óptico (West y Gundersen, 1990), tal y como describió Trejo *et al.* (2001). Dada la baja densidad de este tipo neuronal, el número total de células Ki67 positivas se cuantificó visualmente por serie con un microscopio de fluorescencia (Zeiss) a una magnificación de 40x. La presencia de progenitores proliferando a lo largo de la SGZ se examinó con el enfoque micrométrico en todo el espesor del tejido, sin necesidad de utilizar planos focales. Para determinar la densidad de precursores neuronales de cada animal el número de células hallado por serie se dividió por su respectiva área de SGZ.

5.4.2 Estimación de la densidad de progenitores granulares en diferentes estadios de diferenciación en la capa subgranular

Como marcadores de neuronas inmaduras en proceso de diferenciación en el DG se emplearon anticuerpos contra doblecortina (DCX), una proteína asociada a microtúbulos relacionada con la diferenciación y migración neuronal, y calretinina (CLR), una proteína ligadora de calcio que se expresa brevemente antes de pasar al estadio final de neurona madura. Este doble marcaje permite identificar distintas poblaciones neurogénicas: DCX positivas/CLR negativas, que corresponderían a precursores neurogénicos de tipo 2b y 3; DCX positivas/CLR positivas que se atribuye a neuronas postmitóticas en diferenciación; DCX negativas/Calretina positivas que es una población ligeramente más diferenciada que las anteriores pero que aún no ha completado su diferenciación. En el presente estudio el número y la densidad de neuronas inmaduras se representó en dos poblaciones: DCX positivas/CLR negativas y células CLR positivas (incluyendo las DCX positivas/CLR positivas y las DCX negativas/CLR positivas). Para medir la densidad de estas poblaciones celulares se empleó la variación del método del disector físico (Gundersen y Jensen, 1987) previamente descrito por Llorens-Martin *et al.*, (2006). Así, por cada animal, 6

disectores ópticos fueron aleatoriamente ubicados en la SGZ con un microscopio confocal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), utilizando una magnificación de 63x y un zoom de 2.46. Se cuidó que la SGZ siempre fuese paralela a un lado del disector, de dimensiones $100.01 \times 100.01 \mu\text{m}$ y siendo, por tanto, la longitud de la misma $100.01 \mu\text{m}$. A continuación, en cada disector se examinaron 11 planos focales a lo largo de $17.204 \mu\text{m}$, con una separación de $1.72 \mu\text{m}$ entre cada uno. El recuento de las células se realizó utilizando la técnica del disector en forma de U, siendo la base de este la capa subgranular y los brazos los límites laterales de la fotografía. Con el software de análisis de imagen Image J se contaron las células a medida que fueron desapareciendo a través de los planos focales, independientemente del borde que tocaran y marcando cada una para no ser contada más de una vez. Dividiendo el número de células contadas entre el área de la SGZ contenida en el disector se obtuvo la densidad celular. Con la media de los 6 disectores se halló la densidad correspondiente a cada tipo celular en cada animal.

5.4.3 Valoración de la densidad de neuronas granulares del giro dentado

Se estimó la densidad de neuronas granulares como medida indirecta de la densidad de neuronas maduras dado que este tipo celular es el más abundante del DG y siendo, además, fácilmente distinguible de los progenitores neuronales por encontrarse estos últimos ubicados en la capa subgranular y presentar núcleos irregulares. La cuantificación de las células granulares se llevó a cabo usando los principios del disector óptico, similar al método empleado del apartado 5.4.2. Así, en cada animal se seleccionaron aleatoriamente seis puntos en el interior de la GCL donde se ubicaron los disectores. Se utilizó el objetivo de 63x y un zoom de 2.3, siendo las dimensiones de cada disector $7.175 \times 75.91 \times 75.91 \mu\text{m}$. En cada punto, se tomó una serie de 10 planos focales separados por $0.8 \mu\text{m}$, distancia suficiente para que cada célula aparezca en dos planos consecutivos. El recuento celular se realizó con el programa Image J y siguiendo los principios de Sterio (1984), es decir, tomando pares de imágenes y considerando alternativamente una imagen como sección de referencia y la otra como sección de muestra. Sólo se contabilizaban aquellas células que se encontraban en el plano focal de muestreo pero que no aparecían en el plano de referencia. Se excluyeron aquellas células que tocaban la parte inferior y dos de los lados del

disector. Para hallar la densidad de neuronas granulares se dividió el número de células contadas por el volumen del disector. Para estimar la densidad por animal se calculó la media de los 6 disectores.

5.4.4 Estudio de la densidad de neuronas colinérgicas en los núcleos basales

El recuento de neuronas colinérgicas se efectuó de forma similar a la valoración de la proliferación neuronal, tal y como se describe en el apartado 5.4.1. Así, se fotografió cada sección con un microscopio óptico Zeiss a una magnificación de 4x y se contabilizaron las neuronas ChaT positivas con ayuda del programa ImageJ. Para estimar la densidad de neuronas colinérgicas se dividió el número total de células contabilizadas por el área de los núcleos basales colinérgicos de esa misma serie.

5.4.5 Estimación de neuronas granulares del cerebelo

El conteo celular en la capa granular del cerebelo se llevó a cabo en criosecciones de 5 μm de grosor teñidas con DAPI. Para ello, 6 cortes sagitales de la línea medial del cerebelo, es decir, del vermis, fueron recogidos seriadamente en un portaobjetos no extendiéndose más allá de 1 mm lateralmente de la zona medial. Posteriormente se fotografió la capa granular con un microscopio Zeiss a una magnificación de 63x. Las células fueron contadas dentro de un área de 5000 μm^2 . Se seleccionaron aleatoriamente 8 campos independientes que no se solapaban a lo largo de las folias IV, V, VI y VII en el cerebelo de cada animal. Para corregir las estimaciones empleadas se utilizó el factor de corrección de Abercrombie (Abercrombie, 1946) empleando la fórmula:

$$P = A[M/(L+M)]$$

Siendo P la estimación celular final, A los núcleos contados, M el grosor de la sección en μm y L la media del diámetro nuclear. Para estimar la media del diámetro nuclear se midieron 8 núcleos elegidos aleatoriamente en cada animal.

5.4.6 Cuantificación de la densidad de células de Purkinje en el cerebelo

Para determinar la densidad de las células de Purkinje se cuantificó el número total de células teñidas con IP en una sección medial sagital completa y se dividió por la longitud de la línea de las células de Purkinje en cada animal.

5.5 Niveles de excitación e inhibición sináptica en el hipocampo

Para conocer el balance inhibitorio-excitatorio de los inputs que conectan con las células granulares a nivel de la ML, se emplearon anticuerpos frente a la descarboxilasa de ácido glutámico (*Glutamic Acid Decarboxylase 65/67*, GAD65/67) y al transportador vesicular de glutamato 1 (*Vesicular Glutamate Transporter 1*, VGLUT1). La primera molécula es un enzima que cataliza la conversión de L-glutámico en GABA, principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro. GAD presenta dos isoformas: una molécula de membrana, la 65, y otra citoplasmática, la 67. La proteína VGLUT1 es un marcador de vesículas de secreción glutamatérgicas, es decir, de naturaleza excitatoria y se expresa ampliamente en el hipocampo adulto. Así, siguiendo el protocolo descrito por Trejo *et al.*, (2007), por cada animal se seleccionaron aleatoriamente 4 puntos en la ML del DG en la zona más externa de la capa de células granulares y en cada sitio se tomó una imagen de cada marcador por separado. Las fotografías se realizaron con un microscopio confocal (Leica TCS SP5, Leica Microsystems), utilizando el objetivo de 63x con un zoom de 9 y una resolución de 1024 x 1024. El análisis de las imágenes se realizó con el software Image J. Tras convertirlas a escala de grises, para mejorar el contraste entre señal y ruido, se realizó un círculo de referencia con un área de 325 μm^2 . El área marcada positivamente fue medida en esta región circular aplicando el mismo umbral en todos los casos. Finalmente los resultados se expresaron como la media del porcentaje de área ocupada por la señal positiva. Para determinar el balance relativo de excitación e inhibición para cada genotipo en cada animal se dividió el valor de excitación hallado entre el porcentaje de inhibición.

5.6 Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de todos los experimentos neuromorfológicos se realizó mediante MANOVAs ('Trisomía' x 'Dyrk1A'). Las medias de cada grupo

experimental se compararon *post hoc* mediante la prueba de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 21.

6. Inmunodetección de los niveles de expresión de Dyrk1A y App

Para corroborar que los niveles proteicos de Dyrk1A (≈ 91 KDa) se correspondían con cada genotipo empleado en este estudio, se efectuó su valoración mediante Western blot. Además, también se evaluó la influencia del gen *Dyrk1A* sobre los niveles de expresión de la proteína App (≈ 120 KDa) en este caso en animales de edad avanzada (tabla 5). Ambas proteínas fueron caracterizadas tanto en hipocampo como en cerebelo.

Para la extracción de proteínas del hipocampo y del cerebelo se añadieron 300 μ l de tampón de lisis con detergentes (Tris-HCl 50mM, pH: 7.5, EDTA 1mM, duodecil sulfato sódico (SDS) 2%) con una mezcla de inhibidores de proteasas (4-(2 aminoacetil)-benzeconsulfonil fluoruro 1.3 mM), leupeptina 10 μ g/ml, E-64 5 μ g/ml, antipaina 10 μ g/ml e inhibidores de fosfatasa (cantaridita 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM), por cada 20 mg de tejido. Las muestras fueron homogenizadas con un politrón y se calentaron a 98°C en baño seco durante 10 minutos. A continuación, se pasaron a hielo para su enfriamiento. Posteriormente, las muestras se sonicaron a máxima potencia durante 5 segundos y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos, a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se mantuvo en hielo. Finalmente, se midió la concentración de proteínas utilizando el método de Lowry (Sengupta y Chattopadhyay, 1993) en un espectrofotómetro (Multiskan ex, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 620 nm, utilizando una curva patrón de albúmina.

Para realizar la electroforesis se mezclaron cantidades idénticas de proteína total (50 μ g) de cada lisado con 5 μ l de tampón de carga 5x (Tris 150 mM, pH6.8, glicerol 50%, SDS 1% (p/v), β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.25%) y se completaron hasta un volumen total de 10 μ l con PBS-SDS 1%. La mezcla se calentó a 90°C durante 5 minutos y se centrifugó 5 minutos a 3.000 r.p.m. Tras cargar 75 μ g de proteína por cada muestra (15 μ l), su separación por electroforesis se efectuó en geles verticales de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) (tabla 9).

Tabla 9. Composición de los geles de concentración y de separación.

Componentes	Gel de separación 10%	Gel de concentración
<i>H₂O destilada</i>	5000ml	1562 ml
<i>40% Acrilamida-bisacrilamida</i>	2500 ml	313 μ l
<i>Buffer de separación 4X</i>	2500 ml	
<i>10% persulfato amónico (APS)</i>	150 μ l	42 μ l
<i>Temed</i>	7.5 μ l	7.5 μ l
<i>Buffer de concentración 4X</i>		625 μ l

Se cargaron 5 μ l de un marcador proteico estándar (Bio-Rad) como referencia para los pesos moleculares. Hasta que las muestras alcanzaron el gel de separación se aplicó una corriente continua de 100 V durante 15 minutos, incrementándose posteriormente hasta 160 V durante 50 minutos. Todo este proceso se realizó en tampón de electroforesis (Tris base 25 mM, pH 8.5, glicina 0.2 M, SDS 0.1%).

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de polivinilidenodifluoruro (PVDF) (Bio-Rad) desde el gel de poliacrilamida. Para ello se pusieron en contacto el gel y la membrana emparedados entre hojas de papel de filtro (Bio-Rad) y esponjas dentro de un armazón de plástico. Todo el conjunto se sumergió en tampón de transferencia (Tris base 25mM, pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20%) y se sometió a un campo eléctrico de 100 V durante 90 minutos, a 4°C. Para realizar la electrotransferencia y la electroforesis se utilizó un kit de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN Bio-Rad). A continuación, se comprobó la eficacia de la transferencia tiñendo las membranas con el colorante rojo Ponceau.

Una vez finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo incubando las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución compuesta por leche en polvo desnatada al 5 % en tampón TBS-T (Tris-HCl 0.02 M, pH 7.6, NaCl 0.15 M, Tween 20 0.05%). Posteriormente la membrana se incubó con el anticuerpo primario (1:2000; ratón anti-App; Chemicon Internacional; 1:250; ratón anti-Dyrk1A, Abnova Corporation, Taipei, Taiwan) en TBS-T con BSA al 2%,

durante 24 horas a 4°C y en agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos en tampón TBS-T y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario fluorescente (1:10.000; anti-ratón IRDye-800CW; LI-COR Odyssey Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) diluido en TBS-T con leche en polvo desnatada al 2% durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T.

La fluorescencia se detectó usando el sistema LI-COR Odyssey IR Imaging System V3.0 (LI-COR Odyssey Biosciences). La densidad óptica de las bandas fue determinada con el programa ImageJ. Para corregir posibles errores de carga en el gel, las membranas también fueron incubadas con un anticuerpo contra GAPDH ($\approx 37\text{KDa}$) (1:2000; Santa Cruz Biotechnology); así, los valores de App y Dyrk1A hallados fueron normalizados con las estimaciones de esta proteína constitutiva. Cada muestra fue evaluada en tres experimentos independientes. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de cambio respecto al valor medio de densidad óptica de los controles euploides dentro de cada film. Para detectar diferencias estadísticas en la expresión de estas proteínas en los distintos grupos experimentales se utilizaron MANOVAs ('Trisomía x Dyrk1A'). Las medias de cada grupo experimental se compararon *post hoc* mediante la prueba de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 21.

7. Inmunodetección del péptido A β 42

Con el objetivo de evaluar la influencia de la carga génica de *Dyrk1A* en la acumulación del péptido neurotóxico A β 42 en la corteza, el hipocampo y el cerebelo se determinó su concentración mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) en animales de 13 meses de edad.

Para obtener los extractos proteicos a cuantificar los tejidos fueron pesados y homogeneizados en un buffer de guanidina hidrocclórica 5M 8x (pH 8.0) y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron con un tampón estándar (1:10) y se centrifugaron a 16000 g durante 20 minutos a 4°C para separar el material insoluble. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para medir el nivel de A β 42 se empleó un kit comercial KMB 3441 (Invitrogen). La cuantificación de los niveles peptídicos se llevó a cabo siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

La densidad óptica de cada muestra se determinó en un lector de placas (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) a una longitud de onda de 450 nm. La cantidad de cada péptido es proporcional a la intensidad del color generado, así que se cuantificó su concentración elaborando previamente una recta de calibrado con concentraciones conocidas de la proteína problema y a continuación se extrapolaron los valores de densidad óptica obtenidos a ésta. Cada muestra se ensayó por duplicado en la misma placa en dos experimentos independientes. Para analizar estadísticamente los resultados se realizó un MANOVA ('Trisomía x Dyrk1A') con el programa IBM SPSS Statistics versión 21. A continuación las medias de cada grupo experimental se compararon *post hoc* mediante la prueba de Bonferroni.

Resultados

Dado que los objetivos de esta tesis consistían en evaluar la contribución del gen *Dyrk1A* sobre diferentes fenotipos encontrados en el SD y sobre la fisiología y la neuromorfología del cerebro normal, en este trabajo se ha analizado el fenotipo de distintos procesos cognitivos, fisiológicos, neuromorfológicos y neurodegenerativos en ratones con una sola copia funcional de *Dyrk1A* (CO +/-), con dos copias (CO +/+ y TS +/-/-) y con tres copias de este gen (TS +/+/+). A continuación se muestran los resultados obtenidos.

1. Niveles de expresión de *Dyrk1A* según su dosis génica

En primer lugar se definieron los niveles proteicos de *Dyrk1A* en el hipocampo y el cerebelo para corroborar que su expresión se correspondía con la esperada según la dosis génica de cada grupo experimental. Así, se examinaron los niveles de expresión de esta proteína mediante Western blot en los animales CO +/+, CO +/-, TS +/-/+ y TS +/-/-, encontrándose que, efectivamente, los niveles de expresión proteica se correspondían con los esperados en los cuatro genotipos tanto en el hipocampo (MANOVA 'Trisomía' $F_{(1,21)}=64.698$, $p<0.001$; '*Dyrk1A*' $F_{(1,21)}=44.594$, $p<0.001$; 'Trisomía x *Dyrk1A*' $F_{(1,21)}=1.790$, $p=0.196$; figura 16 a) como en el cerebelo (MANOVA 'Trisomía' $F_{(1,21)}=20.344$, $p<0.001$; '*Dyrk1A*' $F_{(1,21)}=15.479$, $p<0.001$; 'Trisomía x *Dyrk1A*' $F_{(1,21)}=1.418$, $p=0.248$; figura 16 b). Los animales TS +/-/+ presentaron un incremento de aproximadamente un 50% de la expresión de esta proteína en ambas estructuras. Además, la reducción de una copia de *Dyrk1A* en los animales CO +/- y TS +/-/- disminuyó los niveles de expresión de la proteína en ambas estructuras. De hecho, como se observa en la figura 16, los ratones TS +/-/- mostraron niveles de *Dyrk1A* prácticamente iguales a los de los animales euploides CO +/+. Por tanto, el modelo murino elegido es apto para el estudio de la contribución fenotípica y funcional del gen *Dyrk1A* en ambas estructuras encefálicas.

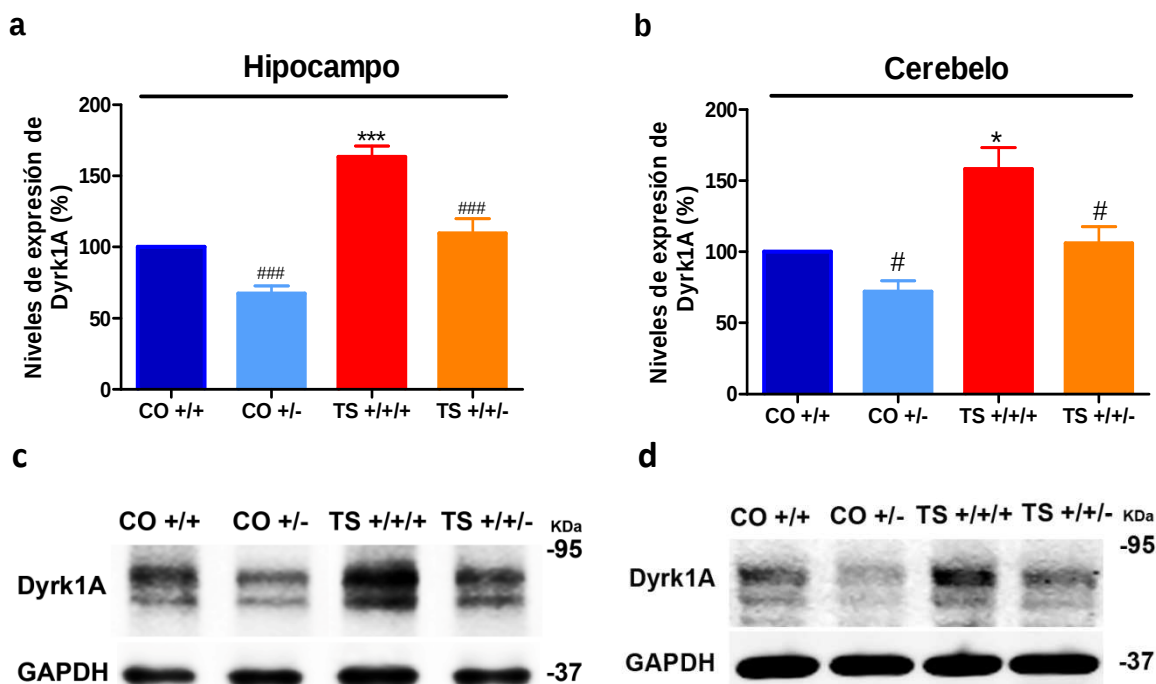


Figura 16. Análisis mediante Western blot de los niveles de expresión proteica de Dyrk1A en el hipocampo (a y c) y el cerebelo (b y d) de la progenie obtenida tras el cruce de ratones CO +/- y TS +/-/+. Las diferencias en la concentración de la proteína en los distintos genotipos fueron expresadas como el porcentaje de cambio relativo respecto al ratón euploide (definido como el 100%). La inmunodetección de GAPDH se usó como control de carga. En las imágenes representativas del experimento está indicada la posición del marcador proteico a la derecha (en kDa). *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$, TS +/-/+ vs. CO +/-; #: $p < 0.05$, ###: $p < 0.001$, efecto de la dosis génica (CO +/- vs. CO +/- y TS +/-/+ vs. TS +/-/+). Prueba de Bonferroni realizada después de MANOVAs significativos.

2. Influencia de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre la viabilidad y el fenotipo anatómico general

Dado que los ratones TS tienen una viabilidad reducida, se valoró el papel de la sobreexpresión de *Dyrk1A* sobre este fenotipo. Como ya se comentó en apartados anteriores, los individuos *knockout* homocigotos para este gen no son viables. En el presente trabajo se encontró que las proporciones de nacimiento variaban en función de la dosis del gen *Dyrk1A* ($\chi^2_{(3g.l.)} = 0.447$, $p = 0.035$). Por un lado, los animales TS +/-/+, con triple dosis de este gen, mostraron una reducción en la proporción de nacimientos (18.18%, ver figura 17 a). Del mismo modo, la reducción de una copia de *Dyrk1A* también disminuyó la viabilidad de los ratones CO +/- (21.21%). Sin embargo, la normalización del número de copias de *Dyrk1A* en los individuos TS +/-/+ aumentó el

porcentaje de nacimientos de estos individuos (28.28%), aunque no llegó a normalizarse completamente en comparación con los ratones CO +/+ (32.32%).

Dado que el gen *Dyrk1A* parece tener un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo normal de los individuos, también se cuantificó el peso corporal de los cuatro grupos de animales y su evolución en el tiempo. Los ratones TS +/+ mostraron una reducción en su tamaño corporal con respecto a los CO +/+. La reducción de la dosis génica tuvo efectos opuestos, mientras que en el ratón trisómico no rescató esta alteración, en el genotipo CO +/- ocasionó una reducción muy marcada del peso corporal (MANOVA 'Trisomía' $F_{(1,44)}=0.49$; '*Dyrk1A*' $F_{(1,44)}=53.86$, $p<0.001$; 'Trisomía x *Dyrk1A*' $F_{(1,44)}=75.00$, $p<0.001$; figura 17 b).

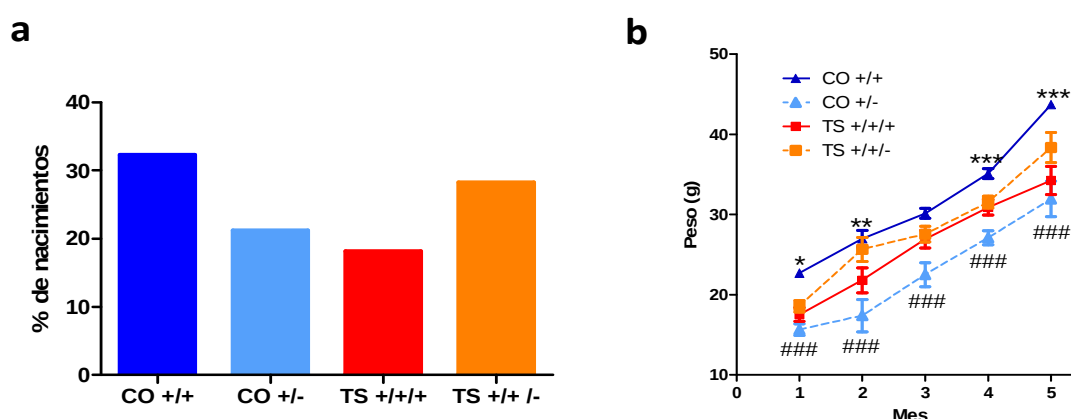


Figura 17. La normalización de la dosis del gen *Dyrk1A* en el ratón TS rescató parcialmente su viabilidad, pero no su peso corporal. Porcentaje de nacimientos en cada grupo experimental (a) y media $\pm$ E.E.M. del peso corporal y su evolución a lo largo de los meses (b). *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$, TS +/+ vs. CO +/+; ###: $p<0.001$, CO +/- vs. CO +/-. Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

3. Estudio del efecto de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre la cognición

Dado que numerosos estudios han demostrado el papel del gen *Dyrk1A* en el rendimiento cognitivo, uno de los objetivos principales de este estudio fue valorar el fenotipo cognitivo de los ratones con los distintos genotipos. Para ello se llevaron a cabo las pruebas de condicionamiento del miedo y el laberinto acuático de Morris.

3.1 Prueba del condicionamiento del miedo

Esta prueba permite evaluar la memoria de la asociación entre un estímulo aversivo y uno auditivo, proceso que depende de la adecuada función de la amígdala, y la memoria de la asociación entre un estímulo aversivo y un contexto, que es dependiente también del hipocampo y por ello principal objeto de interés en este trabajo.

En la prueba de la asociación tono-descarga se encontró que los ratones TS, independientemente de su dosis de *Dyrk1A*, mostraron un déficit en su capacidad de recordar la asociación entre un estímulo auditivo y una descarga eléctrica respecto a los animales CO +/+ (MANOVA 'Trisomía' $F_{(1,44)}=7.77$, $p=0.007$, figura 18). Por su parte, el ratón CO +/- no presentó ningún déficit en este tipo de memoria asociativa. Por lo tanto, la modificación de la dosis de *Dyrk1A* no tuvo ninguna repercusión en individuos euploides o en trisómicos (MANOVA '*Dyrk1A*' $F_{(1,44)}=0.64$, $p=0.42$; 'Trisomía x *Dyrk1A*' $F_{(1,44)}=4.42$, $p=0.519$; figura 18), lo que indica que *Dyrk1A* no tiene un papel relevante en la memoria de asociación auditiva.

En el test de condicionamiento contextual el ratón trisómico no fue capaz de recordar la asociación contexto-descarga eficientemente, ya que durante esta sesión permaneció menos tiempo inmóvil que los ratones del grupo CO +/+ en el contexto que había sido asociado a las descargas eléctricas durante el entrenamiento (MANOVA 'Trisomía' $F_{(1,44)}=4.862$, $p=0.031$; figura 18). Sin embargo, la reducción de una copia del gen *Dyrk1A* en los ratones TS +/- redujo parcialmente esta alteración (MANOVA 'Trisomía x *Dyrk1A*' $F_{(1,44)}=6.61$, $p=0.013$; figura 18), lo que indica una mejoría en la capacidad asociativa contextual de estos animales. Los ratones haploinsuficientes CO +/- mostraron una tendencia a recordar peor la asociación contexto-estímulo aversivo que los ratones CO +/+, aunque este efecto no alcanzó la significación estadística (MANOVA '*Dyrk1A*' $F_{(1,44)}=0.32$, $p=0.573$; figura 18).

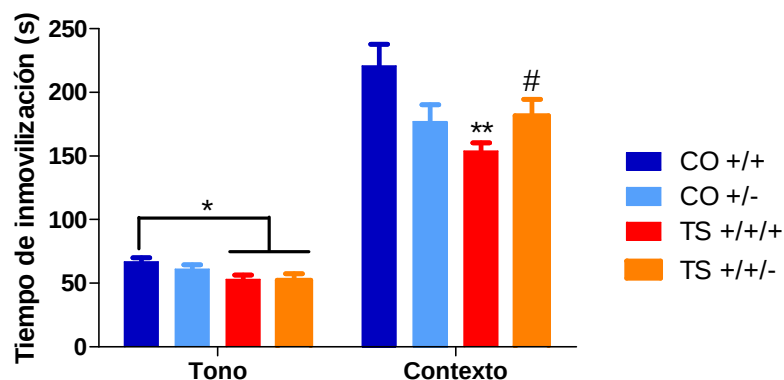


Figura 18. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS mejoró parcialmente la memoria asociativa contextual. Media $\pm$ E.E.M. del porcentaje de tiempo de inmovilidad durante la sesión de evaluación de la memoria de asociación tono-descarga y la sesión de evaluación de la memoria de asociación tono-contexto en el test de condicionamiento del miedo *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, TS +/+ vs. TS +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

3.2 Laberinto acuático de Morris

El estudio cognitivo se completó caracterizando exhaustivamente el aprendizaje y la memoria espacial de los animales mediante la prueba del laberinto acuático de Morris, en la que se analizaron la memoria de trabajo, la memoria a largo plazo o de referencia y la memoria procedimental en los distintos genotipos.

Para evaluar la **memoria de referencia** se examinó el aprendizaje de la posición de la plataforma a lo largo de las 8 sesiones de adquisición utilizando las latencias de escape de los animales. Como muestra la figura 19 a, todos los genotipos aprendieron la posición de la plataforma a través de las sucesivas sesiones ($p < 0.001$, tabla 10). A pesar de ello, los ratones TS +/+ mostraron un déficit muy acusado en su memoria de referencia ya que tardaron mucho más tiempo en encontrar la salida del laberinto que los animales del grupo euploide CO +/+ ($p = 0.001$; figura 19 b). Sin embargo, la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS produjo una gran mejoría en el aprendizaje espacial de estos animales, tal y como muestra la reducción en las latencias de escape en comparación con los animales TS +/+ ($p = 0.013$; figura 19 c). No obstante, esta recuperación fue parcial, dado que en las dos últimas sesiones la ejecución de este grupo experimental no difirió de la del grupo TS +/+ ($p = 0.072$). La reducción de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón CO +/- no afectó a las habilidades

Resultados

cognitivas de este grupo, ya que sus latencias de escape a lo largo de las sesiones fueron similares a las del grupo CO +/+ ($p=0.353$, tabla 10; figura 19 d).

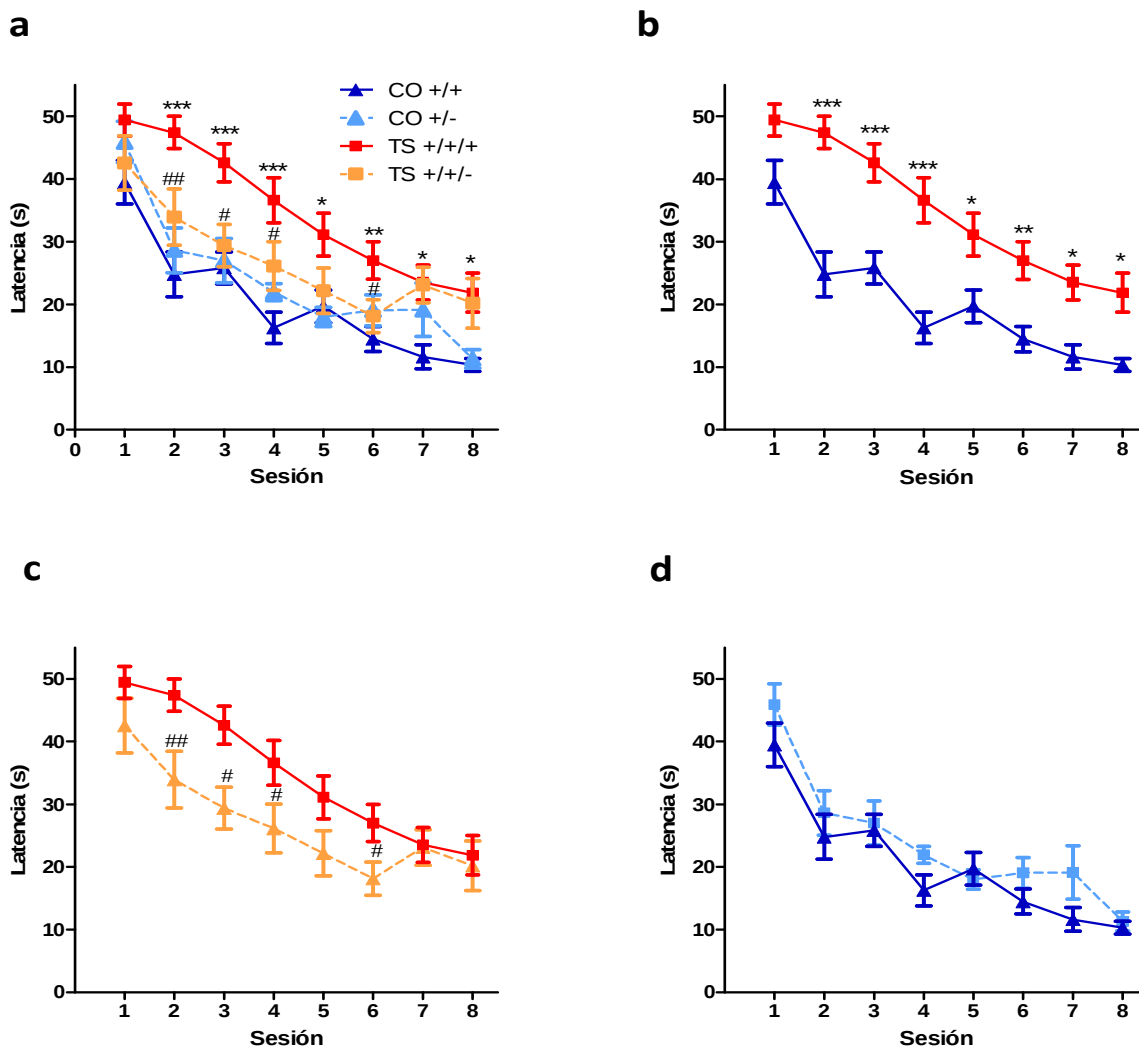


Figura 19. La normalización de la dosis de *Dyrk1A* mejoró la memoria de referencia del ratón trisómico. Media $\pm$ E.E.M. de las latencias para encontrar la plataforma durante las 8 sesiones de adquisición de los cuatro grupos de ratones (a) y comparación de las curvas de aprendizaje de los ratones TS +/+ y CO +/+ (b), TS +/+ y TS +/- (c) y CO +/+ y CO +/- (d). *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$ TS +/+ vs. CO +/+; #: $p<0.05$; ##: $p<0.01$; TS +/+ vs. TS +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

La **memoria de trabajo** se valoró analizando la ejecución de los grupos experimentales a lo largo de los 8 ensayos de cada sesión (es decir, para cada ensayo se calculó la media de la latencia de llegada a la plataforma en las 8 sesiones). El análisis estadístico reveló que los ratones TS +/+ presentaron un gran deterioro en su memoria de trabajo, ya que no redujeron la latencia de llegada a la plataforma a lo largo de los ensayos ($p=0.17$, tabla 10; figura 20). Es decir, en cada sesión no fueron capaces de

aprender y recordar la nueva posición de la plataforma. Además, estos animales mostraron un marcado déficit en comparación con los ratones CO +/+ ($p < 0.001$; figura 20 b). Sin embargo, al corregir su dosis génica, el ratón TS +/- presentó una mejoría significativa en su rendimiento a lo largo de los ensayos en comparación con los ratones TS +/+ ($p = 0.003$, figura 20 c) y el análisis *post hoc* demostró que estos animales reducían su latencia de llegada a la plataforma según iban progresando los ensayos ($p = 0.028$, figura 20). Por último, tanto los ratones CO +/+ como los CO +/- mostraron una adecuada memoria de trabajo ya que redujeron el tiempo que tardaban en encontrar la plataforma a lo largo de los ensayos ($p = 0.029$ y $p = 0.021$ respectivamente, figura 20 d). Estos resultados sugieren que la reducción de una copia de *Dyrk1A* mejoró el deterioro en la memoria de trabajo que se encuentra en los ratones TS +/+, mientras que los animales haploinsuficientes CO +/- no mostraron ninguna alteración.

Para evaluar la **eficacia del patrón de búsqueda de la plataforma** efectuado por cada grupo de animales y su evolución a lo largo de las sesiones, se calculó para cada día un índice de eficacia en el que se comparaba el recorrido realizado por cada animal con la trayectoria más eficaz, es decir, la más corta posible entre el punto de inicio del ensayo y la plataforma. Aunque todos los grupos experimentales mejoraron su patrón de búsqueda de la plataforma y obtuvieron una mejor puntuación a lo largo de las sesiones ($p < 0.001$, ver tabla 10), no todos los genotipos fueron igual de eficaces. Como puede observarse en la figura 21, la estrategia de búsqueda de la plataforma del ratón TS +/+ fue peor que la del resto de los grupos de animales. Además, estos animales mostraron tan sólo una ligera mejoría en su estrategia de búsqueda a lo largo de las sesiones en comparación con la evolución del resto de grupos experimentales. La diferencia entre la eficacia de su ejecución de las primeras y las últimas sesiones alcanzó una significación de $p = 0.036$ en los animales TS +/+, frente a los valores iguales o menores a 0.001 alcanzados en el resto de los grupos (tabla 10). Los ratones TS +/- mejoraron su eficacia con respecto a los TS +/+ en las 6 primeras sesiones ($p = 0.008$; figura 21 c). Por otro lado, los ratones CO +/- no presentaron alteraciones respecto a los CO +/+ ($p = 0.478$, tabla 10; figura 21 d). Estos resultados coinciden con los hallados al evaluar las latencias de llegada a la plataforma a lo largo de las sesiones, lo que corrobora que la normalización del número de copias de *Dyrk1A* en el ratón TS

mejora el aprendizaje y la memoria de referencia, la memoria de trabajo y su función ejecutiva, dado que es capaz de construir a lo largo de las sesiones estrategias de búsqueda más eficaces.

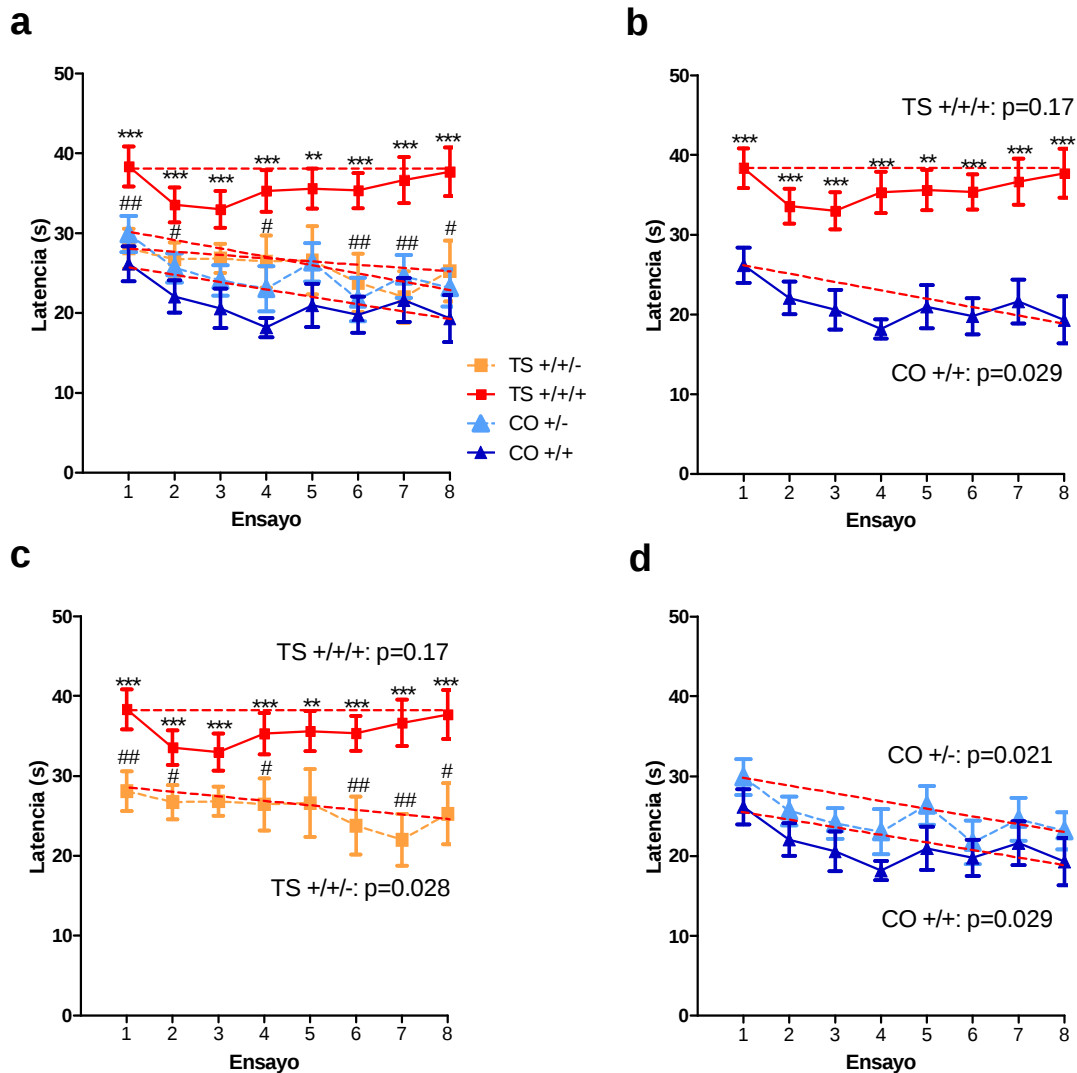


Figura 20. La normalización de la dosis génica mejoró la memoria de trabajo del ratón trisómico. Media $\pm$ E.E.M. de la latencia para encontrar la plataforma durante las 8 ensayos de las sesiones de adquisición de todos los grupos de ratones (a), de los ratones TS +/+ y CO +/+ (b), TS +/+ y TS +/- (c) y CO +/- y CO +/+ (d). En la parte derecha de las gráficas b, c y d se muestra el valor de la significación de los MANOVAs MR realizados para cada grupo experimental para valorar la reducción de las latencias a lo largo de los ensayos. **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$, TS +/+ vs. CO +/-; #: $p<0.05$; ##: $p<0.01$, TS +/+ vs. TS +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

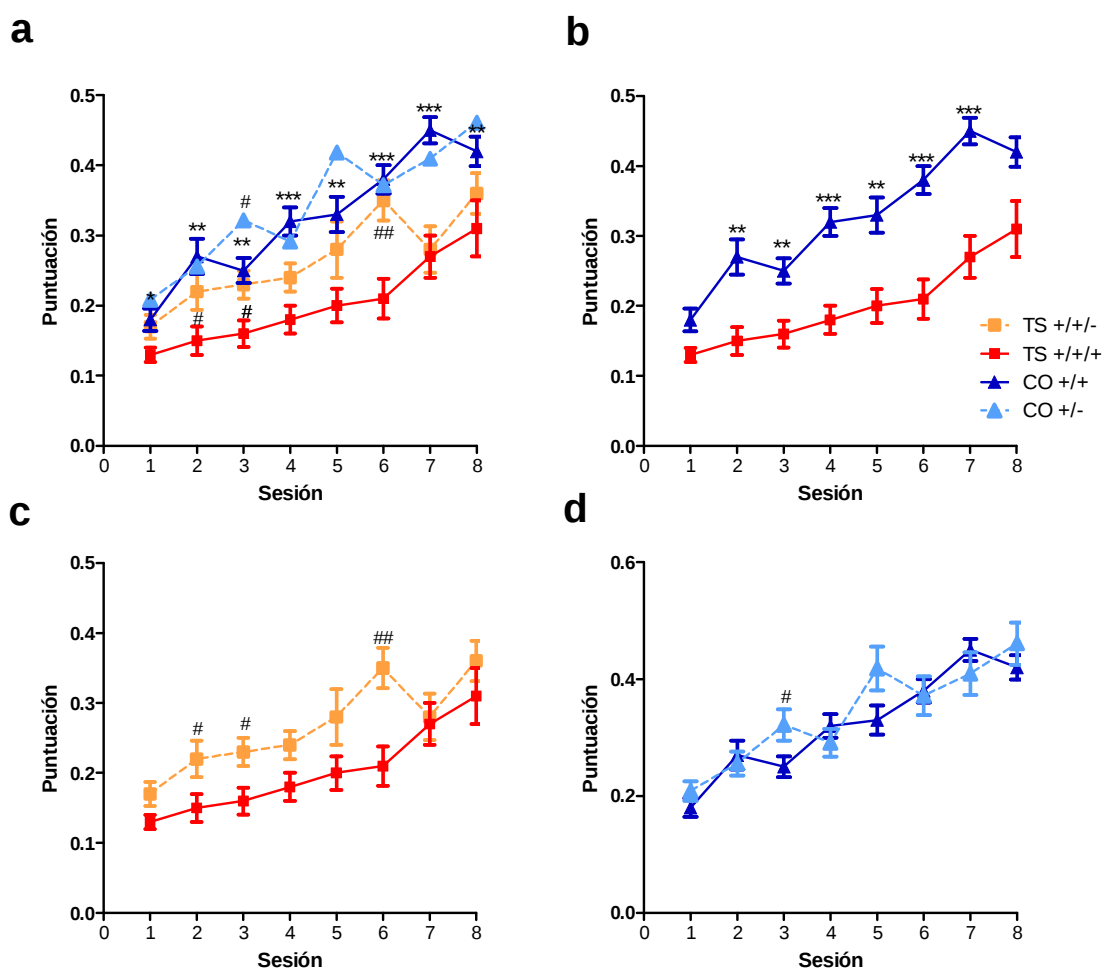


Figura 21. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* mejoró la eficacia de búsqueda de la plataforma del ratón TS. Eficacia de la trayectoria hallada para los ratones con distintas dosis de *Dyrk1A* expresada como la media de la puntuación $\pm$ E.E.M. (a), de los ratones TS +/+ y CO +/+ (b), TS +/+ y TS +/- (c) y CO +/- y CO +/- (d). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, TS +/+ vs. TS +/- y CO +/- vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Para evaluar **el aprendizaje y memoria procedimental** de los distintos genotipos se analizó su conducta tigmotáctica. Como se observa en la figura 22 a, los ratones TS +/+ mostraron una mayor tendencia a nadar por la periferia del laberinto al ser comparados con los CO +/+ ($p = 0.002$, ver tabla 10). Al normalizar la dosis génica en los ratones TS +/- se redujo significativamente esta conducta, lo que indica que estos animales desarrollaron una mejor estrategia de búsqueda de la plataforma en el laberinto ($p = 0.019$, ver tabla 10). Los ratones CO +/- no mostraron diferencias significativas en el tiempo que pasaron nadando en la periferia respecto a los individuos diploides ($p = 0.261$, ver tabla 10).

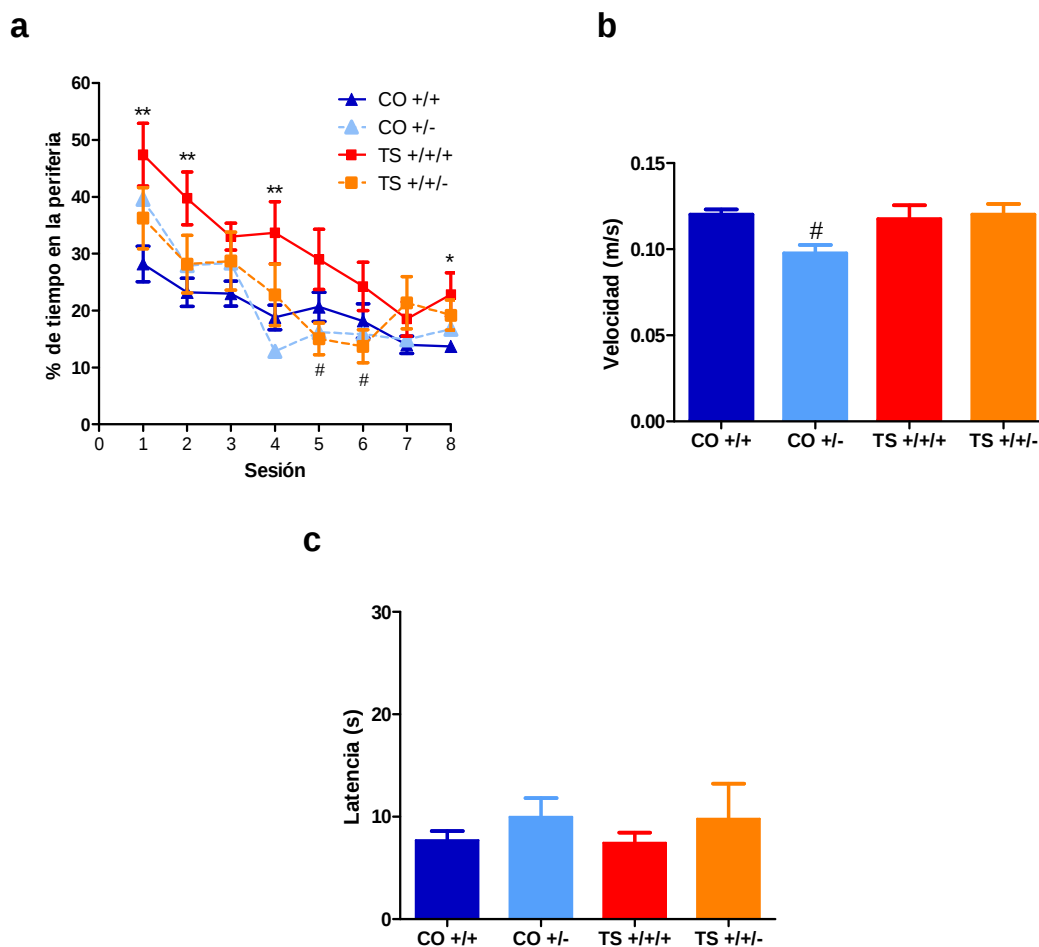


Figura 22. La reducción de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS +/- mejoró su comportamiento tigmotáctico, mientras que en el ratón CO +/- dio lugar a una reducción en su velocidad de natación. Media $\pm$ E.E.M. del porcentaje de tiempo que pasaron en la periferia del laberinto acuático a lo largo de las 8 sesiones de adquisición (a), de la velocidad media de natación en las mismas sesiones (b) y de la latencia de llegada a la plataforma durante las sesiones de aprendizaje guiado en el laberinto acuático de Morris de todos los grupos de ratones (c). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, TS +/+ vs. TS +/- y CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

La velocidad de natación de los ratones CO +/- fue menor que la del resto de grupos (MANOVA 'Trisomía' $F_{(1,44)}=4.35$, $p=0.040$; 'Trisomía x *Dyrk1A*' $F_{(1,44)}=6.16$, $p=0.015$; figura 22 b). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los demás grupos experimentales.

Finalmente, dado que durante las sesiones de aprendizaje guiado no se encontraron diferencias en la ejecución de los cuatro grupos de ratones ($p=0.98$; figura 22 c), las diferencias encontradas en los distintos procesos cognitivos evaluados durante las sesiones de adquisición no parecen ser debidas a alteraciones motoras o motivacionales, sino a alteraciones en los procesos de aprendizaje y la memoria.

Tabla 10. Valores F de los MANOVAs MR y análisis *post hoc* de cada variable independiente analizada durante las sesiones de adquisición y guiadas del laberinto acuático de Morris.

		Sesión	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
Memoria de referencia (S1-S8)	MANOVA MR Trisomía x <i>Dyrk1A</i>	F_(7,44)=23.98, p<0.001	F_(1,44)=12.39, p=0.001	F _(1,44) =0.88, p=0.353	F_(1,44)=6.62, p=0.013
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO +/+ vs. TS +/+	F_(1,21)=20.34, p<0.001		
		CO +/+ vs. CO +/-	F _(1,20) =2.14, p=0.159		
		TS +/+ vs. TS +/-	F_(1,21)=5.24, p=0.030		
		CO +/+ vs. TS +/-	F _(1,21) =3.57, p=0.072		
		CO +/+	F_(7,9)=7.67, p=0.020		
	Comparaciones <i>post hoc</i> mediante MANOVA MR (sesión x grupo)	CO +/-	F_(7,8)=9.22, p<0.024		
		TS +/+	F_(7,9)=14.69, p<0.001		
		TS +/-	F _(7,9) =3.57, p=0.118		
	MANOVA MR Trisomía x <i>Dyrk1A</i>	F_(7,44)=5.70, p<0.001	F_(1,44)=6.64, p=0.013	F _(1,44) =4.03, p=0.051	F_(1,44)=12.79, p=0.001
Memoria de trabajo (E1-E8)	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO +/+ vs. TS +/+	F_(1,21)=21.44, p<0.001		
		CO +/+ vs. CO +/-	F _(1,20) =2.14, p=0.159		
		TS +/+ vs. TS +/-	F_(1,21)=11.18, p=0.003		
		CO +/+ vs. TS +/-	F _(1,21) =0.23, p=0.636		
	Comparaciones <i>post hoc</i> mediante MANOVA MR (ensayo x grupo)	CO +/+	F_(7,9)=2.59, p=0.029		
		CO +/-	F_(7,8)=2.56, p=0.021		
		TS +/+	F _(7,9) =1.79, p=0.173		
		TS +/-	F_(7,9)=2.54, p=0.028		

Tabla 10 (continuación).

			Sesión	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
	MANOVA MR Trisomía x <i>Dyrk1A</i>		$F_{(1,44)}=6.55$, $p<0.001$	$F_{(1,44)}=4.38$, $p=0.042$	$F_{(1,44)}=2.57$, $p=0.116$	$F_{(1,44)}=8.32$, $p=0.006$
Tigmotaxis (S1-S8)	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO +/+ vs. TS +/+/+		$F_{(1,21)}=12.18$, $p=0.002$		
		CO +/+ vs. CO +/-			$F_{(1,20)}=1.32$, $p=0.261$	
		TS +/+/+ vs. TS +/-/-			$F_{(1,21)}=6.51$, $p=0.019$	
		CO +/+ vs. TS +/-/-				$F_{(1,21)}=0.35$, $p=0.563$
		CO +/+	$F_{(7,9)}=7.80$, $p<0.001$			
	Comparaciones <i>post hoc</i> mediante MANOVA MR (sesión x grupo)	CO +/-	$F_{(7,8)}=8.98$, $p<0.001$			
		TS +/+/+	$F_{(7,9)}=2.28$, $p=0.115$			
		TS +/-/-	$F_{(7,9)}=2.54$, $p=0.032$			
Sesiones de aprendizaje guiado	MANOVA Trisomía x <i>Dyrk1A</i>			$F_{(1,44)}=0.01$, $p=0.91$	$F_{(1,44)}=1.58$, $p=0.21$	$F_{(1,44)}=0.00$, $p=0.98$
Velocidad	MANOVA Trisomía x <i>Dyrk1A</i>			$F_{(1,44)}=4.36$, $p=0.040$	$F_{(1,44)}=3.53$, $p=0.064$	$F_{(1,44)}=6.16$, $p=0.015$
	MANOVA MR Trisomía x <i>Dyrk1A</i>		$F_{(1,44)}=25.44$ 2, $p<0.001$	$F_{(1,44)}=6.79$, $p=0.011$	$F_{(1,44)}=38.86$, $p<0.001$	$F_{(1,44)}=2.84$, $p=0.096$
Eficacia de la trayectoria (S1-S8)	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	CO +/+ vs. TS +/+/+		$F_{(1,21)}=41.07$, $p<0.001$		
		CO +/+ vs. CO +/-			$F_{(1,20)}=0.51$, $p=0.478$	
		TS +/+/+ vs. TS +/-/-			$F_{(1,21)}=7.676$, $p=0.008$	
		CO +/+ vs. TS +/-/-				$F_{(1,20)}=8.30$, $p=0.006$
		CO +/+	$F_{(7,9)}=21.16$, $p<0.001$			
	Comparaciones <i>post hoc</i> mediante MANOVA MR (sesión x grupo)	CO +/-	$F_{(7,8)}=7.22$, $p=0.001$			
		TS +/+/+	$F_{(7,9)}=3.14$, $p=0.036$			
		TS +/-/-	$F_{(7,9)}=7.08$, $p=0.001$			

4. Estudio del efecto de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre la capacidad de atención y la actividad exploratoria

Para valorar la capacidad de atención y la conducta exploratoria de los animales se utilizó la prueba de la tabla de agujeros. En esta prueba no se encontraron diferencias

entre los cuatro grupos de animales en la distancia recorrida, en el número de exploraciones de los agujeros o en el tiempo que pasaron explorándolos (tabla 11).

Además, tampoco se encontraron diferencias en el número de repeticiones en la exploración de agujeros recientemente explorados (índice ABA), lo que demuestra que ningún grupo tiene alterada su capacidad de atención. La tabla 11 muestra los resultados del análisis estadístico de las variables recogidas durante esta prueba.

Sin embargo, el ratón CO +/- mostró mayor actividad exploratoria que los otros grupos experimentales, ya que exploró los agujeros con objetos durante mucho más tiempo que el resto ($p=0.02$), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso del tiempo de exploración de los agujeros sin objetos o en el tiempo total de exploración.

Tabla 11. Media $\pm$ E.E.M. y valores F de los MANOVAs para cada variable independiente analizada en la prueba de la tabla de agujeros.

	TS		CO		MANOVAs $F_{(1,44)}$		
	+/+	+/-	+/+	+/-	Trisomía	Dyrk1A	Trisomía x Dyrk1A
<i>Distancia (m)</i>	10.62 $\pm$ 1.41	10.69 $\pm$ 0.88	7.76 $\pm$ 0.79	9.56 $\pm$ 1.07	2.41, $p=0.12$	0.71, $p=0.40$	1.072, $p=0.30$
<i>Velocidad (m/s)</i>	0.035 $\pm$ 0.005	0.035 $\pm$ 0.003	0.026 $\pm$ 0.003	0.033 $\pm$ 0.003	2.02, $p=0.16$	0.99, $p=0.32$	1.48, $p=0.23$
<i>Número de exploraciones</i>	22.45 $\pm$ 2.005	20.41 $\pm$ 1.64	19.75 $\pm$ 1.36	18.20 $\pm$ 1.32	3.23, $p=0.07$	0.83, $p=0.32$	0.08, $p=0.78$
<i>Tiempo explorando los agujeros (s)</i>	25.26 $\pm$ 4.16	24.31 $\pm$ 2.56	26.58 $\pm$ 2.89	31.13 $\pm$ 2.83	1.99, $p=0.16$	0.31, $p=0.58$	3.14, $p=0.08$
<i>Tiempo (s) de exploración de agujeros con objetos</i>	16.93 $\pm$ 3.08	13.27 $\pm$ 1.82	14.62 $\pm$ 1.82	21.12 $\pm$ 2.52^{##}	1.48, $p=0.23$	0.11, $p=0.74$	5.55, $p=0.02$
<i>Tiempo (s) de exploración de agujeros sin objetos</i>	8.36 $\pm$ 1.60	9.65 $\pm$ 0.84	9.90 $\pm$ 1.16	10.01 $\pm$ 1.36	1.06, $p=0.31$	0.44, $p=0.51$	0.04, $p=0.834$
<i>Índice ABA</i>	5.64 $\pm$ 0.63	5.59 $\pm$ 0.80	5.53 $\pm$ 0.67	4.67 $\pm$ 0.62	0.40, $p=0.53$	0.93, $p=0.34$	0.06, $p=0.80$

##: $p<0.01$, CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

5. Estudio del efecto de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre la actividad general y la ansiedad

En este estudio también se han evaluado factores emocionales, como la ansiedad, que influyen directamente sobre el comportamiento exploratorio y la actividad locomotora de los ratones y, por tanto, en la ejecución de otras pruebas que valoran procesos cognitivos. Para ello se analizó el comportamiento de los diferentes grupos experimentales en pruebas donde existe un conflicto entre la aversión natural de los roedores a los espacios abiertos y/o a las alturas y su tendencia innata a explorar ambientes nuevos.

5.1 Campo abierto

En esta prueba los ratones TS mostraron hiperactividad. Tanto los ratones TS +/+/+ como los TS +/-/- presentaron mayor actividad horizontal periférica y actividad total que los ratones CO +/+ (figura 23 a), aunque esta tendencia sólo alcanzó la significación estadística en el grupo TS +/+/+ respecto al grupo CO +/+ (actividad en la periferia: $p=0.022$; actividad total: $p=0.013$; figura 23 a). Estos resultados son consistentes con la mayor velocidad hallada en el grupo TS +/+/+ durante esta prueba que también refleja hiperactividad ($p=0.028$; figura 23 c). Disminuir la dosis de *Dyrk1A* en los ratones TS +/-/- no rescató la hiperactividad del grupo trisómico, ya que los ratones TS +/-/- no difirieron de los TS +/+/+ en actividad en la periferia ($p=0.505$), actividad total ($p=0.735$) o velocidad ($p=0.734$) durante la prueba. Por otro lado, la reducción de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón CO +/-/- dio lugar a un aumento de actividad en la periferia ($p=0.045$). Aunque estos ratones no presentaron un incremento estadísticamente significativo en la actividad total ($p=0.258$) o la velocidad ($p=0.253$) durante la prueba.

Los ratones TS +/+/+ y los TS +/-/- también mostraron una mayor actividad en el centro del aparato que los ratones CO +/+ y CO +/-/- ($p=0.001$; figura 23 a). A pesar de que la actividad en el centro del aparato ha sido considerada tradicionalmente una medida de ansiedad, la hiperactividad mostrada por estos ratones en la periferia y el hecho de que no se encontraron diferencias en el número de alzamientos efectuados

durante la prueba ($p=0.819$, figura 23 b), conducta ansiosa característica en ratones que constituye un intento de escape del aparato, sugiere que el incremento de actividad en el centro del aparato en ratones TS podría ser debida a su hiperactividad general por su menor capacidad para atender a estímulos potencialmente estresantes (ver discusión, apartado 3). La tabla 12 muestra los resultados del análisis estadístico de las variables recogidas durante esta prueba.

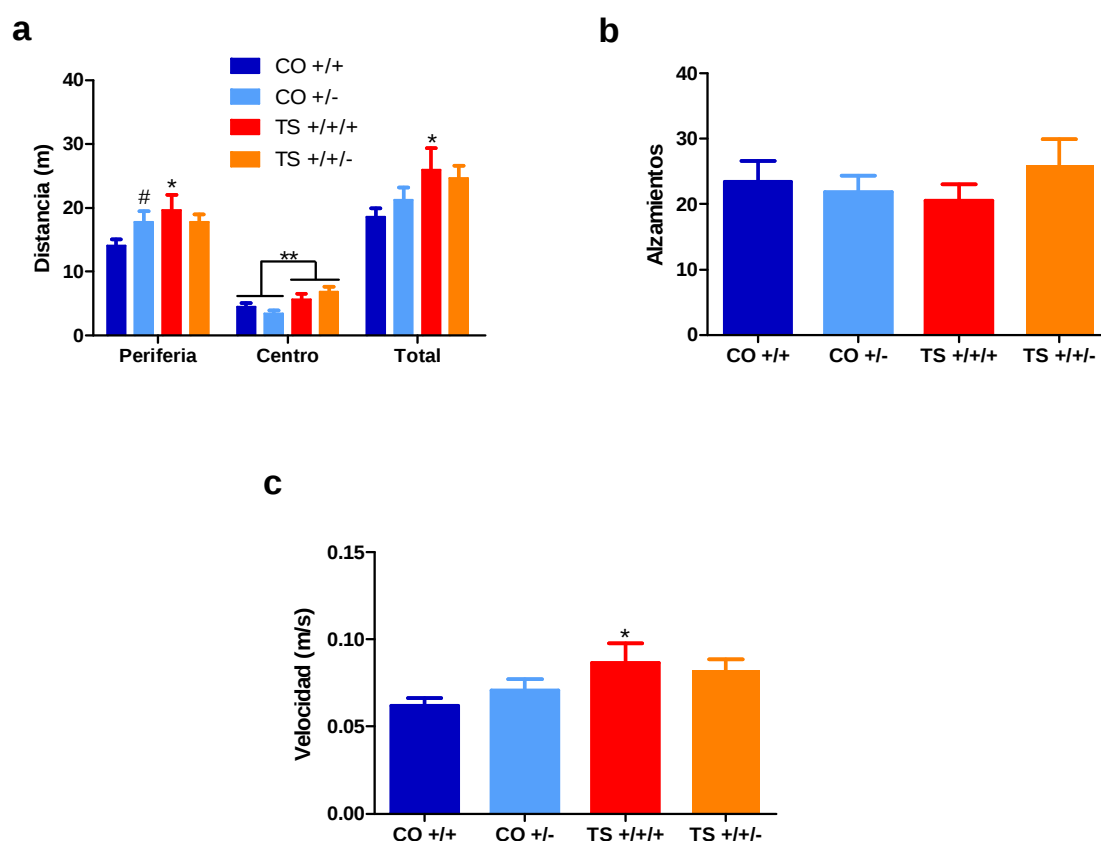


Figura 23. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* no afectó a los niveles de actividad general del ratón TS en el campo abierto. Media $\pm$ E.E.M. de la distancia recorrida (a), de los alzamientos (b) y de la velocidad de movimiento realizados por los distintos grupos de animales durante la prueba del campo abierto (c). *: $p<0.05$, ** $p<0.01$, TS +/+ vs. CO +/+. Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Tabla 12. Valores F del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) de cada variable analizada en el campo abierto.

		Distancia en el centro	Distancia en la periferia	Distancia Total	Alzamientos	Velocidad
MANOVAs F_(1,44)	Trisomía	10.960, p=0.001	3.264, p=0.074	6.374, p=0.013	0.759, p=0.386	6.391, p=0.013
	<i>Dyrk1A</i>	0.131, p=0.718	0.389, p=0.534	0.099, p=0.753	0.243, p=0.623	0.101, p=0.752
	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>	0.993, p=0.321	3.267, p=0.074	0.871, p=0.353	0.053, p=0.819	0.882, p=0.350

5.2 Laberinto en cruz

En la prueba del laberinto elevado en cruz se valoró nuevamente la actividad y los niveles de ansiedad de los grupos experimentales al ser expuestos a un ambiente nuevo con dos zonas diferenciales, una potencialmente aversiva (los brazos abiertos) y otra segura (los brazos cerrados). La tabla 13, muestra el análisis estadístico efectuado para los diversos parámetros evaluados en esta prueba.

Como se puede observar en la figura 24 a, los animales TS se mostraron hiperactivos respecto al grupo CO dado que realizaron un mayor número de entradas en los brazos abiertos del laberinto ($p=0.045$, tabla 13). También el número total de entradas en los brazos del aparato fue mayor ($p=0.030$, tabla 13). Además, los animales TS +/+ se movían a mayor velocidad ($p=0.044$, tabla 13, figura 24 c) y recorrieron una mayor distancia durante toda la prueba ($p=0.045$, figura 24 b, tabla 13) que los CO +/+. Sin embargo, la reducción de una copia del gen *Dyrk1A* produjo un incremento de la velocidad (c) ($p=0.035$, tabla 13) y de la distancia total recorrida ($p=0.045$, figura 24 b) tanto en los ratones CO +/- como en los TS +/-.

Por otro lado, los cuatro grupos de ratones no difirieron significativamente en ninguna de las medidas de ansiedad evaluadas en esta prueba (ver tabla 13). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de distancia que recorrieron en los brazos abiertos (figura 24 d), en el número de conductas de evaluación de riesgo

(figura 24 f) o en el tiempo de inmovilidad inicial (figura 24 e) que mostraron los ratones TS o CO con dosis normal o reducida de *Dyrk1A*.

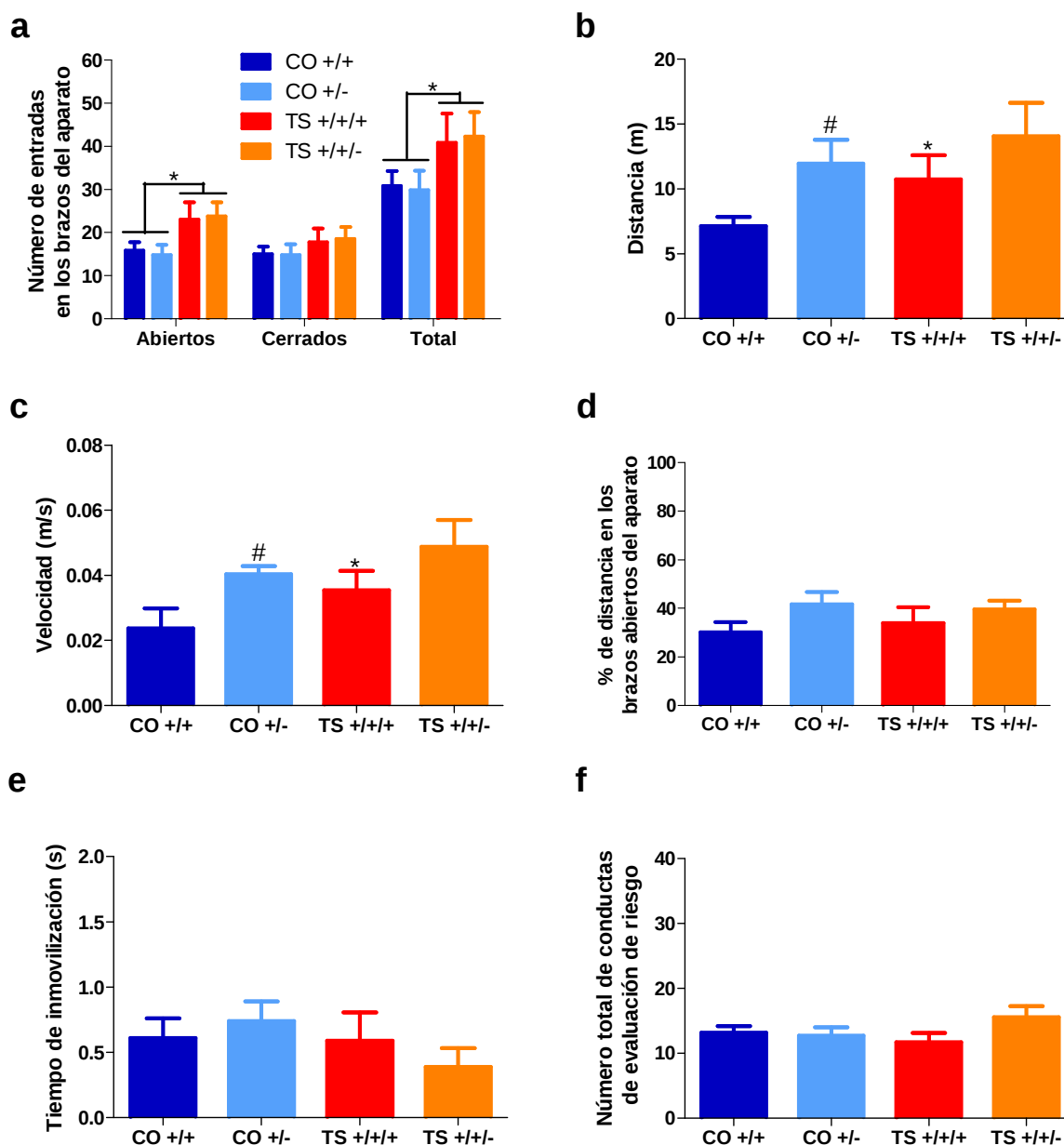


Figura 24. La reducción de la dosis de *Dyrk1A* en los animales CO +/- y TS +/- produjo un ligero aumento de la hiperactividad durante la prueba del laberinto en cruz. Media $\pm$ E.E.M del número de entradas en los brazos del aparato (a), de la distancia total recorrida (b), de la velocidad (c), del porcentaje de tiempo en los brazos abiertos (d), del tiempo de inmovilidad inicial (e) y del número de conductas de evaluación de riesgo (f) en el laberinto elevado en cruz mostrados por los animales de los distintos genotipos. *: $p < 0.05$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, TS +/+ vs. TS +/- y CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Tabla 13. Valores F del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) de cada variable analizada en el laberinto elevado en cruz.

	MANOVAs $F_{(1,44)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
<i>Número total de entradas</i>	2.839, p=0.095	0.138, p=0.711	1.167, p=0.283
<i>Número de entradas en los brazos abiertos</i>	4.124, p=0.045	0.120, p=0.729	0.550, p=0.460
<i>Número de entradas en los brazos cerrados</i>	1.099, p=0.297	0.121, p=0.729	1.760, p=0.188
<i>Distancia total recorrida</i>	2.547, p=0.114	4.130, p=0.045	0.083, p=0.774
<i>Velocidad</i>	2.699, p=0.104	4.590, p=0.035	0.092, p=0.762
<i>Tiempo de inmovilización inicial</i>	0.110, p=0.741	0.001, p=0.976	0.339, p=0.562
<i>% de distancia en los brazos abiertos</i>	0.080, p=0.779	1.812, p=0.782	0.114, p=0.737
<i>Número total de conductas de evaluación de riesgo</i>	0.790, p=0.376	0.169, p=0.682	0.937, p=0.336

6. Estudio del efecto de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre la actividad espontánea, los reflejos sensoriales y la coordinación motora

a) Actimetría

La figura 25 muestra la actividad espontánea de los distintos grupos de ratones durante un ciclo completo de luz-oscuridad de 24 horas. Los animales TS +/+ mostraron un aumento en su actividad durante la fase de luz (p=0.005), pero no durante la fase de oscuridad (p=0.849). Cuando se valoraron los efectos de la modificación de la dosis génica de *Dyrk1A* en ratones TS y CO se encontró que en ambos casos se produjo una disminución de la actividad general durante la fase de oscuridad (p=0.001), mientras que durante la fase de luz esta reducción sólo se observó en los animales TS +/- (p=0.024), lo que sugiere que esta condición genética afecta la actividad espontánea de los roedores.

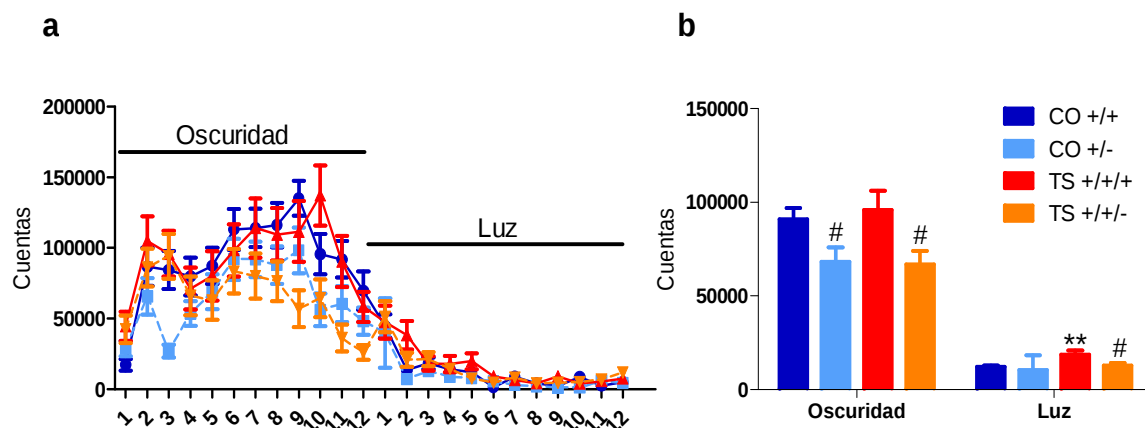


Figura 25. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS redujo la actividad general tanto durante la fase de luz como en la de oscuridad. Medias $\pm$ E.E.M. del número de cuentas realizadas por cada grupo de animales a lo largo de las 24 horas de registro (a) y del número medio de cuentas realizadas por cada grupo en los periodos de luz y de oscuridad (b). **: $p < 0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, TS +/+ vs. TS +/- y CO +/+ vs. CO +/-.

b) Batería de pruebas reflejas y motoras

En la tabla 14 se muestran las puntuaciones de distintos reflejos y habilidades motoras obtenidas por los distintos grupos experimentales. Aunque en la mayoría de pruebas no se encontraron diferencias entre los distintos grupos, se observó que los ratones TS presentaban una mayor respuesta de sobresalto y una menor latencia de llegada al extremo en la prueba de la percha, lo que indica una mayor respuesta a estímulos auditivos y una peor coordinación motora en estos ratones. La reducción de una copia del gen *Dyrk1A* en animales TS y euploides redujo la fuerza de agarre de estos animales; sin embargo, mejoró el equilibrio en la barra de madera, especialmente en el grupo TS+/-, aunque este patrón no se ratificó en el resto de pruebas relacionadas con el equilibrio. Por otro lado, el ratón CO +/- mostró alteraciones leves en la ejecución de algunas de las pruebas motoras, como el equilibrio en la barra de aluminio, la capacidad de tracción y la latencia de caída en la prueba de la percha, lo que indica una ligera disfunción motora, aunque esta tendencia no alcanzó la significación estadística en todos los casos.

Tabla 14. Media $\pm$ E.E.M. de las puntuaciones obtenidas por los distintos grupos experimentales y valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) de cada variable analizada en la batería de pruebas reflejas y motoras.

	TS		CO		MANOVAs $F_{(1,44)}$		
	+/+/+	+/+/-	+/+	+/-	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
<i>Respuesta de alcance</i> (puntuación: 0-4 x 3 ensayos)	1.86 $\pm$ 0.12	1.68 $\pm$ 0.12	1.83 $\pm$ 0.10	2.00 $\pm$ 0.08	0.99, p=0.323	0.003, p=0.959	1.36, p=0.246
<i>Respuesta de sobresalto</i> (puntuación: 0-3)	1.54 $\pm$ 0.12**	1.15 $\pm$ 0.09 [#]	1.03 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.12	8.70, p=0.004	3.45, p=0.066	2.47, p=0.119
<i>Reflejo de enderezamiento</i> (puntuación: 0-3)	2.95 $\pm$ 0.04	3.00 $\pm$ 0.00	2.96 $\pm$ 0.03	3.00 $\pm$ 0.00	0.064, p=0.800	2.23, p=0.138	0.06, p=0.800
<i>Fuerza de agarre</i> (puntuación: 0-3)	1.41 $\pm$ 0.12	1.34 $\pm$ 0.09 ^{§§}	1.77 $\pm$ 0.11	1.28 $\pm$ 0.09 ^{##}	1.96, p=0.165	6.75, p=0.011	3.97, p=0.049
<i>Latencia de caída de la barra de madera (s)</i>	2.27 $\pm$ 0.09	3.16 $\pm$ 0.23 ^{##}	2.64 $\pm$ 0.17	2.68 $\pm$ 0.22	0.063, p=0.802	4.95, p=0.028	4.23, p=0.042
<i>Equilibrio en la barra de madera</i> (puntuación: 1-3)	39.91 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 0.00	39.88 $\pm$ 0.12	0.048, p=0.826	0.048, p=0.826	2.54, p=0.114
<i>Latencia de caída de la barra de aluminio (s)</i>	1.00 $\pm$ 0.28	1.5 $\pm$ 0.29	1.55 $\pm$ 0.31	1.16 $\pm$ 0.35	0.11, p= 0.745	0.03, p=0.862	1.93, p=0.168
<i>Equilibrio en la barra de aluminio</i> (puntuación: 1-3)	21.77 $\pm$ 2.36	24.22 $\pm$ 2.36	23.22 $\pm$ 2.26	16.08 $\pm$ 3.06	1.71, p=0.193	0.85, p=0.359	3.53, p=0.063
<i>Reflejo prensil</i> (puntuación: 0-3)	2.5 $\pm$ 0.18	2.68 $\pm$ 0.11	2.68 $\pm$ 0.15	2.56 $\pm$ 0.16	0.00, p=0.988	0.007, p=0.935	0.73, p=0.394
<i>Capacidad de tracción</i> (puntuación 0-3)	2.77 $\pm$ 0.63	4.03 $\pm$ 0.54	3.52 $\pm$ 0.53	2.64 $\pm$ 0.50	0.34, p=0.563	0.18, p=0.733	3.65, p=0.059
<i>Latencia de caída en la percha (s)</i>	37.72 $\pm$ 4.88	38.28 $\pm$ 3.91	37.22 $\pm$ 4.11	32.56 $\pm$ 4.93	0.48, p=0.486	0.21, p=0.645	0.34, p=0.559
<i>Número de desplazamientos en la percha</i>	3.22 $\pm$ 0.66	4.03 $\pm$ 3.45	4.19 $\pm$ 0.70	4.16 $\pm$ 0.80	0.60, p=0.439	0.29, p=0.586	0.35, p=0.554
<i>Latencia de llegada en la percha (s)</i>	7.14 $\pm$ 2.55*	10.10 $\pm$ 2.23	12.35 $\pm$ 2.59	16.21 $\pm$ 3.63	4.12, p=0.045	1.49, p=0.225	0.02, p=0.874

*: p<0.05, **: p<0.01, TS +/+ vs. CO +/+; #: p<0.05, ##: p<0.01, CO +/+ vs. CO +/- y TS +/+ vs. TS +/-; §§: p<0.01 CO +/+ vs. TS +/--. Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

c) Rotarod

En la prueba de rotarod no se encontraron diferencias significativas en la ejecución de los ratones TS y CO en las distintas condiciones experimentales (Figura 26, tabla 15). Sin embargo, aunque la reducción de una copia del gen *Dyrk1A* produjo una tendencia no significativa a mejorar la ejecución en ratones CO y TS durante el ciclo de aceleración ($p=0.070$), los animales CO +/- presentaron mejor coordinación motora a distintas velocidades constantes, especialmente en las condiciones experimentales que conllevaban más dificultad (30 y 50 r.p.m.; $p=0.044$ y $p=0.009$ respectivamente, figura 26). Además, el grupo TS +/- también se mostró ligeramente más eficaz que los CO +/- y TS +/- a distintas velocidades constantes y el análisis *post hoc* demostró que los ratones TS +/- presentaban mejor coordinación motora que los CO +/- en el ciclo de aceleración ($p=0.027$).

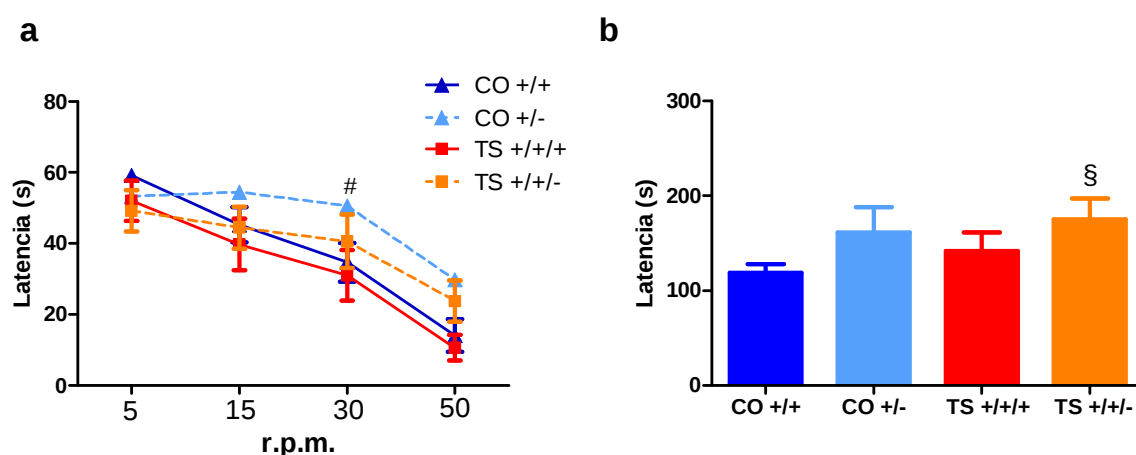


Figura 26. La disminución de una copia del gen *Dyrk1A* en ratones TS y CO mejoró la coordinación motora en la prueba de rotarod. Medias $\pm$ E.E.M. de la latencia de caída a distintas velocidades constantes (**a**) y de la latencia de caída durante el ciclo de aceleración (**b**). #: $p<0.05$, CO +/+ vs. CO +/-; §: $p<0.05$, CO +/+ vs. TS +/-/. Pruebas de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Tabla 15. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) de las distintas velocidades y el ciclo de aceleración en la prueba de rotarod.

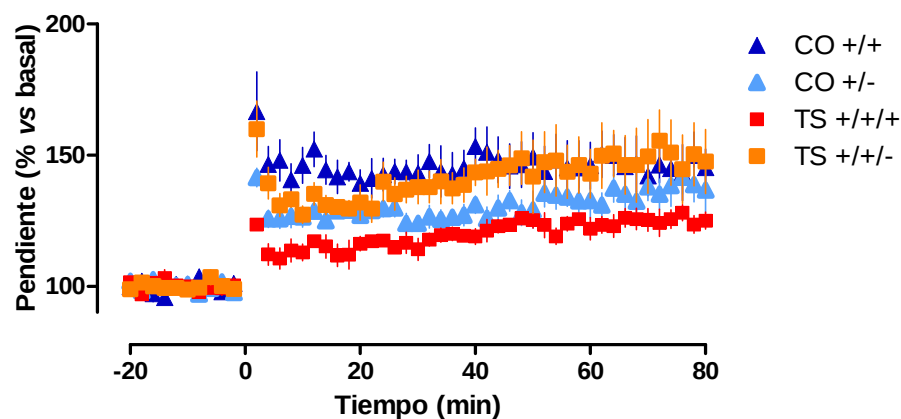
	MANOVAs F(1,44)		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
5 r.p.m.	1.467, p=0.233	0.887, p=0.352	0.110, p=0.742
15 r.p.m.	1.962, p=0.168	1.563, p=0.218	0.163, p=0.688
30 r.p.m.	1.239, p=0.272	4.314, p=0.044	0.266, p=0.609
50 r.p.m.	0.814, p=0.372	7.551, p=0.009	0.059, p=0.809
Ciclo de aceleración	0.816, p=0.371	3.451, p=0.070	0.052, p=0.821

7. Efecto de la dosis de *Dyrk1A* sobre la plasticidad sináptica del hipocampo (LTP)

Para valorar la implicación del gen *Dyrk1A* en la transmisión sináptica y la plasticidad del hipocampo se evaluó la capacidad de potenciar a largo plazo de los distintos genotipos analizando el cambio de potencial eléctrico post sináptico y su mantenimiento a lo largo del tiempo tras estimular la vía colateral de Schaffer.

Tal y como se muestra en la figura 27 a, las amplitudes de los fEPSPs no difirieron antes de la estimulación en los cuatro grupos experimentales, lo que indica que estos animales no presentaban diferencias en su actividad basal (ver tabla 16). Una vez inducida la LTP se observó que el ratón TS presentaba un déficit en su potenciación, siendo ésta mucho menor que la del ratón euploide ($p=0.003$) y por tanto presentando un defecto neuroplástico. Esta alteración desapareció tras la normalización de la dosis del gen *Dyrk1A* en el ratón TS +/- ($p=0.008$). De hecho, la magnitud de la potenciación de los ratones TS +/- no difirió de la de los ratones CO +/+ ($p=0.628$). Por su parte, los ratones haploinsuficientes CO +/- presentaron una disminución en su potenciación con respecto a los CO +/+ que no llegó a alcanzar la significación estadística ($p=0.057$). La tabla 16 muestra el análisis estadístico realizado en este experimento.

a



b

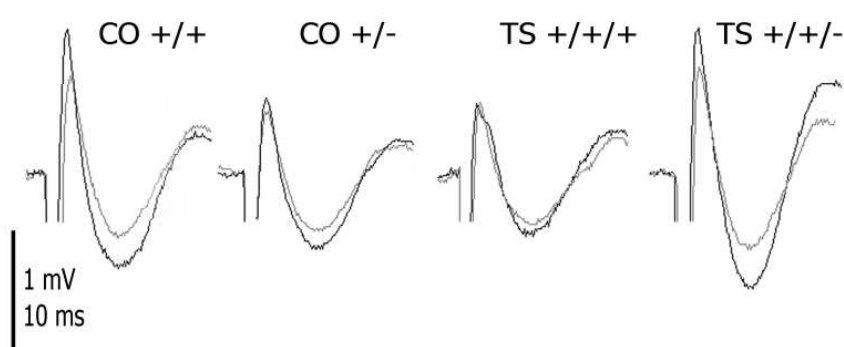


Figura 27. La normalización de la dosis de *Dyrk1A* recuperó la LTP de los ratones TS. Medias $\pm$ E.E.M. de las pendientes de los fEPSPs expresadas como porcentaje de cambio respecto al potencial eléctrico basal (a) y superposición de los fEPSPs registrados antes de emitir el estímulo (línea negra) y 60 minutos después de la estimulación (línea gris) para cada grupo experimental. Calibración: 10 ms, 1.0 mV (b).

Tabla 16. Valores F y p del MANOVA MR y análisis *post hoc* de las curvas de LTP.

		MANOVA $F_{(1,21)}$		
		Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
Basal		0.092, $p=0.765$	1.472, $p=0.240$	3.312, $p=0.085$
Tras la estimulación <i>Theta burst</i>	Todos los grupos, MANOVA trisomía x <i>Dyrk1A</i>	1.318, $p=0.265$	0.944, $p=0.343$	15.616, $p=0.001$
	Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas	CO +/+ vs. TS +/+	45.634, $p=0.003$	
		CO +/+ vs. TS +/-		0.254, $p=0.628$
		TS +/+ vs. TS +/-	11.701, $p=0.008$	
		CO +/+ vs. CO +/-	4.615, $p=0.057$	

8. Influencia de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre el fenotipo morfológico e histológico hipocampal

Teniendo en cuenta el papel del gen *Dyrk1A* y su dosis en el fenotipo cognitivo-conductual y electrofisiológico, la siguiente fase del estudio consistió en caracterizar el papel de este gen en diversos procesos celulares vinculados al aprendizaje y la memoria en el hipocampo.

8.1 *Dyrk1A* y el fenotipo anatómico hipocampal

Dado que el hipocampo es una de las estructuras encefálicas alteradas en los ratones TS, en primer lugar se valoró su arquitectura mediante el análisis métrico del DG y la SGZ. Los animales TS +/+ y TS +/- presentaron un DG y una SGZ de tamaño similar, ambos más reducidos que la de los ratones CO +/+ (figura 28). El grupo haploinsuficiente CO +/- mostró una marcada reducción de ambas estructuras (figuras 28 a, b y c). Por lo tanto, la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* no contrarrestó los defectos morfológicos del hipocampo del ratón TS y la reducción de una copia de este gen en los ratones CO +/- dio lugar a un acusado déficit en el volumen del DG y el área de la SGZ (ver tabla 17).

8.2 *Dyrk1A* y neurogénesis hipocampal adulta

Puesto que el deterioro de la neurogénesis hipocampal es una característica patológica importante en el SD y en el ratón TS y que numerosos estudios apoyan el papel de *Dyrk1A* en este proceso, se decidió evaluar la participación de este gen sobre los distintos estadios de proliferación, diferenciación y supervivencia neuronal en los ratones TS y CO.

8.2.1 Proliferación de progenitores neurales en la SGZ del hipocampo

El ratón TS +/+ presentó un marcado déficit tanto en el número total de células progenitoras en división Ki67+ (figuras 29 a y c), como en el número de progenitores activos por μm^2 (figura 29 b, tabla 18). Este defecto desapareció completamente al normalizar la dosis génica de *Dyrk1A* en el grupo TS +/-.

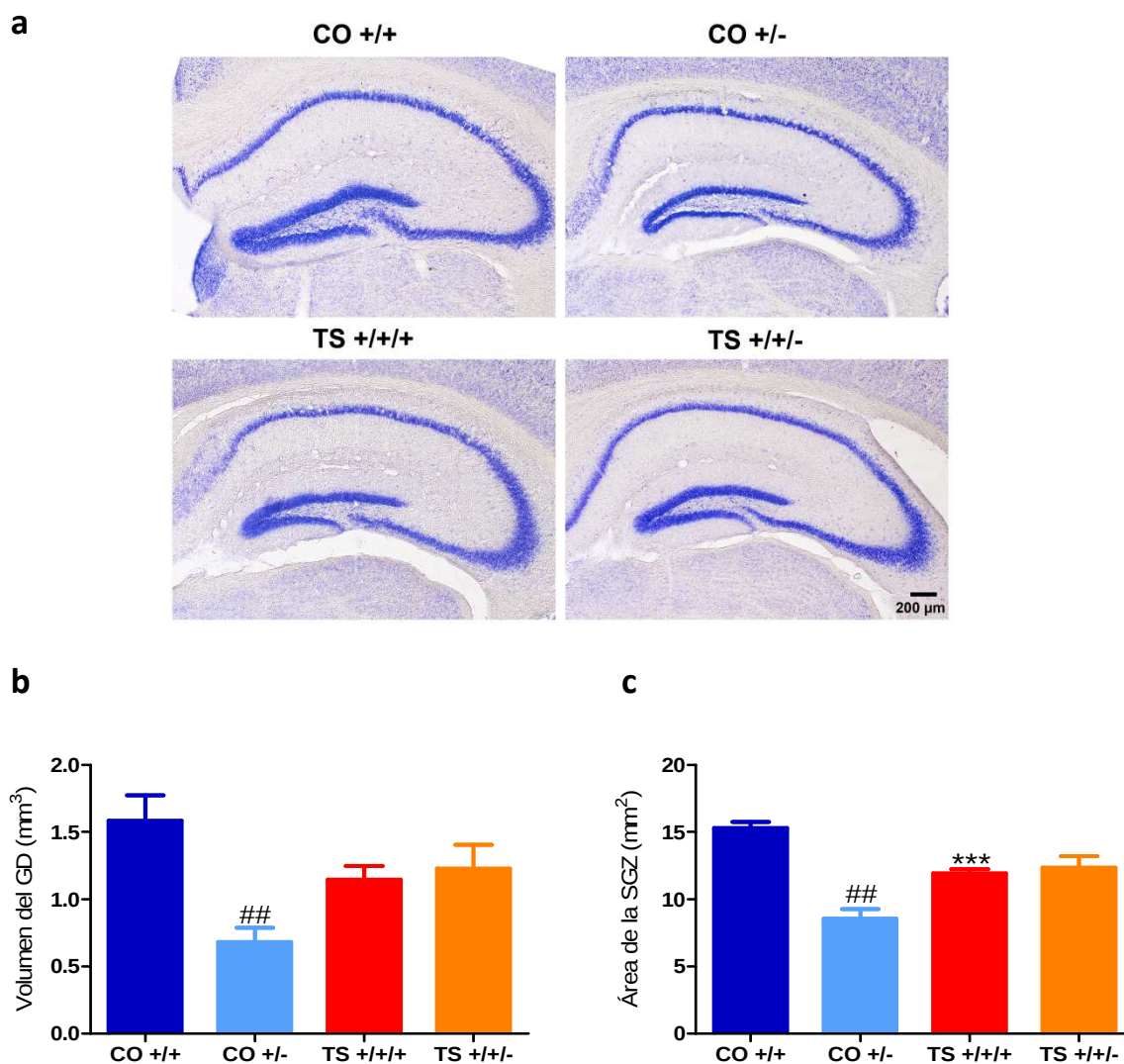


Figura 28. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en ratones TS no contrarrestó los defectos en el tamaño del DG o del área de la SGZ hipocampal. Imágenes representativas de la tinción de Nissl sobre las que se estimaron las medidas hipocampales. La barra de escala corresponde a 200 μm (a). Media $\pm$ E.E.M del volumen del DG (b) y del área de la SGZ del hipocampo (c). ***: $p < 0.001$, TS +/+ vs. CO +/+; ##: $p < 0.01$, CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Tabla 17. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) del volumen del DG y el área de la SGZ.

	MANOVAs $F_{(1,20)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
Volumen del DG	0.270, $p=0.610$	7.580, $p=0.013$	10.639, $p=0.004$
Área de la SGZ	0.127, $p=0.726$	26.273, $p<0.001$	33.402, $p<0.001$

Resultados

Por otro lado, los ratones CO +/- también mostraron un menor número de células Ki67+ que los CO +/+. Sin embargo, debido al menor tamaño de la SGZ de estos animales (ver apartado 8.1), cuando se valoró la densidad celular de progenitores respecto al tamaño de su SGZ la diferencia entre los animales CO +/- y CO +/+ no alcanzó la significación estadística ($p=0.649$).

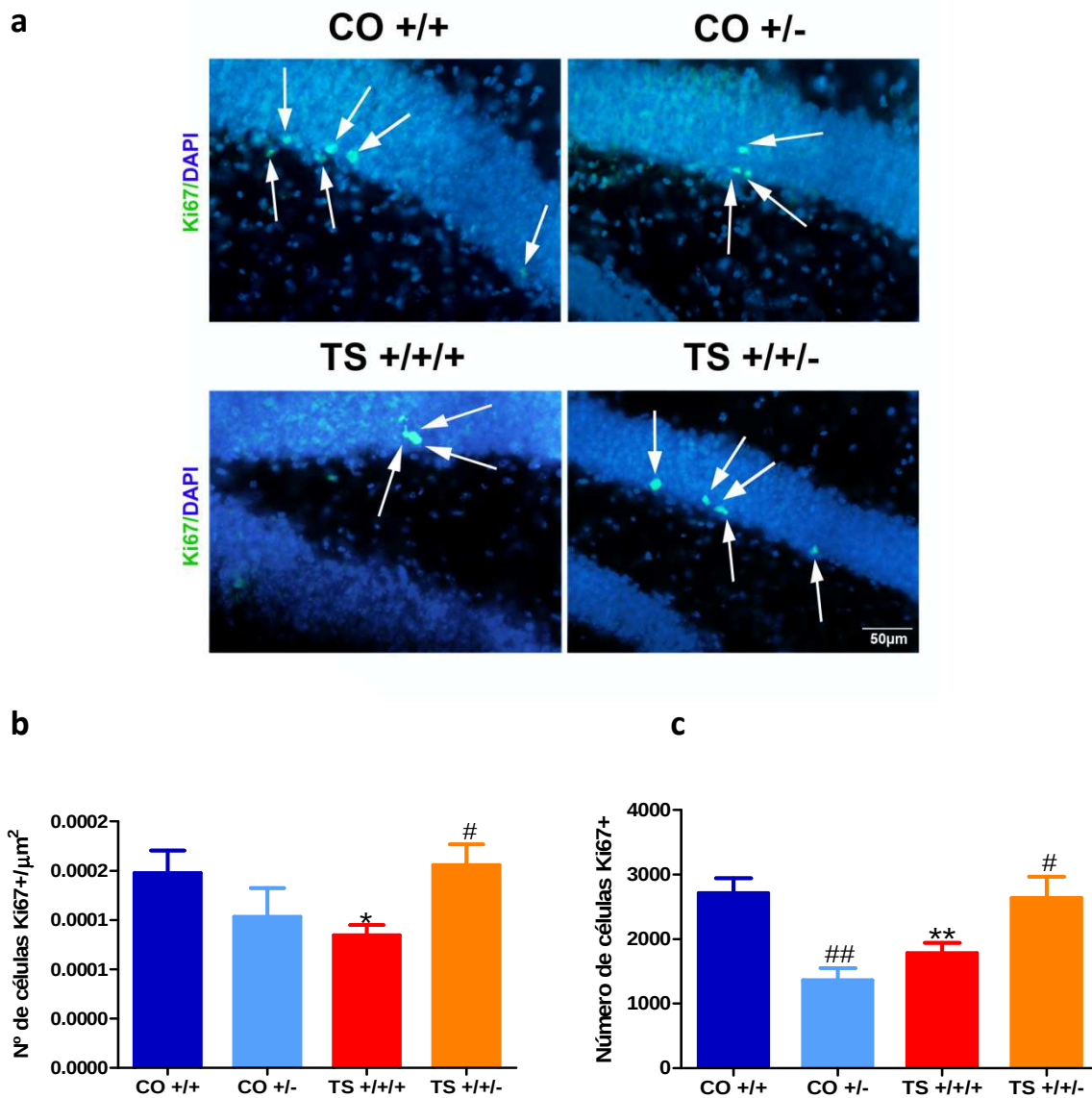


Figura 29. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* recuperó la proliferación celular en el hipocampo de los ratones TS. Imágenes representativas de la coinmunotinción con DAPI (marcador de núcleos celulares) y Ki67 (marcador de células proliferativas) en el DG del hipocampo. Las flechas indican las células Ki67 positivas. La barra de escala corresponde a 50 µm (a). Medias $\pm$ E.E.M. de la densidad de células Ki67 positivas (b) y del número total de las mismas (c) en la SGZ. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p<0.05$, ##: $p<0.01$ CO +/- vs. CO +/+ y TS +/- vs. TS +/+. Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Tabla 18. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) del número total y la densidad de células Ki67+.

	MANOVAs $F_{(1,20)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
Número total de células Ki67+	0.487, p=0.487	1.037, p=0.321	20.432, p<0.001
Densidad (Ki67+/ μm^2)	0.06, p=0.810	0.390, p=0.540	7.426, p=0.013

8.2.2 Diferenciación celular temprana en la SGZ del hipocampo

A continuación se procedió a la identificación de neuroblastos en distintos estadios de diferenciación hacia neuronas maduras. Los ratones TS +/+ presentaron menos células en estadios de diferenciación temprana (DCX+/CLR-, figura 30 b y CLR+, figura 30 d, tabla 19) en su SGZ en comparación con los animales del grupo CO +/+. Tras la reducción de la dosis génica de *Dyrk1A* en los ratones TS +/-, el número de células DCX+/CLR- y CLR+ se recuperó parcialmente (figura 30, tabla 19). Cuando se valoró la densidad de ambas poblaciones celulares, se observó que la densidad se normalizó parcialmente en el caso de las DCX+ y totalmente en el caso de las CLR+ tras la reducción de la dosis génica de *Dyrk1A* en ratones TS +/- (figuras 30 c y e, tabla 19). El grupo haploinsuficiente CO +/- también mostró deficiencias en los procesos de diferenciación celular. Así, en comparación con el grupo CO +/+, los animales CO +/- presentaron una reducción en el número, pero no en la densidad (figuras 30 c y e, tabla 19) de células escasamente diferenciadas (DCX+/CLR-). Sin embargo, en el caso de células en estadios más avanzados de diferenciación, estos animales presentaron una disminución, que no alcanzó la significación estadística, tanto en el número total (p=0.058, figura 30 c), como en la densidad (p=0.27; figura 30 d) de células CLR+. Por lo tanto, la reducción del nivel de expresión de *Dyrk1A* en el ratón TS rescató parcialmente sus déficits en la diferenciación neuronal, pero produjo una pequeña alteración en los animales CO +/-.

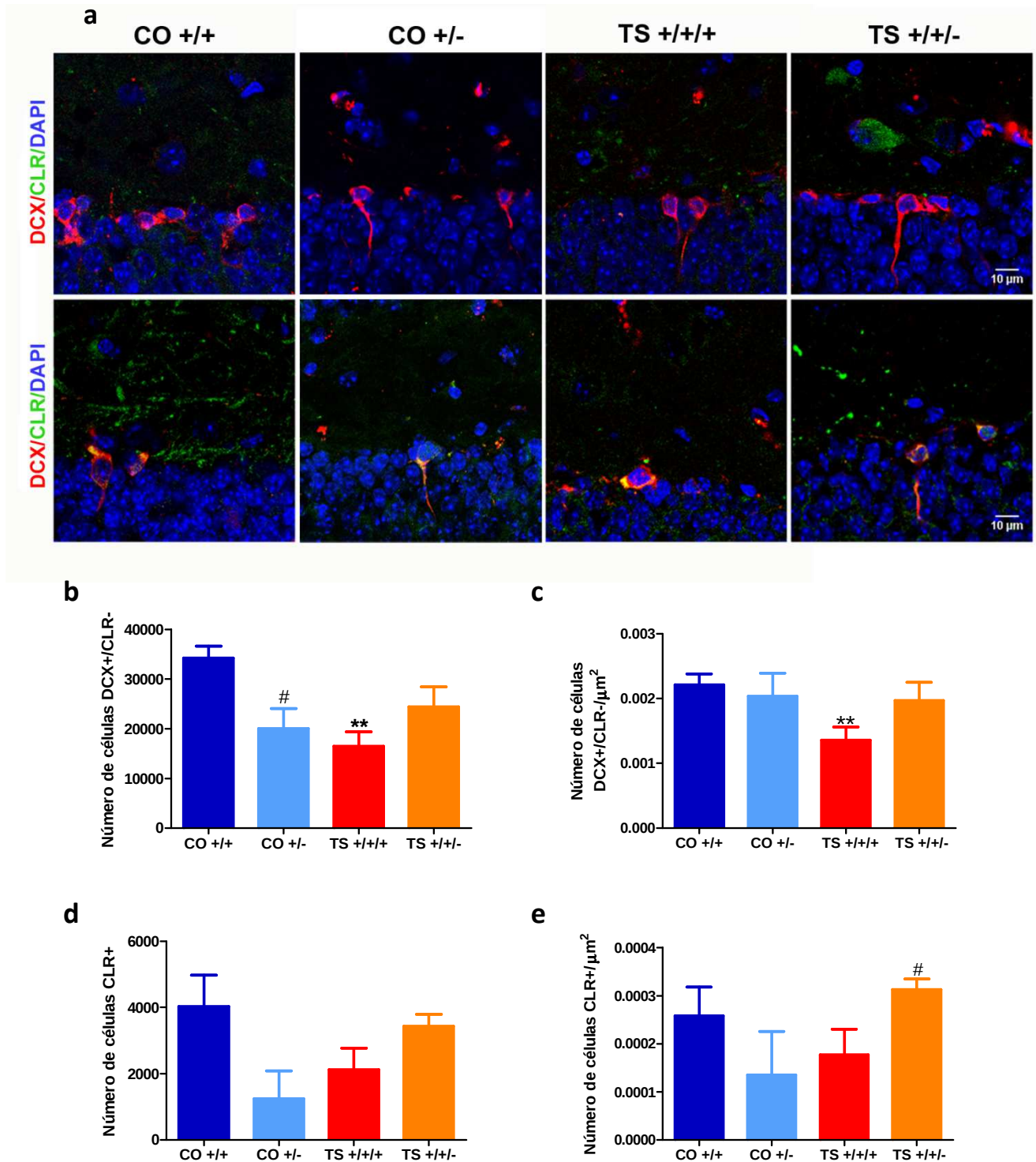


Figura 30. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* recuperó parcialmente la diferenciación neuronal en el hipocampo de los ratones TS. Imágenes representativas de las poblaciones celulares identificadas mediante la coinmunotinción de DCX con CLR. La barra de escala corresponde a 10 μm (a). Medias ± E.E.M. del número total (b) y la densidad (c) de células DCX+/CLR- y del número total (d) y densidad (e) de células CLR+ (DCX+/CLR+ y DCX-/CLR+) en la SGZ del hipocampo. **: $p < 0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$ CO +/+ vs. CO +/- y TS +/+ vs. TS +/- . Test de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Tabla 19. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) del número y densidad de células DCX+/CLR- y CLR+ en la SGZ.

	MANOVAs $F_{(1,20)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
Número total de células DCX+/CLR-	2.290, p=0.105	0.617, p=0.442	10.549, p=0.004
Densidad (DCX+/CLR-/μm ²)	3.241, p=0.089	0.684, p=0.419	2.224, p=0.153
Número total de células CLR+	0.035, p=0.854	0.976, p=0.336	7.404, p=0.014
Densidad (CLR+/μm ²)	0.630, p=0.438	0.010, p=0.921	4.522, p=0.048

8.2.3 Densidad celular en el DG del hipocampo

Para valorar la supervivencia de las células maduras del DG, a continuación se evaluó el número total de células y su densidad en esta estructura. Para ello se efectuó un recuento nuclear total, utilizando el marcador DAPI, sin discernir tipos celulares, dado que la composición fundamental del DG es la neurona granular madura.

Así pues, cuando se examinó el número total de células (figuras 31 a y b, tabla 20) y su densidad (figura 31 c, tabla 20) en el DG en los distintos grupos experimentales se encontró una marcada hipocelularidad en el ratón TS +/+/. Tras la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS +/- no se observó un incremento estadísticamente significativo en el número total o la densidad de este grupo de células. Estos resultados sugieren que la normalización de la dosis del gen *Dyrk1A* en animales TS mejora los defectos en la proliferación y la diferenciación pero que las neuronas generadas no sobreviven para integrarse de forma permanente en los circuitos funcionales; lo que se podría traducir en una corrección incompleta de la fisiología hipocampal.

Por otro lado, cuando se contabilizó estereológicamente el número total de células del DG de los animales CO +/-, éstos mostraron una fuerte reducción respecto a los animales CO +/+ (p=0.040), mientras que su densidad celular fue completamente normal (p=0.753) (figuras 31 a y c, tabla 20). Estos resultados sugieren que la reducción en el número total de células encontrada en los ratones CO +/- da lugar al menor tamaño de su DG (ver sección 8.1).

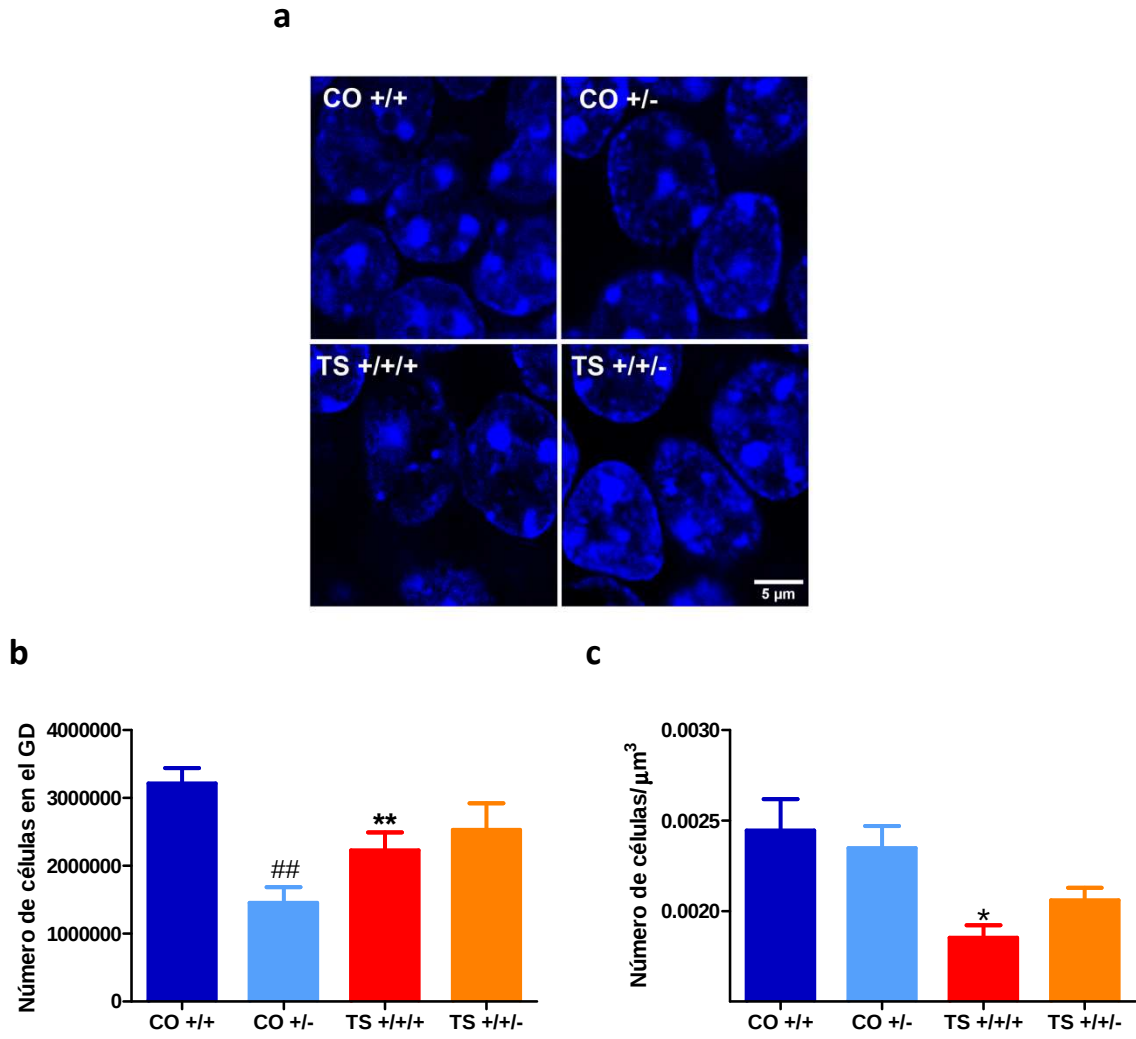


Figura 31. La corrección de la dosis génica de *Dyrk1A* no recuperó el número total ni la densidad de células granulares del hipocampo de los ratones TS. Imágenes representativas de la inmunotinción con DAPI en el DG hipocampal. La barra de escala corresponde a 5 μm (a). Medias $\pm$ E.E.M. del número de células DAPI-positivas (b) y su densidad por μm^3 (c) en el DG. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; ##: $p < 0.01$ CO +/+ vs. CO +/- y TS +/+ vs. TS +/-/. Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Tabla 20. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) del número total y densidad de células DAPI positivas.

	MANOVAs $F_{(1,20)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
Número total de células	0.368, $p=0.553$	5.039. $p=0.040$	16.666, $p=0.001$
Densidad (DAPI/ μm^3)	14.374, $p=0.002$	0.103, $p=0.753$	1.928, $p=0.185$

8.2.4 Influencia de la dosis de *Dyrk1A* sobre el balance excitador-inhibidor sináptica del DG

A continuación se realizó una estimación de los niveles de excitación y de inhibición y del balance inhibidor-excitador en la ML del DG. En primer lugar, se valoró el porcentaje de área ocupada por ambos tipos de sinapsis juntas. Los ratones TS +/+ presentaron una disminución en la densidad de todos los marcadores sinápticos analizados (figura 32 a, tabla 21). La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS +/- produjo un incremento en los niveles totales de marcaje positivo para la suma ambos tipos de sinapsis. Aunque este efecto no alcanzó la significación estadística al ser comparado con el grupo TS +/+ ($p=0.165$) el porcentaje de área ocupada por sinapsis de ambos tipos en este grupo no difirió del grupo CO +/+ ($p=0.638$). Por otro lado, el ratón CO +/- tampoco difirió estadísticamente del CO +/+ en el número total de sinapsis ($p=0.630$).

Cuando se analizó por separado el área ocupada por marcadores de sinapsis excitadoras o inhibitoras se observó que el ratón TS +/+ presentaba un marcaje positivo para GAD65/67 mucho más elevado que el del grupo CO +/+ ($p=0.016$, figura 32 b, tabla 21). Por otro lado, estos animales mostraron una reducción en la expresión del marcador de sinapsis glutamatérgicas VGLUT1 ($p=0.004$, figura 32 c, tabla 21). Por tanto, al valorar el equilibrio excitador/inhibidor de las transmisiones sinápticas recibidas por las neuronas granulares calculando el ratio entre el porcentaje de sinapsis excitadoras e inhibitoras se encontró que los ratones TS +/+ presentaban un desequilibrio, siendo mucho menor la proporción de sinapsis excitadoras que inhibitoras respecto a las proporciones encontradas en el grupo CO +/+ (figura 32 d, tabla 21). Por otro lado, los animales TS +/- cuya dosis de *Dyrk1A* fue normalizada, mostraron una reducción del área ocupada por el marcador de sinapsis inhibitoras (figura 32 b, tabla 21), así como un incremento en el área ocupada por botones VGLUT1, y por tanto de sinapsis excitadoras (n. s.; figura 32 c, tabla 21), en comparación con los niveles encontrados en los animales TS +/+. En consecuencia, el ratio del área ocupada por marcadores excitadores e inhibidores en ratones TS +/- también mejoró ($p<0.001$; figura 32 d, tabla 21), aunque este equilibrio no se normalizó totalmente, ya que seguía existiendo una tendencia a una mayor inhibición

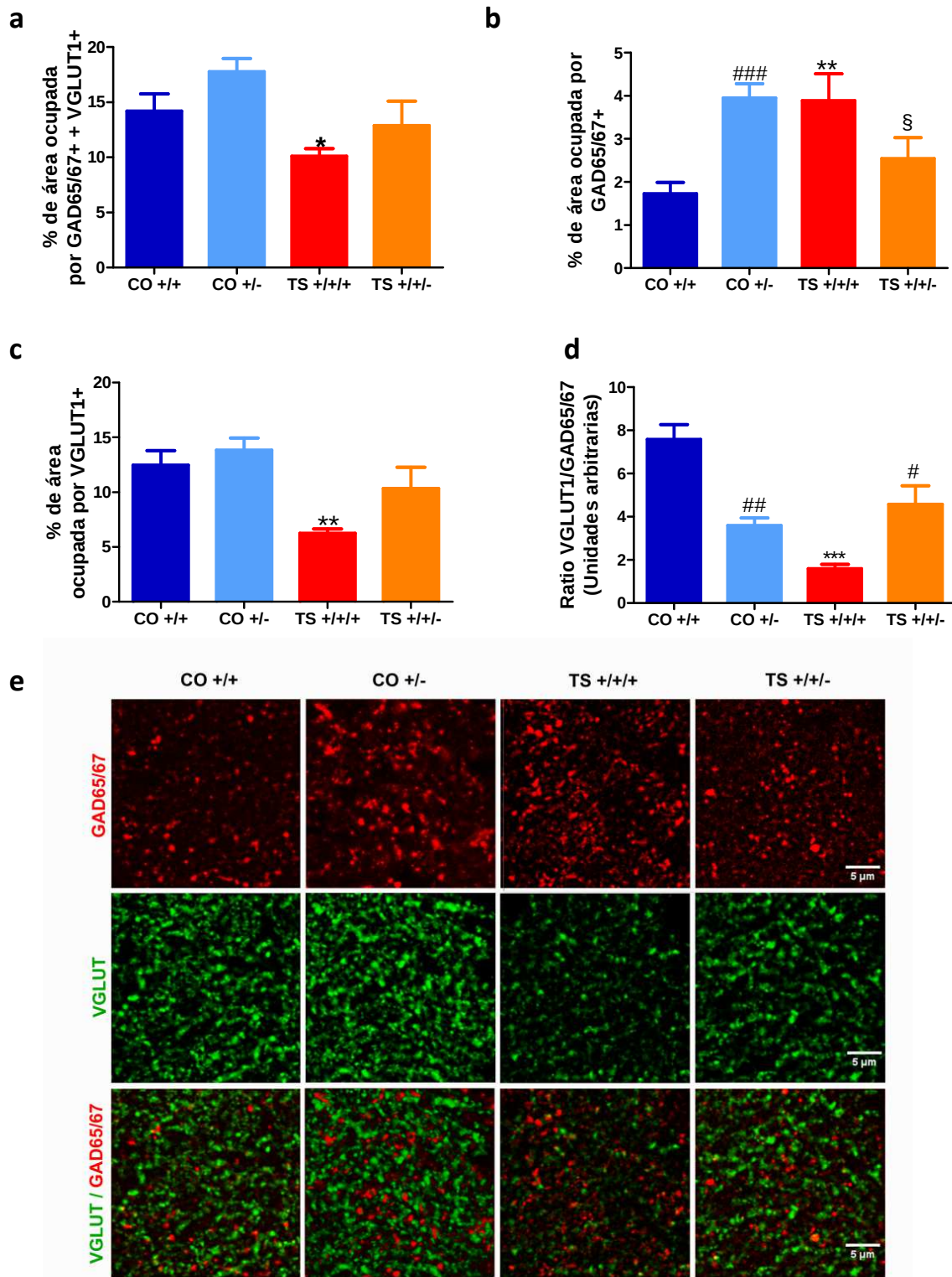


Figura 32. La normalización del número de copias de *Dyrk1A* en ratones TS mejoró el balance entre la cantidad de sinapsis inhibitoras y excitadoras. Medias $\pm$ E.E.M. del porcentaje de área total marcada positivamente (a), de área ocupada por marcaje GAD65/67+ (b), de área ocupada por VGLUT1+ (c) y del ratio entre ambos marcadores (d). Imágenes representativas de la coinmunotinción realizada. La barra de escala corresponde a 5 µm (e). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$, TS +/+ vs. TS +/- y CO +/+ vs. CO +/-; §: $p < 0.05$, CO +/+ vs. TS +/-/. Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

que en el grupo CO +/+ ($p=0.021$, figura 32 d, tabla 21). Por su parte, el ratón CO +/- presentó un exceso de inhibición muy acusada respecto al grupo CO +/+ ($p=0.001$, figura 32 b, tabla 21). En contraste, su nivel de excitación fue normal ($p=0.458$, figura 32 c, tabla 21). Debido a su marcada sobre-inhibición, el balance entre ambos tipos de marcadores sinápticos resultó alterado ($p<0.001$; figura 32 d).

Tabla 21. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) del porcentaje del área total ocupada por botones GAD65/67+ y VGLUT1+, del área ocupada individualmente por cada marcador y del ratio entre ambos marcadores.

	MANOVAs $F_{(1,20)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
% de área teñida por GAD65/67+ y VGLUT1+	8.330, $p=0.009$	4.162, $p=0.055$	0.066, $p=0.800$
% de área teñida por GAD65/67+	0.667, $p=0.424$	0.918, $p=0.350$	15.113, $p=0.001$
% de área teñida por VGLUT1+	13.174, $p=0.002$	4.159, $p=0.056$	1.068, $p=0.314$
Ratio GAD65/67+ / VGLUT1+	15.241, $p=0.001$	1.007, $p=0.328$	30.500, $p<0.001$

9. Contribución de la dosis génica de *Dyrk1A* al fenotipo cerebelar

Dado que el cerebelo es otra de las regiones profundamente afectada a nivel morfológico tanto en el SD como en el ratón TS y teniendo en cuenta que la modificación de la dosis de *Dyrk1A* afecta a diversos procesos cognitivos en los que participa activamente esta estructura (ver Introducción, apartado 1.4), la siguiente fase del trabajo consistió en profundizar en la morfología cerebelar del modelo murino objeto de estudio.

9.1 Análisis histológico del cerebelo

La valoración métrica del cerebelo se realizó indirectamente, ya que se estimó el porcentaje de cambio del área del vermis de los distintos grupos experimentales respecto al grupo CO +/+ (ver Material y Métodos).

Los ratones TS +/- presentaron una fuerte reducción del tamaño del cerebelo (12.9% menor que el de los ratones CO +/+, figura 33), pero la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* hizo desaparecer completamente esta alteración, ya que el tamaño del cerebelo de los animales TS +/- era similar al de los CO +/+ (MANOVA 'Trisomía'

Resultados

$F_{(1,28)}=0.02$, $p=0.889$; '*Dyrk1A*' $F_{(1,28)}=0.155$, $p=0.697$; 'Trisomía x *Dyrk1A*' $F_{(1,28)}=3.877$, $p=0.007$; figura 33). En cuanto al grupo CO +/-, la reducción de *Dyrk1A* a una única copia funcional también dio lugar a una importante disminución del tamaño cerebelar del 10.7 % respecto a los ratones CO +/+.

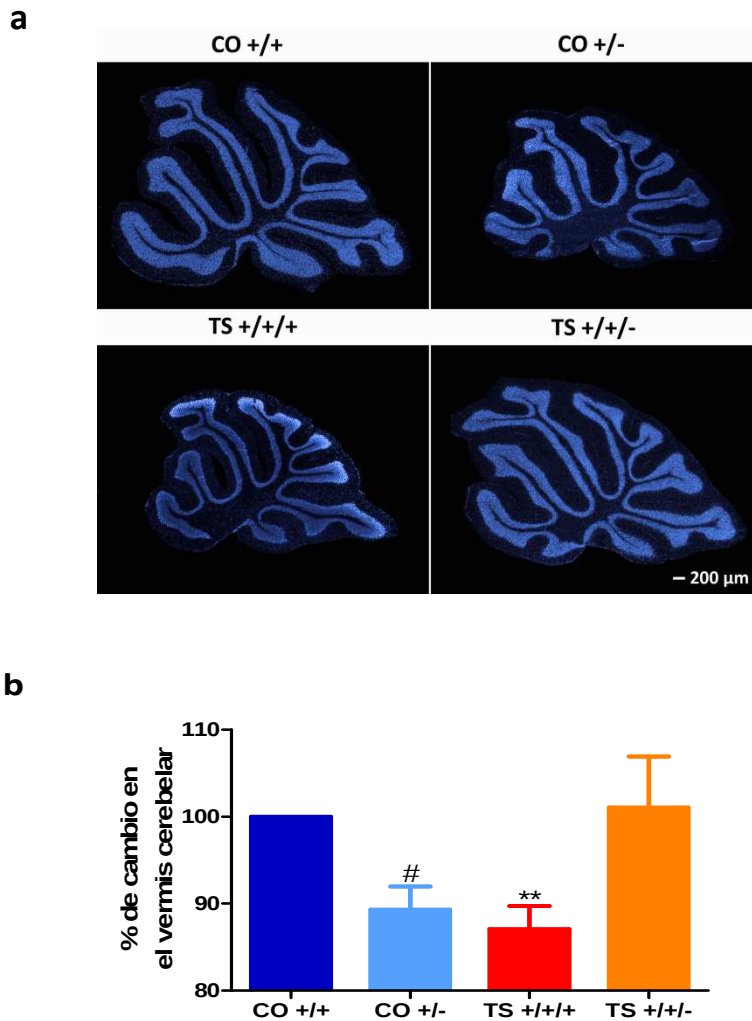


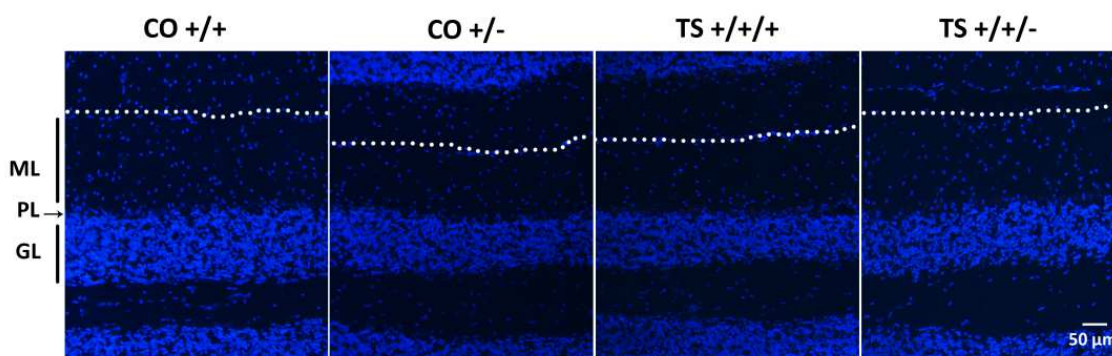
Figura 33. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* recuperó el tamaño del vermis cerebelar del ratón TS. Fotografías representativas del vermis cerebelar teñido con DAPI de los cuatro grupos de ratones. La barra de escala corresponde a 200 μ m (a). Porcentaje de cambio en el área del vermis cerebelar respecto al fenotipo euploide (representado como el 100%) (b). **: $p<0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p<0.05$, CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

Para caracterizar en mayor profundidad el origen de la marcada reducción del volumen del cerebelo en el ratón TS $+/+/+$ y su recuperación en animales TS $+/+/-$, se determinó el grosor de la capa granular (*Granular Layer*, GL) y la ML del cerebelo. El ratón TS $+/+/+$ presentó una reducción del 11.8 % del tamaño de la GL respecto a la de los animales CO $+/+$ (figuras 34 a y b, tabla 22), mientras que la diferencia entre ambos grupos fue de un 16.8 % en el caso de la ML (figuras 34 a y c, tabla 22), es decir, ambas capas se vieron reducidas, en especial esta última. El ratón TS $+/+/-$ presentó una mejoría en la arquitectura de ambas capas, mostrando un incremento de tamaño del 7.6% en la GL, y un 9.6% en la ML respecto a los animales TS $+/+/+$. Aunque esta tendencia no alcanzó la significación estadística, los animales TS $+/+/-$ no difirieron de los CO $+/+$ en el grosor de ambas capas. Al igual que en el ratón TS $+/+/+$ y consistentemente con la reducción en el tamaño del cerebelo descrito en el ratón CO $+/+$, estos animales también presentaron una reducción del 12.5 % del grosor de la GL y de un 18.9 % para la ML respecto al grupo CO $+/+$ (figuras 34 a, b y c, tabla 22). Estos resultados indican que *Dyrk1A* también influye en la anatomía del cerebelo y que la normalización de la dosis génica en los animales TS $+/+/-$ contribuye a mejorar su fenotipo cerebelar, especialmente el de la ML.

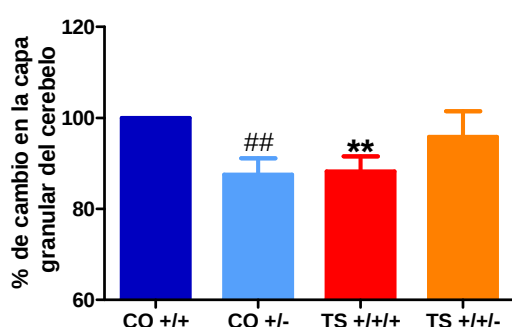
Tabla 22. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) del tamaño de las capas granular y molecular del cerebelo.

	MANOVAs $F_{(1,28)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
GL	0.212, p=0.679	0.412. p=0.527	7.278, p=0.012
ML	0.705, p=0.408	2.443, p=0.130	22.947, p<0.001

a



b



c

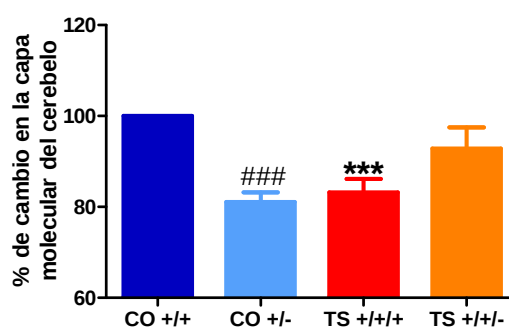


Figura 34. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* contribuyó parcialmente a la recuperación de la arquitectura cerebelar en los ratones TS. Tinción con DAPI representando la GL y la ML del cerebelo de cada genotipo, separadas ambas estructuras por la línea de las células de Purkinje (*Purkinje Layer*, PL). La línea de puntos blanca delimita el final de la ML en cada caso. La barra de escala corresponde a 50 μ m (a). Porcentaje de cambio respecto al fenotipo euploide CO +/+ en el grosor de la GL y ML (b y c). **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, TS +/+ vs. CO +/+; ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$, CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

9.2 Densidad de neuronas granulares

Dado que la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS +/- supuso la recuperación parcial de la GL, sería esperable encontrar una tendencia similar en el número de células granulares. Para determinar si las diferencias halladas en la GL entre los distintos grupos experimentales se deben a este motivo o al empaquetamiento celular se determinó la densidad celular de esta región. Así, como se puede observar en las figuras 35 a y b, el ratón TS+/+ presentaba una marcada disminución en el número de células granulares ($p < 0.001$). La reducción de una copia del gen *Dyrk1A* en el ratón TS +/- produjo una recuperación casi completa de este

parámetro. Por otro lado, los ratones CO +/- presentaron una alta densidad celular, mucho mayor que la del grupo CO +/+ (MANOVA 'Trisomía': $F_{(1,28)}=100.582$, $p<0.001$; 'Dyrk1A': $F_{(1,28)}=55.634$, $p<0.001$; 'Trisomía x Dyrk1A': $F_{(1,28)}=0.044$, $p=0.835$).

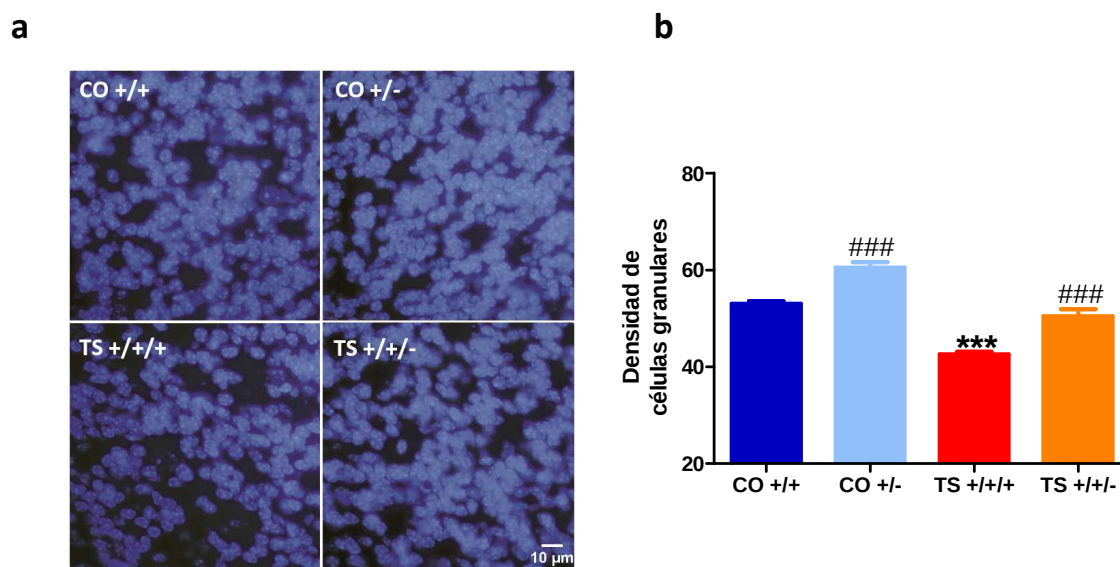
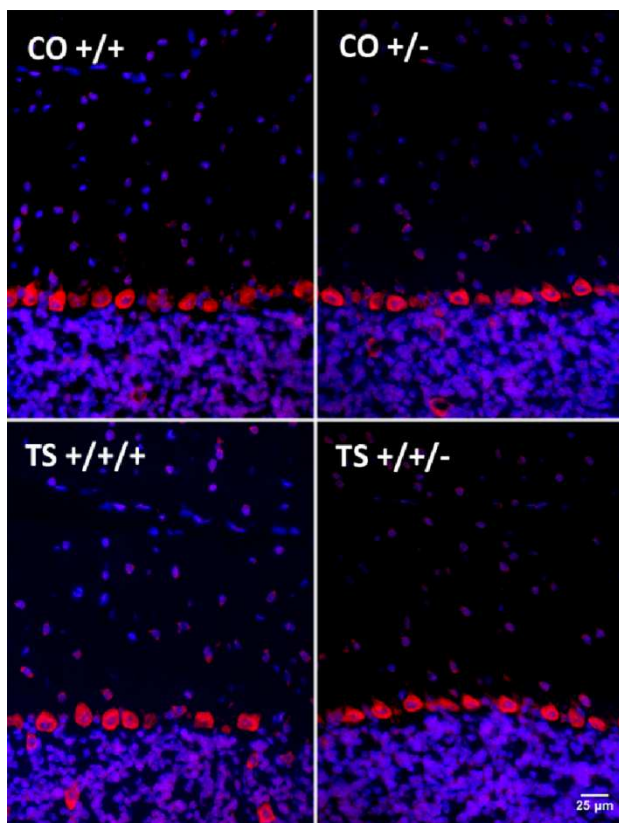


Figura 35. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* recuperó la densidad de células granulares en el ratón TS. Imágenes representativas de la capa de las células granulares teñidas DAPI. La barra de escala corresponde a 10 µm (a). Medias ± E.E.M. de la densidad de neuronas granulares estimada para cada genotipo (b). ***: $p<0.001$, TS +/+ vs. CO +/+; ###: $p<0.001$, CO +/+ vs. CO +/- y TS +/+ vs. TS +/-/. Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

9.3 Densidad de las células de Purkinje

El ratón TS +/+ presentó una densidad lineal de células de Purkinje reducida (figura 36, MANOVA 'Trisomía': $F_{(1,28)}=2.982$, $p=0.096$). Este déficit desapareció completamente tras la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A*. Por su parte, el silenciamiento de una copia del gen en los ratones CO +/- no modificó la densidad celular de este tipo neuronal (ANOVA 'Dyrk1A': $F_{(1,28)}=3.895$, $p=0.059$; 'Trisomía x Dyrk1A': $F_{(1,28)}=4.511$, $p=0.043$). Este resultado sugiere que las células de Purkinje no fueron compensadas respecto al reducido tamaño del animal, al contrario de lo que quizá ocurría con las células granulares.

a



b

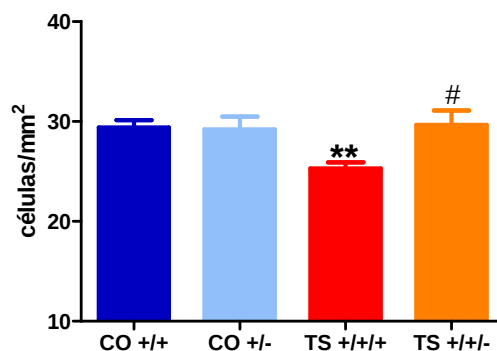


Figura 36. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* recuperó la densidad de células de Purkinje en el cerebelo del ratón TS. Imágenes representativas de la línea de las células de Purkinje teñida con IP y DAPI (a) y medias $\pm$ E.E.M. de la densidad estimada para cada genotipo (b). **: $p < 0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativos.

10. Influencia de *Dyrk1A* en el proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento

Como se comentó anteriormente, uno de los rasgos característicos del SD y el ratón TS es la aparición temprana de una neuropatología similar a la encontrada en la enfermedad de Alzheimer. Puesto que la vinculación de *Dyrk1A* a esta patología ha sido demostrada en numerosos trabajos, se estudió el efecto de la modificación de la dosis de *Dyrk1A* en la aparición y progresión de diversas alteraciones neurodegenerativas en el ratón TS.

10.1 *Dyrk1A* y la degeneración de los núcleos colinérgicos del prosencéfalo basal

En la primera fase del estudio se realizó el análisis estereológico del volumen de los núcleos basales en los distintos genotipos a los de 6 meses de edad, momento en el que comienzan a originarse las alteraciones patológicas en esta región. A pesar de que el grupo CO +/- presentaba una reducción del tamaño de estos núcleos, no se

encontraron diferencias significativas en esta variable entre ratones CO +/+ y TS con dosis normal o triplicada de *Dyrk1A* (MANOVA 'Trisomía' $F_{(1,20)}=3.45$, $p=0.077$; 'Dyrk1A' $F_{(1,20)}=5.20$, $p=0.033$; 'Trisomía x Dyrk1A' $F_{(1,20)}=3.67$, $p=0.069$; figura 37 a).

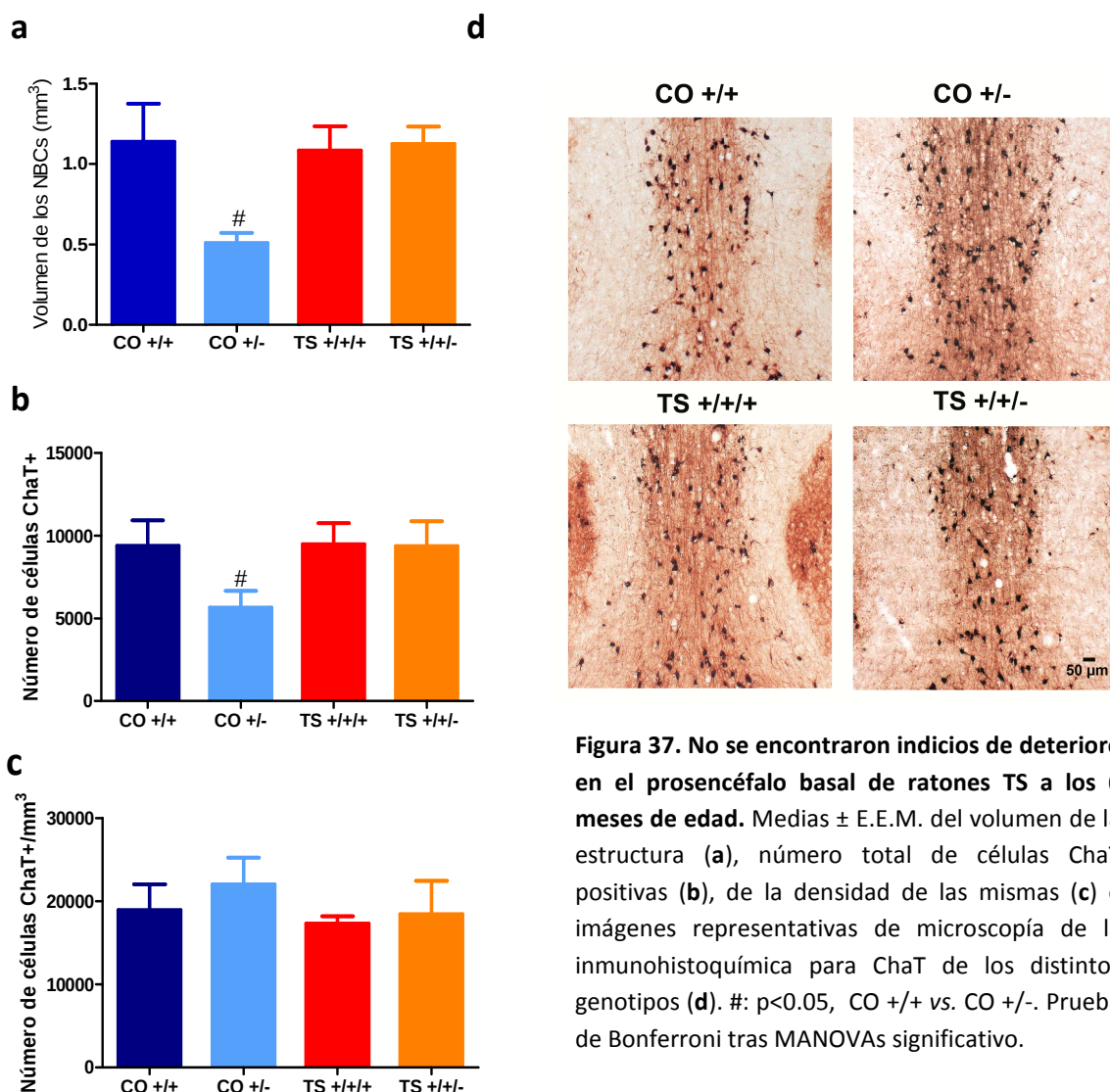


Figura 37. No se encontraron indicios de deterioro en el prosencéfalo basal de ratones TS a los 6 meses de edad. Medias $\pm$ E.E.M. del volumen de la estructura (a), número total de células ChaT positivas (b), de la densidad de las mismas (c) e imágenes representativas de microscopía de la inmunohistoquímica para ChaT de los distintos genotipos (d). #: $p<0.05$, CO +/+ vs. CO +/- . Prueba de Bonferroni tras MANOVAs significativo.

A continuación se determinó la degeneración de las neuronas colinérgicas estimando el número total y la densidad de neuronas ChaT positivas. De manera consistente con los datos hallados para el volumen de los núcleos del prosencéfalo basal, los cerebros de ratones CO +/- presentaron un menor número de neuronas ChaT positivas que los ratones CO +/+ (figura 37 b, tabla 23). Sin embargo, este menor número de células era probablemente debido al menor tamaño de esta estructura, ya que al evaluar la densidad de este tipo de neuronas por unidad de volumen no se encontraron diferencias significativas entre los valores de los ratones CO +/+ y CO +/- (figura 37 b, c

y d, tabla 23). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el número o la densidad de células ChaT positivas entre ratones CO +/+ y TS +/+ o TS +/-, descartándose por ello indicios de la degeneración de sus BFCNs a esta edad.

Tabla 23. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) del número y densidad de células ChaT positivas en el prosencéfalo basal.

	MANOVAs $F_{(1,20)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
Células totales ChaT+	0.535, p=0.473	0.298, p=0.746	0.054, p=0.819
Densidad de células ChaT+	2.662, p=0.118	1.498, p=0.248	2.462, p=0.132

10.2 Estudio del efecto de *Dyrk1A* sobre la expresión de App

Numerosos estudios han demostrado el papel regulador de *Dyrk1A* sobre el procesamiento de la proteína APP y su escisión en péptidos amiloides. Por ello, a continuación se valoró el efecto de la manipulación de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre los niveles de expresión de la proteína App en el hipocampo y el cerebelo de los animales.

Cuando se evaluó la acumulación de App a los 13 meses de edad en el hipocampo, se encontró un aumento significativo de su expresión ($\approx 25\%$ más) en el ratón TS +/+ respecto a la del CO +/+ ($p < 0.001$, figura 38 a y b, tabla 24). Sin embargo, al normalizar la dosis génica de *Dyrk1A* se redujeron los niveles de expresión de la proteína App en el hipocampo del ratón TS +/- . Además, reducir a un único alelo funcional la dosis del gen en los ratones CO +/- produjo una reducción ($\approx 20\%$ menos) en la expresión de App ($p < 0.001$, figura 38, tabla 24). En el cerebelo (figura 38 c y d, tabla 24) se encontró que el acúmulo de App fue menor que en el hipocampo en todos los genotipos y que, aunque sin alcanzar relevancia estadística por la variabilidad intragrupal, el depósito de la proteína en los diferentes grupos experimentales siguió el mismo patrón que el encontrado en el hipocampo. Es decir, los animales CO +/- presentaron un nivel de expresión de App menor que el de los CO +/+ ($\approx 20\%$ menos), y el grupo TS +/+ presentó una tendencia a incrementar los niveles de expresión de esta proteína ($\approx 15\%$ más). Sin embargo, esta tendencia desapareció en el grupo TS +/- ya que sus valores fueron prácticamente idénticos a los del grupo CO +/+.

Tabla 24. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) de los niveles de expresión de la proteína App en hipocampo y cerebelo.

	MANOVAs $F_{(1,21)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
<i>App</i> en hipocampo	29.913, $p<0.001$	17.352, $p<0.001$	0.029, $p=0.865$
<i>App</i> en cerebelo	7.230, $p=0.014$	5.513, $p=0.029$	0.090, $p=0.767$

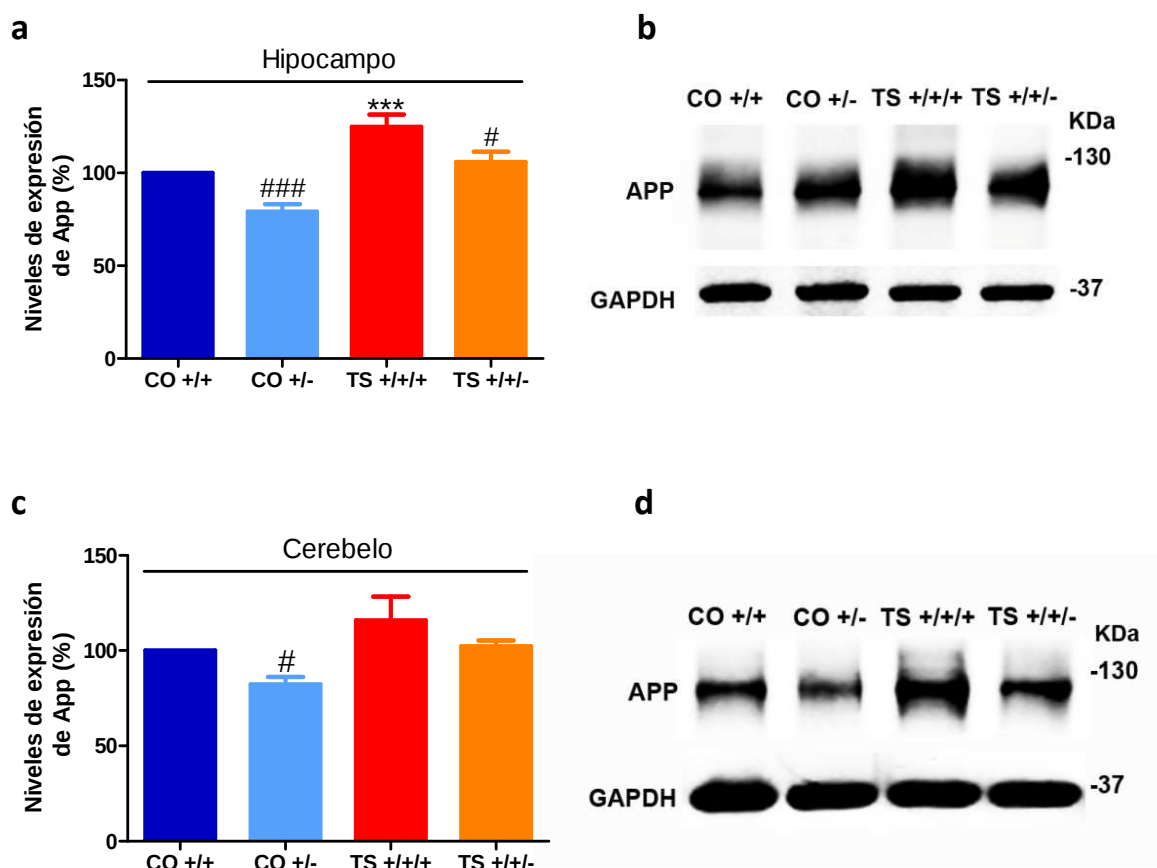


Figura 38. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* redujo los niveles de App en el ratón TS. Histograma con los niveles de la proteína en los distintos genotipos en hipocampo (a) y cerebelo (c) expresados como el porcentaje de cambio relativo respecto al ratón euploide (definido como el 100%) e imágenes representativas del análisis con Western blot en el hipocampo (b) y cerebelo (d) de los cuatro grupos de animales. La inmunodetección de GAPDH se usó como control de carga. Aparece indicada la posición del marcador proteico a la derecha (en kDa). ***: $p<0.001$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p<0.05$, ###: $p<0.001$, CO +/+ vs. CO +/- y TS +/+ vs. TS +/-/. Prueba de Bonferroni realizada tras MANOVAs significativos.

10.3 Papel de Dyrk1A en la acumulación del péptido amiloide A β 42

Con el fin de profundizar en la contribución de Dyrk1A en la síntesis excesiva de péptidos neurotóxicos, cuya acumulación promueve la formación de placas seniles en el SD y en la EA, se evaluaron los niveles del péptido A β 42 en la corteza, el hipocampo y el cerebelo en los distintos grupos experimentales.

Como se observa en la figura 39, se encontró un incremento en los niveles del péptido A β 42 en los animales TS +/+ respecto a los CO +/+ tanto en su corteza como en el hipocampo ($p=0.001$ y $p=0.036$ respectivamente). Sin embargo, en el cerebelo no se encontró ninguna alteración en su concentración ($p=0.420$). Al reducir la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS +/- se normalizaron los valores de A β 42 en la corteza ($p=0.05$). En el hipocampo se produjo una mejoría parcial que no alcanzó la significación estadística al ser comparados con los animales con triple copia de *Dyrk1A* ($p=0.104$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en esta estructura entre los niveles presentados por el grupo TS +/- y los del grupo CO +/+ ($p=0.428$). En los animales TS +/- tampoco se encontraron variaciones en la concentración del péptido en el cerebelo. Por último, los animales CO +/- no mostraron variaciones respecto al grupo CO +/+ en la corteza ($p=0.791$), en el hipocampo ($p=0.169$) o en el cerebelo ($p=0.632$). La tabla 25 muestra el análisis estadístico realizado en este experimento.

Tabla 25. Valores F y p del MANOVA (Trisomía x *Dyrk1A*) de los niveles del péptido A β 42 en corteza, hipocampo y cerebelo.

	MANOVAs $F_{(1,21)}$		
	Trisomía	<i>Dyrk1A</i>	Trisomía x <i>Dyrk1A</i>
A β 42 en corteza	17.739, $p=0.001$	2.155, $p=0.160$	3.434, $p=0.081$
A β 42 en hipocampo	1.596, $p=0.222$	0.047, $p=0.831$	4.432, $p=0.048$
A β 42 en cerebelo	0.683, $p=0.420$	0.132, $p=0.721$	0.743, $p=0.401$

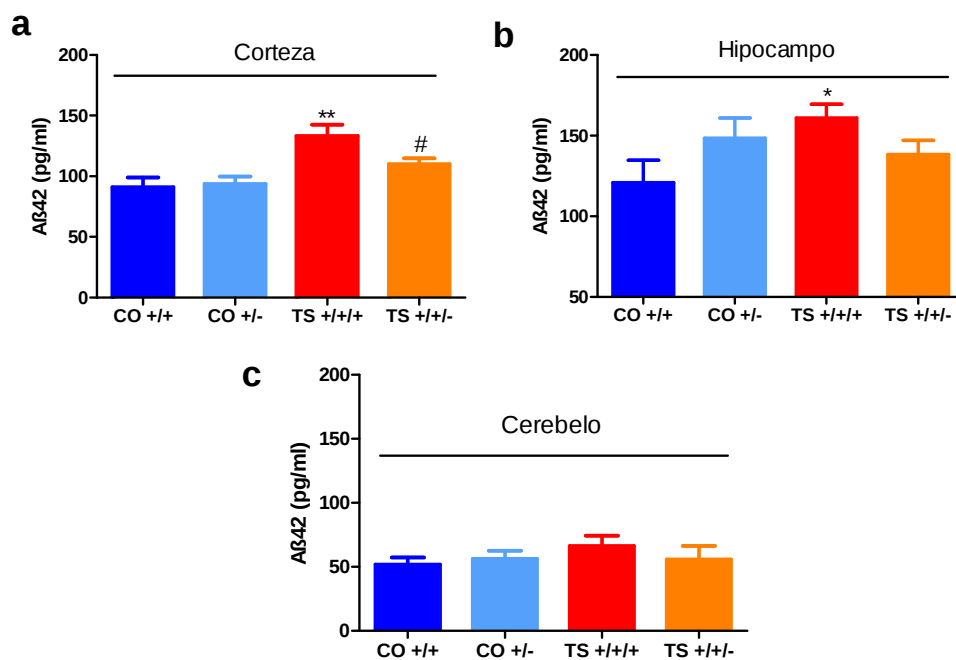


Figura 39. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* redujo los niveles de Aβ42 en el ratón TS. Medias ± E.E.M. de los niveles de Aβ42 en corteza (a), hipocampo (b) y cerebelo (c) en los distintos grupos experimentales. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, TS +/+ vs. CO +/+; #: $p < 0.05$, TS +/+ vs. TS +/- . Prueba de Bonferroni realizada después de MANOVAs significativos.

Para finalizar, la tabla 26 resume los resultados conductuales, electrofisiológicos, neuromorfológicos y moleculares estudiados en esta tesis.

Tabla 26. Resumen de los efectos de la dosis del gen *Dyrk1A*.

	TS +/+ vs. euploides	TS +/-	CO +/- vs. euploides
Expresión de la proteína Dyrk1A			
<i>Hipocampo</i>	↑↑ (Incrementado)	= (Normalizado vs. euploides)	↓↓ (Disminuido)
<i>Cerebelo</i>	↑↑ (Incrementado)	= (Normalizado vs. euploides)	↓↓ (Disminuido)
Viabilidad	↓↓ (Reducida)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	↓↓ (Disminuido)
Peso corporal	↓↓ (Reducido)	↓↓ (Reducido)	↓↓ (Disminuido)
Pruebas conductuales			
CFC			
<i>Condicionamiento auditivo</i>	↓↓ (Alterado)	↓↓ (Alterado vs. euploides)	= (Sin cambios)
<i>Condicionamiento contextual</i>	↓↓ (Alterado)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	↓ (Disminuido) (?) (n.s.)
Laberinto acuático de Morris			
<i>Memoria de referencia</i>	↓↓ (Alterado)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	= (Inalterado)
<i>Memoria de trabajo</i>	↓↓ (Alterado)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	= (Inalterado)
<i>Eficiencia de aprendizaje</i>	↓↓ (Alterado)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	= (Inalterado)
<i>Tigotaxis</i>	↑↑ (Alterada)	↓ (Reducida vs. TS +/+)	= (Inalterado)
<i>Velocidad de natación</i>	= (Sin cambios)	= (Sin cambios)	↓ (Disminuida)
<i>Aprendizaje guiado</i>	= (Sin cambios)	= (Sin cambios)	= (Sin cambios)
Tabla de agujeros			
<i>Índice ABA</i>	= (Inalterado)	= (Inalterado)	= (Inalterado)
Campo abierto			
<i>Hiperactividad</i>	↑↑ (Incrementado)	↑ (Incrementado vs. euploides)	↑ (Incrementado vs. euploides) (periferia)
<i>Ansiedad</i>	= (Inalterado)	= (Inalterado)	= (Inalterado)
Laberinto en cruz			
<i>Hiperactividad</i>	↑↑ (Incrementado)	↑↑ (Incrementado vs. euploides)	↑ (Incrementado)
<i>Ansiedad</i>	= (Inalterado)	= (Inalterado)	= (Inalterado)
Actividad espontánea			
<i>Oscuridad</i>	= (Inalterado)	↓ (Disminuida vs. TS +/+)	↓ (Disminuida vs. euploides)
<i>Luz</i>	↑ (Incrementado)	↓ (Disminuida vs. TS +/+)	= (Sin cambios)
Función motora			
<i>Batería pruebas motoras</i>	Mayormente Inalterado	Mayormente Inalterado	↓ (Disminuida) (n.s.)
<i>Prueba de rotarod</i>	= (Inalterado)	↑ (Aumentado vs. euploides)	↑ (Aumentado vs. euploides)

Tabla 26 (continuación).

	TS +/+ vs. euploides	TS +/-	CO +/- vs. euploides
LTP hipocampal	↓↓ (Alterado)	= (Rescatado vs. euploides)	↓ (Disminuida)
Morfología e histología hipocampal			
<i>Volumen DG</i>	↓↓ (Reducido)	↓↓ (Reducido vs. euploides)	↓↓ (Reducido)
<i>Área SGZ</i>	↓↓ (Reducido)	↓↓ (Reducido vs. euploides)	↓↓ (Reducido)
<i>Proliferación (Ki67)</i>	↓↓ (Alterado)	= (Rescatado vs. euploides)	↓↓ (Reducido)
<i>Diferenciación (DCX y CLR)</i>	↓↓ (Alterado)	= (Rescatado vs. euploides)	↓ (Reducido) (?) (n.s.)
<i>Nº total células DG (DAPI)</i>	↓↓ (Alterado)	↓↓ (Alterado vs. euploides)	↓↓ (Reducido)
<i>GAD65/67</i>	↑↑ (Incrementado)	= (Rescatado vs. euploides)	↑↑ (Aumentado vs. euploides)
<i>VGLUT</i>	↓↓ (Disminuido)	= (Rescatado vs. euploides)	= (Inalterado)
<i>Balance excitador/inhibidor</i>	↓ (Alterado)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	↓ (Alterado)
Morfología e histología cerebelar			
<i>Área del vermis</i>	↓↓ (Reducido)	= (Rescatado vs. euploides)	↓↓ (Reducido)
<i>Grosor ML</i>	↓↓ (Reducido)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	↓↓ (Reducido)
<i>Grosor GL</i>	↓↓ (Reducido)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	↓↓ (Reducido)
<i>Densidad neuronas granulares</i>	↓↓ (Reducido)	= (Rescatado vs. euploides)	↑↑ (Aumentado)
<i>Densidad células de Purkinje</i>	↓↓ (Reducido)	= (Rescatado vs. euploides)	= (Inalterado)
Envejecimiento			
<i>Degeneración BFCNs</i>	= (Inalterado)	= (Inalterado)	↓↓ (Reducido)
Expresión de la proteína App			
<i>Hipocampo</i>	↑↑ (Incrementado)	= (Normalizado vs. euploides)	↓↓ (Reducido)
<i>Cerebelo</i>	↑ (Incrementado)	= (Normalizado vs. euploides)	↓ (Reducido)
Acumulación de Aβ42			
<i>Corteza</i>	↑↑ (Incrementado)	= (Rescatado vs. euploides)	= (Inalterado)
<i>Hipocampo</i>	↑↑ (Incrementado)	↑ (Mejorado vs. TS +/+)	↑ (Incrementado)
<i>Cerebelo</i>	= (Inalterado)	= (Inalterado)	= (Inalterado)

Discusión

Numerosas evidencias han implicado la sobreexpresión del gen *Dyrk1A* en distintas alteraciones fenotípicas encontradas en el SD. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan el papel de este gen en dichos fenotipos y aportan nuevas evidencias, no descritas hasta ahora, sobre su implicación en otras alteraciones encontradas en el SD. El abordaje desarrollado en esta tesis supone un enfoque renovador dado que, por primer vez, el estudio de *Dyrk1A* se ha realizado en un modelo animal trisómico cuya dosis del gen ha sido normalizada. En consecuencia, se puede evaluar de forma más directa la contribución de *Dyrk1A* en los principales fenotipos alterados en el ratón TS, así como determinar las consecuencias directas que podría tener el rescate terapéutico, tanto a nivel farmacológico como genético, de este gen.

1. Papel de *Dyrk1A* en la cognición

Teniendo en cuenta los déficits que presenta el ratón TS en los procesos de aprendizaje y memoria y las numerosas evidencias que implican al gen *Dyrk1A* en ellos, el primer objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre las alteraciones cognitivas encontradas en este modelo murino de SD.

De forma consistente con numerosos estudios (Escorihuela *et al.*, 1995; Martínez-Cué *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2012), los animales TS +/+ mostraron un gran deterioro en su memoria de trabajo y de referencia espacial, ambas evaluadas en la prueba del laberinto acuático de Morris. La normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* supuso la recuperación parcial de los déficits cognitivos del ratón TS, aunque no tuvo el mismo efecto en todos los procesos de aprendizaje y memoria. En concreto, los ratones TS +/- mostraron una mejoría en su memoria de trabajo, de referencia y procedimental. La recuperación de todos estos procesos está íntimamente relacionada con la mejoría observada en la capacidad de estos animales de desarrollar estrategias de búsqueda de la plataforma, lo que sugiere el rescate de otras destrezas como la flexibilidad cognitiva y la función ejecutiva. Sin embargo, tanto en el caso de la memoria de referencia como de la memoria procedimental la mejoría fue parcial, ya que en las últimas sesiones del experimento estos animales no difirieron de los TS con triple dosis del gen *Dyrk1A*.

La mejoría encontrada en el aprendizaje y la memoria de los ratones TS +/- parece no ser debida a cambios en la función motora ya que no se encontraron alteraciones en la velocidad de natación de los ratones TS +/- ni en su ejecución durante las sesiones de aprendizaje guiado en el laberinto acuático de Morris.

El hecho de que el efecto de la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* mejorara solo parcialmente la memoria de referencia podría ser debido a que el rescate de las alteraciones neuromorfológicas en el hipocampo de este ratón tampoco fue completa (ver apartado 6 de la Discusión), ya que esta estructura está implicada en este tipo de aprendizaje y memoria (Eichenbaum, 2001). Dado que el hipocampo está implicado en el procesamiento y transferencia de los recuerdos de la memoria a corto plazo a la memoria a largo plazo (Ward, 2009) si no se normaliza totalmente su anatomía la función de consolidación podría verse afectada.

Además, cabría la posibilidad de que la normalización de la dosis de *Dyrk1A* en el ratón TS +/- no suponga la recuperación de todas las bases neuroanatómicas de la memoria y el aprendizaje alteradas en el ratón TS +/+, lo que también comprometería los procesos de integración, procesamiento, transferencia o recuperación de la información. El gen *Dyrk1A* tiene efectos específicos en cada región cerebral. Durante la etapa adulta la expresión de *Dyrk1A* no es uniforme en todo el encéfalo, localizándose mayoritariamente en algunas áreas, lo que sugiere que la proteína podría tener funciones fisiológicas distintas en diferentes regiones (Marti *et al.*, 2003). Asimismo, en modelos animales que sobreexpresan *Dyrk1A* o sólo tienen una única copia funcional del gen se han encontrado alteraciones no homogéneas en distintas estructuras cerebrales (Fotaki *et al.*, 2002; Guedj *et al.*, 2012). La corteza parietal, prefrontal o el tálamo son estructuras ligadas a los procesos cognitivos estudiados (Vicens y Carrasco, 2003). En esta tesis no se ha evaluado la morfología de estas regiones por lo que no se puede determinar si la recuperación parcial de ciertos procesos cognitivos es también en parte debida a la falta de cambios morfológico-funcionales en ellas.

Por otro lado, el cerebelo ha sido relacionado con funciones cognitivas superiores tales como la flexibilidad cognitiva (Schmahmann, 2004; Teipel *et al.*, 2004). La recuperación neuromorfológica observada en esta estructura (ver apartado 8 de la presente

Discusión) podría explicar la mejoría encontrada en el aprendizaje y la memoria de procedimiento así como en la mayor eficacia del aprendizaje encontrada en los ratones TS +/+/-.

También debe tenerse en cuenta que son muchos los genes alterados en el SD y en el ratón TS, aunque algunos tengan más relevancia funcional que otros. A su vez, todos estos genes interactúan entre sí y con el fondo genético de los individuos, por lo que no resulta sorprendente que el hecho de normalizar un único gen no suponga el rescate fenotípico total de todas las funciones cognitivas evaluadas. Un ejemplo son los genes *Olig1* y *Olig2* que, al igual que *Dyrk1A*, están situados en el HSA21 e implicados en el desarrollo y la funcionalidad del SNC (Chakrabarti *et al.*, 2010).

En la prueba del condicionamiento del miedo, en la que se evalúa el aprendizaje y la memoria de asociación de un contexto y de un sonido a un estímulo aversivo, los ratones TS +/+ mostraron un déficit en ambos procesos cognitivos, de manera consistente con numerosos estudios (Bianchi *et al.*, 2010b; Kleschevnikov *et al.*, 2012a; Salehi *et al.*, 2009). La normalización del número de copias de *Dyrk1A* en el ratón TS no rescató el aprendizaje asociativo auditivo, pero sí mejoró parcialmente la alteración en el condicionamiento contextual.

La amígdala participa en la asociación entre situaciones y estímulos aversivos, especialmente el miedo, contribuyendo en la codificación de los recuerdos (McGaugh, 2004). Mientras que el condicionamiento auditivo depende principalmente de una apropiada función de la amígdala (Campeau y Davis, 1995; Goosens y Maren, 2001), en la asociación de un estímulo aversivo con un contexto el hipocampo desempeña un importante papel. La no recuperación del condicionamiento auditivo en el ratón TS +/+/- sugiere un funcionamiento inadecuado de la amígdala tras la normalización de la dosis de *Dyrk1A*, lo que también podría repercutir en el aprendizaje contextual participando en la recuperación parcial encontrada. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, también podría ser debido a que la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* no consiguió normalizar completamente las alteraciones neuromorfológicas del hipocampo encontradas en el ratón TS +/+/-, tal y como ocurría con aprendizajes dependientes del hipocampo en el laberinto acuático de Morris. Por otro lado, además del hipocampo, otras estructuras como las cortezas entorrinal y perirrinal también

parecen estar implicadas en el aprendizaje contextual (Anagnostaras *et al.*, 2001; Biedenkapp y Rudy, 2009).

Son varios los estudios que han relacionado la sobreexpresión de *Dyrk1A* con el fenotipo cognitivo de animales portadores de copias extra de este gen (Branchi *et al.*, 2004; Sebrrie *et al.*, 2008) o en los ratones con trisomías segmentarias (Rueda *et al.*, 2012). Sin embargo, en contraste con los resultados del presente trabajo, un estudio reciente (Altafaj *et al.*, 2013) reveló que la normalización del nivel de expresión de *Dyrk1A* exclusivamente en el hipocampo mediante la inyección de un vector viral que contiene shRNA (short hairpin RNA) inhibidor de *Dyrk1A* (AAV2/1-shDyrk1A) no mejoró la capacidad de aprendizaje de los ratones TS. A pesar de ello, esta intervención sí mejoró su estrategia de búsqueda durante la prueba del laberinto acuático. La discrepancia entre estos resultados y la mejoría parcial en la ejecución de los animales TS +/- en el presente trabajo probablemente se deba a diferencias en los tejidos en los que la expresión de *Dyrk1A* fue normalizada en cada uno de los estudios. Los componentes de la memoria de referencia y de trabajo y la consolidación a largo plazo del aprendizaje espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris no sólo dependen de la integridad del hipocampo o el cerebelo, sino también de la corteza prefrontal (Goldman-Rakic, 1999; Seamans *et al.*, 1995; Wang y Cai, 2006), que también está afectada en el SD (Goto *et al.*, 2010). Mientras que en el presente trabajo la normalización de *Dyrk1A* presumiblemente fue realizada en todos los tejidos que sobreexpresan *Dyrk1A*, incluyendo el cerebelo y la corteza prefrontal, Altafaj *et al.* (2013) inyectaron AAV2/1-shDyrk1A sólo en el hipocampo del ratón TS. Por lo tanto, resulta lógico que la normalización de *Dyrk1A* en los ratones TS +/- dé lugar a un aprendizaje más eficaz. Además, en los ratones TS +/- la reducción de la dosis génica se produjo desde la gestación, por lo que la manipulación ha podido tener efectos beneficiosos sobre alteraciones presentes durante el neurodesarrollo (p. ej. reducción de la neurogénesis pre-natal e hipocelularidad) sobre las que no tendrían efectos manipulaciones en individuos adultos como las realizadas en el estudio de Altafaj *et al.* (2013).

Otras evidencias que apoyan el papel de *Dyrk1A* en las alteraciones cognitivas encontradas en los modelos murinos de SD provienen de estudios que demuestran

que la inhibición farmacológica de la proteína que codifica este gen con galato de epigallocatequina (*Epigallocatechin Gallate*, EGCG) mejora el aprendizaje dependiente del hipocampo y la tigmotaxis en los modelos *TgDyrk1A* y TS (De la Torre *et al.*, 2014; Guedj *et al.*, 2009).

Por otro lado, en un ensayo clínico piloto con personas con SD se ha encontrado que la administración de EGCG aumenta su precisión en el reconocimiento visual y la memoria de trabajo espacial, sugiriendo un efecto positivo de este compuesto tanto en el hipocampo como en el sistema prefrontal (De la Torre *et al.*, 2014). De hecho, un reciente estudio ha demostrado que la sobreexpresión de *Dyrk1A* está implicada en las anomalías estructurales y funcionales de la corteza prefrontal del modelo mBACtg*Dyrk1A* (Thomazeau *et al.*, 2014). En conjunto, estas evidencias sugieren que el efecto *procognitivo* producido por la normalización del nivel de expresión *Dyrk1A* puede ser también debido a sus efectos sobre las redes funcionales hipocampo-prefrontales que soportan funciones relacionadas con la memoria, además de los efectos hipocampales o cerebelares descritos en el presente trabajo. En consecuencia, sería interesante profundizar el fenotipo anatómico de la corteza prefrontal de los animales TS +/-.

La reducción de la dosis génica de *Dyrk1A* a única copia funcional en el ratón CO +/- no afectó a su memoria de referencia, de trabajo, procedimental o a la eficacia de su patrón de búsqueda de la plataforma en la prueba del laberinto acuático de Morris. Estos resultados contrastan con estudios cognitivos previos, ya que Arqué *et al.* (2008) demostraron que los animales *Dyrk1A*^{+/-} presentan un deterioro en su aprendizaje espacial en el paradigma del laberinto acuático de Morris, incluyendo la memoria espacial y de procedimiento, así como en su capacidad de desarrollar estrategias de búsqueda. No obstante, estas alteraciones sólo fueron encontradas en las últimas sesiones de la prueba, no comprometiendo completamente el aprendizaje espacial de estos animales.

Las diferencias entre el citado estudio y los resultados de la presente tesis podrían ser debidas a diferencias en los protocolos utilizados para evaluar el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris. Mientras que en este estudio se realizaron 8 sesiones de adquisición cambiando la posición de la plataforma en cada una ellas, en el estudio de

Arqué *et al.* (2008) se evaluó el aprendizaje espacial a lo largo 4 sesiones sin cambiar la plataforma de lugar. A pesar de que el análisis realizado en el presente estudio maximiza el rendimiento cognitivo de los grupos y dificulta la tarea, ya que cada día los animales deben aprender una nueva localización de la plataforma, no se encontró ningún déficit cognitivo. Este hecho, junto con el déficit parcial hallado por Arqué *et al.* (2008), sugiere que quizá estén influyendo factores ajenos a la cognición en los ratones *Dyrk1A*^{+/-} y CO +/- en la ejecución del laberinto acuático de Morris.

En este sentido, el fondo genético de los animales tiene un papel fundamental sobre el comportamiento animal. Numerosos trabajos han descrito importantes diferencias en los patrones de conducta según la cepa de ratón (Bothe *et al.*, 2005; Voikar *et al.*, 2001). Por lo tanto, el impacto de la haploinsuficiencia de *Dyrk1A* en ambos estudios puede deberse parcialmente al diferente fondo genético que presentan los ratones *Dyrk1A*^{+/-} y CO +/- (ver Material y Métodos).

Además, la edad de los animales es un parámetro determinante a la hora de evaluar el efecto de un gen en las habilidades cognitivas ya que puede influir en el deterioro del sistema motor o en la aparición de procesos neurodegenerativos (Stasko y Costa, 2004). *Dyrk1A* participa en diversos procesos neurodegenerativos. Dado que el trabajo de Arqué *et al.* (2008) no especifica la edad de los animales, no es posible confirmar si este factor puede ser responsable de las discrepancias encontradas en los fenotipos cognitivos entre ambos estudios.

En la prueba de CFC los ratones CO +/- no presentaron ningún déficit en su memoria asociativa auditiva, de lo que se deduce un funcionamiento correcto de la amígdala. Sin embargo, mostraron una leve tendencia a recordar peor la asociación entre el contexto al estímulo aversivo. A pesar de que tanto la prueba del laberinto acuático de Morris como el CFC miden aprendizaje contextual (por tanto, dependiente del hipocampo principalmente), no debe obviarse que son tareas diferentes en las que intervienen estructuras anatómicas y redes funcionales distintas.

2. Papel de *Dyrk1A* en la actividad exploratoria y la capacidad de atención

Dado que la capacidad de atención y la actividad exploratoria son algunos de los procesos subyacentes a los procesos de aprendizaje y memoria, se sometió a los

distintos grupos de ratones a la prueba de la tabla de agujeros para evaluar parámetros relacionados con estas capacidades. Driscoll *et al.* (2004) demostraron que los ratones TS de edad avanzada (de 15 a 17 meses de edad) presentaban un marcado déficit de atención que podría tener un importante papel en los déficits de aprendizaje encontrados en estos animales. Sin embargo, en el presente estudio ningún genotipo mostró déficits en su nivel de actividad exploratoria en la tabla de agujeros a los 6 meses de edad, aunque sí en otras pruebas (ver secciones 3 y 5 del apartado Resultados). Por otro lado, en esta prueba los animales TS no mostraron diferencias de atención con respecto a los euploides. Este hecho podría indicar que las diferencias en los distintos fenotipos cognitivos hallados en este estudio no están relacionadas con el deterioro de la atención. Sin embargo, en otras situaciones experimentales (ver sección 5 del apartado Resultados), los animales TS mostraron una marcada hiperactividad, que también se relaciona con una menor atención. Por tanto, es posible que la tabla de agujeros no sea un método suficientemente sensible para determinar la capacidad de atención de estos animales.

En el caso del ratón CO +/- tampoco se encontraron evidencias concluyentes de alteraciones en su atención respecto al resto de los grupos de animales en la tabla de agujeros. A pesar de que estos animales exploraban más los agujeros con objetos, su índice ABA fue similar al del resto de los grupos. Sin embargo, la mayor actividad encontrada en este grupo de animales en otras pruebas sugiere, una vez más, que esta prueba no es suficientemente sensible para detectar cambios en la capacidad de atención de los distintos grupos de animales.

3. Papel de *Dyrk1A* en la actividad general y la ansiedad

Estudios previos demuestran que el ratón TS es hiperactivo bajo distintas condiciones experimentales (Coussons-Read y Crnic, 1996; Escorihuela *et al.*, 1995). Además, también se muestra hiperactivo en situaciones que habitualmente provocan cautela y supresión de la actividad en ratones normales (como es el caso del campo abierto o el laberinto en cruz) (Coussons-Read y Crnic, 1996; Escorihuela *et al.*, 1995; Martínez-Cue *et al.*, 2006), lo que parece deberse a una reducción de la atención hacia estímulos potencialmente peligrosos (Crnic y Pennington, 2000).

De manera consistente con estos estudios, en el presente trabajo los animales TS +/+ también se mostraron hiperactivos tanto en las pruebas del campo abierto y del laberinto en cruz. Sin embargo, la normalización del nivel de expresión de *Dyrk1A* no rescató este fenotipo en ninguna de las dos pruebas.

La hiperactividad del ratón TS +/+ también pudo observarse al medir su actividad espontánea en su jaula habitual durante el ciclo de luz, aunque durante del periodo de oscuridad no se encontraron diferencias respecto a los animales euploides. En este caso la normalización de la dosis de *Dyrk1A* en los animales TS +/- sí produjo la normalización de este fenotipo durante la fase luminosa del ciclo luz/oscuridad. Además, estos animales también se mostraron hipoactivos durante la fase oscura.

En contraste con estos resultados, Ortiz-Abalia *et al.*, (2008) demostraron que la normalización del nivel de expresión *Dyrk1A* en el cuerpo estriado mediada por la inyección de un tipo de virus adenoasociado del serotipo 2 con iRNA inhibidor de *Dyrk1A* (AAVshDyrk1A) rescató los déficits motores y atenuó la hiperactividad encontrada en los ratones *TgDyrk1A*. En el presente estudio, la falta de efecto sobre la hiperactividad tras reducir el nivel de expresión de *Dyrk1A* de los animales trisómicos podría indicar que otros genes pueden jugar un papel en esta alteración fenotípica, ya que en los animales TS +/- hay más de 150 genes que permanecen en trisomía. De ellos, aproximadamente 92 son ortólogos a los encontrados en el HSA21 pero los otros 60 no presentan homología con este cromosoma.

Respecto a la reducción de la dosis de *Dyrk1A* en ratones CO +/-, varios estudios han demostrado que esta manipulación genética conduce a un fenotipo hipoactivo bajo condiciones aversivas (Fotaki *et al.*, 2002; Fotaki *et al.*, 2004). En el presente trabajo se encontró un comportamiento hiperactivo en el campo abierto (mayor distancia recorrida en la periferia del aparato) y en laberinto en cruz (mayor velocidad y distancia recorrida durante la prueba). Sin embargo, cuando en la prueba de actimetría se evaluó su actividad espontánea durante la fase de oscuridad, los ratones CO +/- se mostraron hipoactivos. Se podría hipotetizar que estos animales son hipoactivos en condiciones normales, o lo que es lo mismo, que *Dyrk1A* juega un papel sobre la actividad espontanea en su jaula habitual pero la aumenta en situaciones novedosas o aversivas. Las diferencias encontradas entre los distintos estudios pueden deberse, de

nuevo, a variaciones en el fondo genético de los animales o a diferencias en los protocolos empleados, ya que la evaluación de los individuos en el campo abierto no se realizó durante la misma fase del ciclo luz-oscuridad o con el mismo nivel de aversión.

Ningún grupo se reveló ansioso durante las pruebas del campo abierto y del laberinto en cruz, lo que sugiere que no han intervenido factores emocionales en la ejecución de las pruebas cognitivo-conductuales. Tanto en el campo abierto como en el laberinto en cruz existe un conflicto entre la tendencia a explorar nuevos ambientes y la aversión natural de los ratones a los espacios abiertos (Treit *et al.*, 1993). Cuanto más ansioso es un animal, menos tiempo se aventura a explorar un espacio abierto; en consecuencia, pasa menos tiempo en el centro del aparato y realiza más conductas de evaluación de riesgo y alzamientos para intentar escapar del aparato.

En la prueba del campo abierto, los ratones TS +/+ y los TS +/- pasaron más tiempo en el centro del aparato que los CO ++ y los CO +/- . A pesar de que este dato podría indicar que son menos ansiosos, el hecho de que mostraran la misma tendencia en la periferia del aparato y en la distancia total recorrida apoya la hipótesis de que este efecto se debe a su fenotipo hiperactivo, probablemente debido a un déficit de atención. Además, ningún grupo difirió en el número de alzamientos efectuados durante la prueba, que son intentos de escape del aparato y, por tanto, otro índice de ansiedad. Como ya se comentó, la hiperactividad del ratón TS es probablemente debida a la menor atención a estímulos potencialmente peligrosos (Crnic y Pennington, 2000) que darían lugar a una mayor impulsividad (Demas *et al.*, 1996). En consecuencia, los animales TS +/+ y TS +/- tendrían menos capacidad para atender estímulos estresantes, explorando por ello más todas las zonas del aparato. Por otro lado, en la prueba del laberinto elevado en cruz ningún grupo experimental difirió en los componentes motores o cognitivos de la ansiedad (tiempo que transcurrieron en los brazos abiertos del aparato, tiempo de inmovilización inicial o número de conductas de evaluación de riesgo), lo que demuestra que no existieron cambios en ansiedad.

4. Papel de *Dyrk1A* en los reflejos sensoriales, las habilidades motoras y la coordinación locomotora

Cuando se realizó una batería de pruebas para evaluar varios reflejos y habilidades motoras en los distintos genotipos, no se encontraron diferencias entre los distintos grupos en la mayoría de las pruebas. Sin embargo, se observó que los ratones TS $+/+/+$ presentaban una mayor respuesta de sobresalto y una menor latencia de llegada al extremo en la prueba de la percha, lo que sugiere una mayor reactividad a estímulos auditivos y una peor coordinación motora por parte de estos ratones. Aunque la mayoría de los estudios muestran que las habilidades sensoriales y motoras en los animales TS de mediana edad permanecen intactos (Escorihuela *et al.*, 1995; Holtzman *et al.*, 1996; Hyde *et al.*, 2001; Rueda *et al.*, 2010), algunos trabajos han encontrado déficits que oscilan de leves a severos de los 4 a 7 meses de edad en estos animales (Costa *et al.*, 1999). Así mismo, varios trabajos señalan la relación entre el desequilibrio en la dosis del gen *Dyrk1A* y alteraciones en el fenotipo motor (Altafaj *et al.*, 2001; Fotaki *et al.*, 2004; Martínez de Lagran *et al.*, 2004; Ortiz-Abalia *et al.*, 2008).

Normalizar la dosis de *Dyrk1A* en el ratón TS $+/+/-$ no supuso ningún cambio en la mayoría habilidades sensorimotoras evaluadas, salvo por la normalización de la respuesta de sobresalto. Además, también se encontró que los animales TS $+/+/-$ presentaban un mayor equilibrio en la barra de madera.

Por otro lado, el ratón CO $+/-$ mostró alteraciones en la ejecución de algunas de las pruebas motoras evaluadas, como el equilibrio en la barra de aluminio, la capacidad de tracción y la latencia de caída en la prueba de la percha, lo que indica una leve disfunción motora. Estos resultados, aunque más leves, concuerdan con los hallados por Fotaki *et al.* (2002, 2004), quienes demostraron que el ratón *Dyrk1A* ^{$+/-$} presenta un retraso en el desarrollo de algunos reflejos, un deterioro en el desarrollo neuromotor y una profunda alteración de parámetros motores específicos en estadios adultos. Posteriormente, Arqué *et al.* (2009) demostraron que las alteraciones sensorimotoras de este ratón se ven agravadas por la edad. En este trabajo, los animales CO $+/-$ fueron evaluados con 5-6 meses de edad, por lo que no debe descartarse que su fenotipo motor también se vea deteriorado en mayor medida en edades más avanzadas.

Para evaluar la coordinación motora todos los grupos animales fueron sometidos a la prueba de rotarod. De forma consistente con los trabajos anteriores, en el presente estudio no se encontraron alteraciones en la coordinación motora en esta prueba en los ratones TS +/+ (Baxter *et al.*, 2000; Escorihuela *et al.*, 1995; Martínez-Cué *et al.*, 2013). Sin embargo, otros estudios sí han encontrado una coordinación motora deficiente en los animales TS respecto a los ratones euploides (Costa *et al.*, 1999).

Por otro lado, también existen resultados muy contradictorios en diferentes ratones transgénicos para *DYRK1A*. Aunque Souchet *et al.* (2014) encontraron un marcado déficit en la coordinación motora en ratones mBACtgDyrk1A, el modelo TgDyrk1A mostró un deterioro menor en el aprendizaje motor (Altafaj *et al.*, 2001). Además, otro modelo de sobreexpresión de *Dyrk1A* generado utilizando un BAC humano, el modelo hBACtgDYRK1A (Ahn *et al.*, 2006), no presenta déficits en la prueba de rotarod.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *Dyrk1A*, bien en ratones con trisomía segmentaria o en diferentes modelos transgénicos únicos, no tiene como resultado alteraciones motoras de forma uniforme. Las discrepancias entre todos los estudios son probablemente debidas a las diferencias en los protocolos experimentales utilizados. Por ejemplo, la dificultad de la tarea utilizada en el estudio de Costa *et al.* (1999) fue mayor que la empleada en el presente estudio. Además, en los diferentes ratones transgénicos para *DYRK1A*, los diferentes transgenes (humano o murino), promotores y/o fondos genéticos de los animales también podrían ser responsables de los resultados inconsistentes encontrados en la prueba de rotarod.

En este trabajo, la normalización del número de copias del gen *Dyrk1A* mejoró la ejecución en el ciclo de aceleración y a distintas velocidades constantes en los animales TS +/- y CO +/- respectivamente. Este hallazgo, que contradice los déficits motores encontrados en otros trabajos (Fotaki *et al.*, 2002, 2004), también podría ser debido a variaciones en los protocolos empleados en cada estudio.

En conjunto, las pruebas realizadas para evaluar el efecto de la dosis génica de *Dyrk1A* sobre el fenotipo motor han aportado resultados demasiado variables como para ofrecer una interpretación consistente. Así pues, para estudiar de manera exhaustiva el fenotipo motor de los distintos grupos experimentales sería necesario realizar

pruebas motoras más complejas. De hecho, en un trabajo reciente, Gutiérrez-Castellanos *et al.*, (2013b) encontraron déficits en el aprendizaje motor del ratón TS, a pesar de que tampoco encontraron alteraciones en las habilidades sensorimotoras o signos de ataxia. Para detectarlos, evaluaron los reflejos oculomotores de los animales y sus habilidades para adaptar y consolidar estas conductas en circunstancias nuevas (Gutierrez-Castellanos *et al.*, 2013a).

5. Papel de *Dyrk1A* en la plasticidad sináptica del hipocampo

El deterioro de la plasticidad sináptica es uno de los principales mecanismos responsables de los trastornos cognitivos encontrados en el ratón TS. De hecho, la LTP, uno de los sustratos de la neuroplasticidad, está alterada en el hipocampo y la corteza prefrontal de los ratones TS, de otros modelos murinos de SD y de ratones que sobreexpresan *Dyrk1A* (Ahn *et al.*, 2006; Bartesaghi *et al.*, 2011; Costa y Grybko, 2005; Thomazeau *et al.*, 2014). Estas evidencias sugieren la participación del gen *Dyrk1A* en los mecanismos implicados en la plasticidad sináptica.

En el presente trabajo los ratones TS +/+ mostraron un déficit en la LTP hipocampal similar al descrito en estudios previos (Costa y Grybko, 2005). Tras normalizar el número de copias de *Dyrk1A* en el ratón TS +/-, se rescató completamente la LTP del hipocampo del ratón TS, lo que confirma que la copia extra de *Dyrk1A* en este ratón desempeña un papel en la alteración de la plasticidad sináptica. De acuerdo con estos resultados, la inhibición farmacológica o genética, mediante la administración de EGCG o la inyección de AAV2/1-shDyrk1A respectivamente, también mejora la LTP del hipocampo en ratones TS (Altafaj *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2008). Por tanto, la normalización de la LTP en los animales TS +/- podría ser uno de los mecanismos por los que mejora el aprendizaje de estos animales en las distintas pruebas cognitivas realizadas en este trabajo.

Por otro lado, en este estudio, tras la reducción a una única copia funcional de *Dyrk1A*, los ratones CO +/- mostraron una disminución en la LTP del hipocampo. Al igual que ocurre con los animales TS, el exceso de inhibición hipocampal encontrada en los CO +/- podría ser una de las causas de la disminución de la eficacia sináptica hipocampal (LTP) en este grupo (ver sección 7 de esta discusión). Sin embargo, este hallazgo

contrasta con la falta de alteraciones cognitivas encontradas en el laberinto acuático de Morris en estos animales, aunque en la prueba de condicionamiento contextual sí que mostraron una tendencia no significativa a un mayor deterioro. Las discrepancias entre la ejecución en pruebas de aprendizaje espacial y la LTP podrían ser debidas a varios factores. En primer lugar, es posible que la interconexión entre todas las áreas encefálicas sea suficientemente eficiente a nivel global, mostrando una respuesta cognitiva normal a pesar de tener una menor capacidad de LTP. Es decir, que el SNC de los animales CO +/- no necesite una mayor capacidad de potenciación para funcionar correctamente. Además, no deben descartarse fenómenos de plasticidad funcional compensatoria (Lazzouni y Lepore, 2014). A pesar de la disfunción parcial que muestra la LTP hipocampal de estos animales, es posible que existan mecanismos compensatorios que den lugar finalmente un funcionamiento cognitivo normal. De hecho, en animales cuya dosis de *Dyrk1A* ha sido modificada, existen diferencias en la naturaleza del balance excitatorio-inhibitorio según se trate de la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Souchet *et al.*, 2014). Por tanto, el mayor rendimiento de otras áreas cerebrales implicadas en el aprendizaje, como el cerebelo o la corteza prefrontal, puede favorecer otras estrategias que compensen la disfunción hipocampal en la prueba del laberinto acuático de Morris. Por ejemplo, la LTD cerebelar podría estar implicada en la navegación espacial (Burguiere *et al.*, 2005). Si la haploinsuficiencia de *Dyrk1A* no produjera un deterioro funcional del cerebelo o corteza prefrontal de los ratones CO +/-, se podría explicar por qué no se encontraron alteraciones cognitivas en estos animales en el laberinto acuático.

6. Papel de *Dyrk1A* en el fenotipo morfológico hipocampal y la neurogénesis

La neurogénesis hipocampal adulta juega un importante papel en el establecimiento de la LTP y en el aprendizaje y la memoria dependiente del hipocampo (Imayoshi *et al.*, 2008; Shors *et al.*, 2001; Shors *et al.*, 2002). Uno de los mecanismos subyacentes a los déficits de aprendizaje y plasticidad sináptica encontrados en el ratón TS es la alteración de la neurogénesis hipocampal pre- y post-natal, que daría lugar a las alteraciones en la morfología hipocampal características de estos animales (Bianchi *et al.*, 2010b; Lorenzi y Reeves, 2006; Rueda *et al.*, 2005).

El proceso neurogénico incluye fenómenos de proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular, así como la integración final de las nuevas neuronas en los circuitos existentes. Como ya se expuso anteriormente, existen numerosas evidencias de la participación del gen *Dyrk1A* en todos ellos.

En el presente trabajo se encontró una disminución en el tamaño del DG y la SGZ en el hipocampo del ratón TS, además de un déficit en el número o la densidad de células proliferativas (Ki67+), de neuronas inmaduras (células DCX+ y CLR+) y del número total de células (DAPI+), presumiblemente células granulares, en el DG. La normalización de la dosis de *Dyrk1A* en el ratón TS recuperó totalmente la densidad y el número total de células en proliferación (Ki67+) y aumentó la densidad de neuronas inmaduras en diferentes estadios de diferenciación (DCX+ y CLR+). En el caso de la densidad y el número de neuronas inmaduras en estadios tempranos (células DCX+/CLR-) o de neuronas inmaduras en estadios más avanzados (CLR+), pudo observarse una clara tendencia a la mejoría de estos grupos celulares, aunque, en algunos casos, estos resultados no alcanzaron la significación estadística, probablemente debido a la amplia variabilidad intragrupal.

Son muchas las evidencias que apoyan la idea de que *Dyrk1A* interacciona y modula diversas vías de señalización (incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*, FGF), NGF, Sonic hedgehog (Shh), NFAT y Notch, entre otros) implicadas en distintas etapas de la proliferación y la diferenciación celular. En consecuencia, la normalización de la dosis del gen *Dyrk1A* podría contribuir en la restauración funcional de diferentes dianas moleculares implicadas en la neurogénesis adulta, teniendo como resultado su aumento en los animales TS +/-/. De manera consistente con los resultados expuestos, las estrategias farmacológicas (administración EGCG) o genéticas (inyección shRNA) dirigidas a inhibir *Dyrk1A* han demostrado suprimir los defectos en la proliferación y diferenciación en células madre pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs) derivadas de cerebros de personas con SD (Hibaoui *et al.*, 2014).

No obstante, también se han encontrado evidencias de que los genes *Olig1* y *Olig2* modulan también algunas de las vías vinculadas a la proteína *Dyrk1A* (incluyendo FGF,

Notch y Shh) (Schebesta y Serluca, 2009; Tiso *et al.*, 2009). Así, la interacción de estos genes, cuya dosis no ha sido normalizada en el presente estudio, con distintas dianas moleculares puede desencadenar varios fenotipos alterados en el ratón TS que no serán recuperados en los animales TS +/+/- . Tal es el caso del número de neuronas inmaduras o número total de células en el DG.

En los animales CO +/- la haploinsuficiencia de *Dyrk1A* condujo a una acusada reducción del número total de células proliferativas y de neuronas inmaduras en estadios tempranos, aunque su densidad cerebral no se vio afectada. Es decir, aunque el número total de estas poblaciones celulares fue deficitario en la SGZ, debido al déficit en el tamaño de esta zona, la proporción de progenitores y de neuroblastos en diferenciación resultó normal.

En el presente trabajo reducir la dosis de *Dyrk1A* en los animales TS +/+/- no recuperó los déficits en el número o la densidad celular en la capa granular del DG. Esto sugiere que aunque hay una correcta proliferación celular en los animales TS +/+/- , las neuronas generadas no sobreviven para integrarse de forma permanente en los circuitos funcionales. En contraste con estos resultados, un reciente estudio ha demostrado que *DYRK1A* promueve la supervivencia celular en cultivos celulares (Guo *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que *Dyrk1A* tiene un efecto anti-apoptótico, mejorando la supervivencia *in vitro* e *in vivo* en algunos tejidos como la sustancia negra o la retina (Barallobre *et al.*, 2014; Laguna *et al.*, 2008; Laguna *et al.*, 2013). Por tanto, parece que para una correcta supervivencia celular es necesario un nivel de actividad normal de *DYRK1A*, concretamente ante situaciones fisiológicas que activen vías intrínsecas de muerte celular vinculadas a la caspasa 9. Sin embargo, la reducida celularidad encontrada en diferentes áreas del cerebro adulto TS no parece deberse a cambios en apoptosis (Rueda *et al.*, 2011, 2013), por lo que el déficit en el número y densidad de células hallado en el hipocampo de los ratones TS +/+/- tampoco tendría por qué estar relacionado con mecanismos de muerte celular. Por otro lado, a pesar de la normalización del nivel de expresión de *Dyrk1A*, la trisomía de otros genes en los animales TS podría estar afectando su supervivencia celular en el hipocampo.

En los animales CO +/- la densidad de células granulares fue completamente normal, pero, al igual que ocurría en otros estadios celulares, su número total se encontraba

disminuido. Guedj *et al.* (2012) demostraron que en la capa polimórfica del DG existe una correlación negativa entre el número de copias de *Dyrk1A* y la densidad celular.

Así, los animales haploinsuficientes *Dyrk1A*^{+/-} mostraron una densidad celular mayor que los ratones euploides. Las diferencias entre ambos estudios pueden deberse a las regiones del DG dónde fueron realizados los contejes celulares. Mientras en el presente trabajo el recuento se efectuó en la capa granular del DG, constituido fundamentalmente por neuronas granulares, Guedj *et al.* (2012) contaron células en la capa polimorfa del DG, constituida por fibras e interneuronas. Por otro lado, estos autores también demostraron que *Dyrk1A* afecta a la densidad celular de una manera región-específica. En todo caso, estos resultados sugieren nuevamente que las dosis inadecuadas del gen *Dyrk1A* dan lugar a anomalías en la morfología cerebral.

Tanto las neuronas proliferativas o en diferentes estadios de diferenciación como las maduras parecen estar implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria hipocampo-dependientes cumpliendo diferentes funciones (Aimone *et al.*, 2006, Ambrogini *et al.*, 2004, 2009; Deng *et al.*, 2010, Garthe y Kempermann, 2013). Por tanto, la recuperación de la proliferación y de otros tipos celulares en estadios posteriores de maduración probablemente está muy implicada en la mejoría cognitiva encontrada tras la normalización de la dosis de *Dyrk1A* en los animales TS +/-, a pesar de no haberse restablecido el número total de células del DG. De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que la restauración de la neurogénesis mediante la administración de fluoxetina, litio o RO4938581, un modulador alostérico negativo de la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A, mejora las habilidades cognitivas de los ratones TS (Bianchi *et al.*, 2010; Contestabile *et al.*, 2013; Martínez-Cué *et al.*, 2013).

Por otro lado, no debe olvidarse que el número o la densidad celular encontrada en la capa granular del DG durante la etapa adulta tiene su origen fundamentalmente en la neurogénesis acontecida durante el desarrollo. Además, en el SNC *Dyrk1A* se expresa siguiendo un patrón espacio-temporal, sugiriendo papeles fisiológicos distintos en el neurodesarrollo y en el funcionamiento del cerebro adulto. Por lo tanto, sería importante estudiar los procesos celulares valorados en el presente trabajo en estadios tempranos del desarrollo en los diferentes grupos experimentales.

Varios estudios han asociado la dosis génica de *Dyrk1A* con el volumen del cerebro, atribuyéndole a este gen un papel estructural (Ahn *et al.*, 2006; Guedj *et al.*, 2012; Sebrie *et al.*, 2008). De manera consistente con estos hallazgos, en el presente trabajo, cuando la dosis de *Dyrk1A* se redujo a una única copia funcional, los animales CO +/- mostraron una acusada disminución en el tamaño de su DG o la SGZ. Sin embargo, consistentemente con el número deficitario de células encontrado en el DG en los animales TS +/-, el tamaño del DG o la SGZ tampoco fue restaurado tras la normalización de la dosis génica *Dyrk1A*, presentando estos animales una reducción similar a la encontrada en los ratones TS +/+/. Igualmente ocurre con el peso corporal, que sigue exactamente el mismo patrón en cada grupo experimental. El que los animales haploinsuficientes CO +/- mostraran una acusada reducción de tamaño de estas estructuras arroja nuevas evidencias sobre el papel de *Dyrk1A* durante el desarrollo, probablemente en los mecanismos de proliferación celular. No obstante, en los animales TS +/- sigue existiendo una reducción en el tamaño de distintas estructuras cerebrales, lo sugiere nuevamente que otros genes no normalizados en este estudio participan en este fenotipo del ratón TS, tanto durante el desarrollo como en estadios adultos. Por otro lado, los modelos de SD que sobreexpresan *Dyrk1A* o el ratón *Dyrk1A*^{+/-} muestran una gran heterogeneidad en la anatomía de diversas regiones cerebrales, viéndose aumentadas unas o disminuyendo otras, lo que respalda el papel parcial de *Dyrk1A* en la morfología cerebral.

En resumen, estos resultados sugieren que el efecto de la normalización de *Dyrk1A* en el hipocampo del ratón TS estaría más relacionado con el rescate funcional, mientras que su papel estructural sería parcial, probablemente debido a la participación de otros genes no normalizados en el ratón TS +/-/. En cualquier caso, para ofrecer una interpretación sólida del papel fisiológico de *Dyrk1A*, sería necesario esclarecer qué ocurre en los distintos estadios celulares durante el desarrollo, así como realizar una caracterización más exhaustiva de las fases finales de maduración/diferenciación celular en el hipocampo de animales adultos.

7. Balance excitador-inhibidor del hipocampo

Numerosos estudios han demostrado que las alteraciones cognitivas que presenta el modelo TS de SD se deben en parte al desequilibrio entre la neurotransmisión inhibitoria y excitadora, dando lugar a unos niveles de inhibición neuronal excesivos (Martínez-Cué *et al.*, 2014). En particular, la marcada reducción de la LTP en el área CA1 y el DG del hipocampo se ha asociado a la inhibición mediada por GABA (Belichenko *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2007; Kleschevnikov *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2008), ya que las alteraciones en la plasticidad sináptica y los trastornos cognitivos en el ratón TS desaparecen tras la administración de diversos antagonistas o moduladores alostéricos negativos del receptor GABA_A (Braudeau *et al.*, 2011; Colas *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2007; Martínez-Cué *et al.*, 2013) o antagonistas del receptor GABA_B (Belichenko *et al.*, 2004; Costa y Grybko, 2005; Kleschevnikov *et al.*, 2012).

De forma consistente con el aumento de los niveles de proteínas sinápticas GABAérgicas en la corteza y el hipocampo de los ratones TS encontrado en numerosos trabajos (Martínez-Cué *et al.*, 2013; Rueda *et al.*, 2010; Souchet *et al.*, 2014), en este estudio se encontró una mayor expresión de GAD65/67, un marcador de sinapsis GABAérgicas, y la reducción de la expresión de VGLUT1, un marcador de sinapsis glutamatérgicas, así como un déficit sináptico general (GAD65/67 + VGLUT1) en la capa molecular del DG. Reducir una copia del gen *Dyrk1A* en el ratón TS disminuyó la expresión de GAD65/67 y aumentó la de VGLUT1, dando lugar a una menor inhibición de su hipocampo, además de un incremento en los niveles totales de marcaje positivo para ambos marcadores.

El papel de *Dyrk1A* en la inhibición también ha sido confirmado en un estudio reciente (Souchet *et al.*, 2014) que evaluó la implicación de su dosis génica en los niveles de inhibición en el hipocampo. Este estudio demostró que el aumento de la dosis de *Dyrk1A* en los ratones mBACtg*Dyrk1A*, TS y Dp(16)1Yey, que contienen 3 copias de este gen, condujo al incremento del número y la intensidad de la señal de dos marcadores de sinapsis GABAérgicas, GAD67 y VGAT. Además, como se observa en el presente estudio, Souchet *et al.* (2014) también encontraron una disminución en la expresión del marcador de sinapsis excitadoras VGLUT1 en los modelos de ratones portadores de tres copias del gen *Dyrk1A* en comparación con los animales euploides. En conjunto,

estos resultados apoyan el papel de la sobreexpresión de *Dyrk1A* en la sobreinhibición encontrada en los ratones TS.

En el presente trabajo, como consecuencia de la reducción del marcaje GAD65/67+ y el incremento en el marcaje de VGLUT1+, en los ratones TS +/- mejoró el balance excitador-inhibidor, aunque el equilibrio no se normalizó totalmente. De la misma forma, el área total ocupada por la suma de ambos marcadores, excitadores e inhibidores, tampoco fue completamente restablecida, sugiriendo una recuperación incompleta no sólo de la naturaleza de las conexiones sinápticas, sino también de la abundancia de las mismas, lo que concuerda con la falta de recuperación total del número de células granulares del DG encontrado en estos ratones. No obstante, al igual que en el caso de la densidad granular, los niveles de excitación e inhibición en individuos adultos están más relacionados con la integración sináptica neuronal acontecida durante el desarrollo que con la ocurrida durante la edad adulta, por lo que resultaría más interesante estudiar estos parámetros en estadíos más tempranos. En cualquier caso, su valoración en individuos adultos también proporciona información sobre la influencia de *Dyrk1A* en este proceso fisiológico.

En conjunto, estos resultados apoyan la idea del papel fundamentalmente funcional de *Dyrk1A* en el balance excitador-inhibidor del hipocampo. Pero además, también sugieren que otros genes ortólogos a genes del HSA21 no estudiados en este trabajo podrían estar involucrados en este desequilibrio. Entre los candidatos, de nuevo *Olig1* y *Olig2* parecen estar implicados en el aumento del número de neuronas inhibitoras encontrado en el cerebro anterior de ratones TS, acompañado por un aumento en las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas en las neuronas piramidales de la zona CA1 (Chakrabarti *et al.*, 2010).

En el hipocampo de los animales CO +/- se encontró un importante aumento del marcaje GAD65/67+ respecto a los animales euploides y una densidad de marcadores excitadores completamente normal. Debido a su marcada sobre-inhibición, el balance entre ambos tipos de marcadores sinápticos no fue normalizado. Estos resultados apoyan nuevamente el papel de *Dyrk1A* en el balance excitador/inhibidor cerebral. Sin embargo, contrastan con los hallados por Souchet *et al.* (2014), quienes encuentran un reducido marcaje para el marcador inhibitorio GAD67+ en el hipocampo de los ratones

Dyrk1A^{+/-}. En el presente trabajo el área ocupada por los marcadores fue determinada en la ML del DG, en una zona muy próxima a las neuronas granulares por la que entra un importante haz de las fibras entorrinales, siendo el estrato más plástico. Además, a esta zona llegan los árboles dendríticos en crecimiento de las nuevas neuronas originadas durante la neurogénesis adulta. Sin embargo, Souchet *et al.* efectuaron su análisis en el estrato radiado del CA1, sobre las dendritas apicales de las piramidales. Por lo tanto, ambas regiones no tendrían por qué presentar los mismos niveles en sus marcadores. Por otro lado, en las neuronas, los enzimas GAD65 y GAD67 sintetizan GABA con diferentes propósitos funcionales. GAD67 está relacionado con mecanismos neuronales no relacionados con la neurotransmisión, como la sinaptogénesis y la protección de lesiones neuronales. Mientras, GAD65 está implicado directamente en la transmisión sináptica (Pinal y Tobin, 1998). Debido a estas diferencias funcionales, ambos marcajes (GAD67 vs. GAD65/67) no tendrían por qué correlacionarse estrictamente. De hecho, Souchet *et al.* (2014) no encuentran los mismos niveles de inhibición en todos los marcadores examinados en los ratones *Dyrk1A*^{+/-}, ya que mientras la expresión de GAD67 está disminuida, la de VGAT es totalmente normal.

8. Papel de *Dyrk1A* en el fenotipo cerebelar

Una de las características comunes a todos los individuos con SD es la marcada reducción de su tamaño cerebelar (Aylward *et al.*, 1997). Este deterioro no se ve agravado con la edad. Como ya se comentó anteriormente, el cerebelo, además de tener un papel clave en la regulación del control propioceptivo-motor y del aprendizaje motor, también está implicado en procesos cognitivos superiores como la atención, la memoria espacial o la flexibilidad cognitiva. Por lo tanto, su deterioro también estaría relacionado con los déficits cognitivos asociados al SD.

El cerebelo del ratón TS también presenta una importante reducción de tamaño, que es aparente desde etapas tempranas de su desarrollo hasta la edad adulta. Esta reducción afecta tanto a la ML como a la GL del cerebelo. Además, estos animales muestran una disminución en la densidad lineal de neuronas de Purkinje y en la densidad de células granulares, lo que se correlaciona con la reducción del grosor de la GL. De manera similar, los cerebelos humanos con SD también presentan una marcada hipocelularidad en su GL (Baxter *et al.*, 2000).

En el presente trabajo también se encontraron las mismas alteraciones anatómicas en el cerebelo del ratón TS $+/+$, incluyendo un reducido tamaño del vermis cerebelar, la ML y la GL, así como una acusada hipocelularidad granular y en la densidad de las células de Purkinje.

Las alteraciones en la morfología del cerebelo encontradas tanto en los animales TS como en las personas con SD son debidas a alteraciones acontecidas durante el neurodesarrollo. En esta etapa, en el cerebelo del ratón TS existe un déficit en la generación de precursores de células granulares y una la ralentización de su ciclo celular, que también se ha demostrado en otras estructuras del SNC del ratón TS (Contestabile *et al.*, 2009, Roper *et al.*, 2006). De forma similar, en el cerebelo de fetos con SD la proliferación celular también está alterada dando lugar a una marcada hipocelularidad (Guidi *et al.*, 2011).

Como se ha repetido en numerosas secciones de esta tesis, son muchas las evidencias que vinculan al gen *Dyrk1A* a procesos proliferativos y su sobreexpresión a la alteración de los mismos. En este estudio, tras la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A* en el ratón TS $+/-$ se restableció completamente el tamaño del vermis cerebelar. Igualmente, se normalizó el grosor de la ML y la GL así como la densidad de neuronas granulares y de células de Purkinje.

Por otro lado, la disminución de una copia de este gen en los animales CO $+/-$ dio lugar a una acusada disminución en el tamaño del cerebelo de estos ratones. Estos resultados son consistentes con la reducción de tamaño encontrada en otras regiones anatómicas y en los animales *Dyrk1A* ^{$+/-$} (Fotaki *et al.*, 2002). Además, esta alteración se vio acompañada por la reducción del grosor de la ML y GL y el aumento de la densidad de GC en estos animales.

Los resultados encontrados en los animales TS $+/-$ y CO $+/-$ de nuevo ponen de manifiesto el papel de este gen en el fenotipo cerebelar y sugieren que quizá la corrección de su dosis rescata los eventos proliferativos y neuroanatómicos alterados durante el desarrollo del cerebelo en los animales TS.

En los animales TS $+/+$ la ML se vio especialmente reducida respecto a los animales euploides. Este hecho sugiere un probable acortamiento de los árboles dendríticos de

sus células de Purkinje. Dado que la corrección de la dosis de *Dyrk1A* normalizó el grosor de esta capa y debido a las numerosas evidencias del papel de este gen en la arborización dendrítica (Benavides-Piccione *et al.*, 2005; Hammerle *et al.*, 2003; Martínez de Lagran *et al.*, 2012), es posible que la normalización del grosor de la ML en estos animales haya sido debida a un incremento en la arborización, por lo que futuros estudios deberían analizar esta hipótesis. Paralelamente, también la ML de los animales CO +/- presentó una reducción muy acusada, lo que podría ser debido a que en esta estructura los arboles dendríticos neuronales estén también acortados tal y como se ha descrito en otras estructuras cerebrales (Benavides-Piccione *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta todas las evidencias que vinculan al gen *Dyrk1A* con la ralentización o a la disminución de la mitosis de los precursores granulares cerebelares por la disminución de los mismos a su vez (Roper *et al.*, 2006) durante el neurodesarrollo y en etapas perinatales, la corrección de su dosis génica en el animal TS +/- podría estar restaurando los déficits proliferativos, lo que finalmente tendría como resultado la restauración de la anatomía cerebelar.

Curiosamente, los animales CO +/- exhibieron un profundo aumento en la densidad de sus GC. Sin embargo, al no haberse realizado técnicas estereológicas ni haberse estimado el volumen cerebelar total, no pudo estimarse el número total de células granulosas en el cerebelo del ratón CO +/-, lo que determinaría si existe finalmente una recuperación del número de GC o por el contrario, si sigue existiendo un déficit proliferativo tal y como ocurre en otras estructuras. Esta idea es aplicable al análisis cerebelar del resto de grupos experimentales, como el TS +/-/. Tampoco puede esclarecerse si esta gran compactación neuronal en los animales CO +/- podría deberse a algún tipo de mecanismo compensatorio frente a los déficits en otras estructuras.

La proliferación de los precursores granulares es dependiente del factor Shh (Dahmane y Ruiz i Altaba, 1999), un potente mitógeno que es producido por las células de Purkinje. Roper *et al.* (2006) demostraron que la causa de la reducción de la proliferación celular durante la histogénesis postnatal y el reducido número de células granulares en el cerebelo adulto del ratón TS es el hecho de que los precursores de células granulares presentan una menor estimulación por el factor de crecimiento Shh, que es secretado por las células de Purkinje. Estos autores proponen que, dado que los

ratones TS presentan un reducido número de células de Purkinje, la cantidad de Shh también debería estar disminuida, lo que contribuiría a la reducción de la tasa de proliferación de los precursores de GC. En el presente trabajo, el número de células de Purkinje fue restablecido en el vermis de los animales TS $+/-$ tras la normalización de la dosis génica de *Dyrk1A*. De acuerdo con lo planteado por Roper *et al.* (2006), este hecho sugiere la hipótesis de que, de forma indirecta, también podría estar restablecida la actividad de la vía Shh, lo que tendría como consecuencia la normalización encontrada en el número de GC y la estructura de su cerebelo.

En conjunto, los resultados del presente estudio en el hipocampo y cerebelo sugieren que la completa normalización del número de células del DG no es una condición necesaria para la mejoría cognitiva. No obstante, la morfología del cerebelo aparentemente sí fue normalizada tras la reducción de la dosis de *Dyrk1A* en los animales TS. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la recuperación del fenotipo cerebelar en los animales TS $+/-$ podría contribuir a la mejoría cognitiva encontrada en estos animales, dado el papel del cerebelo en el aprendizaje espacial (Burguiere *et al.*, 2005; Rochefort *et al.*, 2013). De forma muy similar a las evidencias encontradas en este estudio, el tratamiento con SAG 1.1, un agonista de la vía Shh, restableció completamente los déficits morfológicos del cerebelo del ratón TS pero no los del hipocampo (cuyo número de células en el DG no fue recuperado). A pesar de ello, este tratamiento recuperó las capacidades cognitivas dependientes del hipocampo del ratón TS (Das *et al.*, 2013).

Por otro lado, las personas con SD presentan problemas motores que habitualmente se han atribuido a sus alteraciones cerebelares (Latash y Corcos, 1991). Sin embargo, como ya fue comentado en el apartado 4 de esta discusión, a pesar de la acusada reducción de las neuronas cerebelares encontradas en el ratón TS en numerosos estudios, incluido el presente, no se ha encontrado ninguna alteración motora en estos animales (Baxter *et al.*, 2000; Escorihuela *et al.*, 1998). Por lo tanto, en relación al fenotipo cerebelar, en este estudio no pudo establecerse ninguna correlación entre el comportamiento motor y la dosis de *Dyrk1A*, ya que tanto las habilidades motoras de los ratones TS $+/+$ como las de los TS $+/-$ resultaron completamente normales.

Algunos autores proponen que, en el ratón TS, las GC que sobreviven a la edad adulta pueden ser esencialmente normales a nivel funcional, aunque su número y sus conexiones sean anormales (Saran *et al.*, 2003). Por otro lado, recientemente ha sido demostrado que una minoría de GC funcionalmente intacta es suficiente para el mantenimiento de habilidades motoras básicas, mientras que la adquisición y la estabilización de memorias más complejas requiere un alto número de GC normales (Galliano *et al.*, 2013). De nuevo estas evidencias ponen de manifiesto que quizá las alteraciones cerebelares en el ratón TS estén más relacionadas con el fenotipo cognitivo que con el motor.

En cualquier caso, en el estudio de las destrezas cognitivo-conductuales dependientes del cerebelo deberían ser usadas técnicas más específicas y sensibles que ayuden a desenmascarar el fenotipo conductual real de los grupos experimentales. Tal es el caso de las empleadas por Gutierrez-Castellanos *et al.* (2013b) (comentadas en el apartado 4 de la Discusión), cuyo análisis resulta más apropiado para detectar déficits en el aprendizaje motor dependiente del cerebelo que las pruebas de rotarod, la fuerza de agarre o la prueba de la percha empleadas en este trabajo, todas ellas pruebas en las que pueden influir déficits no cerebelares, como los musculoesqueléticos o nerviosos.

9. Papel de *Dyrk1A* en el proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento

Uno de los principales circuitos afectados en la neuropatología tipo Alzheimer característica del SD y del ratón TS son las vías colinérgicas del prosencéfalo basal que tienen un papel fundamental en el aprendizaje, la memoria reciente y la atención. En concreto, la degeneración del sistema colinérgico septohipocampal contribuye profundamente en la progresión del deterioro cognitivo (Millan Sanchez *et al.*, 2012; Schliebs y Arendt, 2011).

A pesar de que numerosos trabajos han demostrado que los ratones TS presentan, a partir de los 6 meses de edad, una disminución del tamaño del cuerpo celular y del número de sus BFCNs (Granholm *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2003; Seo y Isacson, 2005), en el presente trabajo no se observaron diferencias en el volumen de los núcleos basales, en la densidad o en el número de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal entre los animales euploides y TS +/+ de 6 meses de edad. Además, la normalización

de la dosis génica de *Dyrk1A* en los ratones TS tampoco tuvo ningún efecto sobre estas variables. El hecho de no encontrar tales alteraciones en los ratones TS del presente estudio probablemente sea debido a que, a los 6 meses de edad, la degeneración colinérgica de los animales examinados aún se encontraba en estadios muy iniciales, por lo que no fue detectable. A pesar de que Granholm *et al.* (2000), señalaron que el inicio de la neurodegeneración colinérgica se producía a partir de los 6 meses de edad, este proceso se veía agravado a medida que los animales envejecían. De hecho, la mayoría de los estudios realizados sobre el fenotipo colinérgico se han llevado a cabo utilizando animales de edades más avanzadas (de los 12 a los 18 meses de edad) (Corrales *et al.*, 2012; Hunter *et al.*, 2003; Seo y Isacson, 2005).

Por otro lado, los animales CO +/- presentaron una marcada reducción de los núcleos basales analizados (MSN, HDB y VDB). Aunque la densidad de neuronas colinérgicas de estos animales no se encontraba modificada, su número total sí se vio drásticamente reducido. Estas observaciones son consistentes con el fenotipo encontrado en el cerebelo, en el que se encontró un aumento en la densidad de GC a pesar de la reducción de tamaño del vermis y con otros trabajos realizados en el modelo *Dyrk1A*^{+/-} comentados en apartados anteriores de esta discusión. Dado que en el resto de grupos experimentales no se encontraron indicios de haber comenzado el deterioro del cerebro basal a los 6 meses de edad, en conjunto, estos resultados sugieren que el déficit celular en los animales CO +/- probablemente es debido a los efectos de la haploinsuficiencia de *Dyrk1A* durante el desarrollo, igual que en otras estructuras, más que a la degeneración colinérgica temprana.

La progresiva disfunción cerebral observada en la EA y el SD se ha relacionado con un inadecuado aporte del factor de crecimiento nervioso NGF al sistema colinérgico (Cooper *et al.*, 2001). Se ha propuesto que uno de los factores que afecta al sistema neurotrófico es APP y sus productos de escisión amiloides. Concretamente, Salehi *et al.* (2006) proponen que el gen que codifica esta proteína, cuya implicación en la patogenia de la EA es bien conocida, participa en la degeneración progresiva de las neuronas colinérgicas mediante la alteración de la acción del NGF. En el presente estudio se encontró un aumento de la cantidad de la proteína APP tanto en el hipocampo como en el cerebelo de los ratones TS +/+ a los 13 meses de edad, lo que

resulta consistente con estudios previos (Hunter *et al.*, 2003; Rueda *et al.*, 2010; Seo y Isacson, 2005). Sin embargo, su acúmulo en cerebelo ($\approx 15\%$) fue menor que en el hipocampo ($\approx 25\%$), por lo que los niveles encontrados en la primera estructura no difirieron estadísticamente de los mostrados por los animales euploides. La normalización de la dosis de *Dyrk1A* en los animales TS $+/-$ redujo la acumulación de APP hasta unos valores completamente normales en ambas estructuras. Por otro lado, la haploinsuficiencia del gen en los animales CO $+/-$ condujo a la disminución de la expresión de APP ($\approx 20\%$) tanto en el hipocampo como en el cerebelo. Estos resultados ponen de manifiesto un posible efecto regulador de *Dyrk1A* sobre la expresión o el acúmulo de APP, hasta el momento no descrito. Dado que el análisis de los núcleos basales colinérgicos se realizó a los 6 meses, sin encontrarse evidencias de degeneración a esa edad, por el momento resulta imposible esclarecer si existe alguna relación entre los niveles de APP encontrados en los distintos genotipos y su fenotipo colinérgico.

Como ya se ha comentado anteriormente, aunque en el ratón TS no presenta placas amiloides, sí desarrolla un incremento en la acumulación de péptidos A β neurotóxicos (Hunter *et al.*, 2003; Netzer *et al.*, 2010). El péptido A β 42 es el más tóxico generado por el procesamiento no canónico de APP. Además, es el que primero empieza a depositarse una vez comienza la patología tipo EA y parece ser el responsable del depósito inicial de placas neuríticas, pues facilita la agregación de otras especies más solubles como A β 40 (Webb y Murphy, 2012). Así, en el presente estudio, se examinó la isoforma amiloide A β 42 en la corteza, el hipocampo y el cerebelo de los distintos grupos experimentales a los 13 meses de edad.

Los ratones TS $+/+$ presentaron un acusado aumento de este péptido tanto en la corteza como en el hipocampo, tal y como demuestran otros trabajos (Corrales *et al.*, 2013); Hunter *et al.*, 2004). Sin embargo, Choi *et al.* (2009) no encontraron variaciones en el péptido A β 42 en los animales TS. A pesar de ello, las diferencias entre ambos trabajos probablemente se deban a que estos autores utilizaron homogenizados cerebrales en su estudio, lo que no permite detectar el acúmulo de A β en poblaciones celulares concretas. La normalización de la dosis de *Dyrk1A* redujo los niveles de A β 42 de ambas estructuras en los animales TS $+/-$, aunque este efecto fue mucho más

notable en la corteza. En el hipocampo, este fenotipo probablemente es debido a la reducción de los niveles de APP previamente encontrados en estos animales y a la reducción del procesamiento de la proteína por la vía no canónica que produce el acúmulo de A β . Como ya fue señalado, existen evidencias que implican a Dyrk1A en la escisión proteolítica de APP mediante su fosforilación, lo que facilita su procesamiento por BACE1 y conduce al acúmulo de péptidos neurotóxicos (Ryoo *et al.*, 2008). Como consecuencia, la sobreexpresión de *DYRK1A* en el SD da lugar al depósito de elevadas cantidades de A β , contribuyendo a la patogénesis tipo EA.

Por otro lado, Kimura *et al.* (2007) demostraron que la proteína A β , en especial la A β 42, promueve el aumento de la transcripción de *DYRK1A* en células de neuroblastoma, lo que se observa también en modelos murinos de EA (PS1^{L213T}KI y Tg-PS1/APP). De hecho, *DYRK1A* se encuentra sobreexpresado en los cerebros de pacientes de EA desde estadios tempranos de la enfermedad (Ferrer *et al.*, 2005). Estas evidencias sugieren que A β y *DYRK1A* (que ya está de por sí aumentado en el SD) se retroalimentan positivamente y aceleran la producción de más A β . Además, esta cadena también establece un vínculo patogénico con la hiperfosforilación de Tau, favoreciéndola. Por lo tanto, resulta esperable que la normalización de la dosis de *Dyrk1A* en los ratones TS +/- tenga como resultado la recuperación de los niveles de A β 42, tal y como se encuentra en este trabajo.

Por otro lado, los animales CO +/- mostraron niveles de A β 42 equiparables a los de los individuos CO ++ en el hipocampo y la corteza. Sin embargo, teniendo en cuenta que sólo portan una única copia funcional de *Dyrk1A* y que los niveles de APP también fueron menores en este grupo, sería esperable encontrar un acúmulo menor.

En cuanto a los niveles de A β 42 en el cerebelo, no se encontraron diferencias entre los animales CO ++ y los TS +/+/+, lo que concuerda con el leve aumento de APP encontrado en esta estructura en los animales TS +/+/+. Además, la variación de la dosis génica de *Dyrk1A* en los animales CO +/- y TS +/- tampoco tuvo ningún efecto sobre los niveles del péptido A β 42 en esta estructura ya que todos los grupos experimentales presentaron valores similares a los individuos euploides. Aunque existen evidencias de la acumulación de placas difusas con A β 42 en el cerebelo de personas con SD (Mann y Iwatsubo, 1996), hasta el momento no existen estudios

sobre la acumulación de A β , en ninguna de sus formas neurotóxicas, en el cerebelo de los animales TS que permitan contrastar los resultados del presente trabajo.

10. Reflexión final

A la luz de los resultados expuestos y discutidos en el presente estudio, podría deducirse que en los animales CO +/- *Dyrk1A* podría tener un papel más anatómico que funcional, siendo los posibles defectos funcionales derivados de la haploinsuficiencia compensados por la dosis correcta del resto de sus genes. Sin embargo, en los animales TS +/- el efecto de la normalización de este gen podría ser esencialmente funcional y solo parcialmente anatómica, probablemente debido a las alteraciones causadas por la trisomía de otros muchos genes con importantes efectos sobre la neuroanatomía y las vías moleculares implicados en los distintos fenotipos encontrados en el ratón TS.

Conclusiones

La normalización de la dosis del gen *Dyrk1A* en el ratón TS:

1. Rescató parcialmente su viabilidad, pero no su peso corporal.
2. Tuvo efectos *procognitivos* ya que mejoró parcialmente su memoria asociativa contextual, su memoria de referencia, de trabajo y su aprendizaje procedimental.
3. No afectó a sus niveles de **ansiedad**.
4. No rescató la hiperactividad que el animal TS muestra en situaciones aversivas. Sin embargo, redujo su actividad espontánea, conduciendo a un fenotipo hipoactivo en condiciones normales.
5. No produjo ningún cambio en la mayoría de las habilidades sensoriales y motoras evaluadas.
6. Recuperó la **LTP hipocampal**.
7. Mejoró el **fenotipo histológico hipocampal** pero no el **morfológico** ya que:
 - No contrarrestó los defectos en el tamaño del DG o del área de la SGZ hipocampal ni restauró el número total ni la densidad de células granulares en el DG.
 - Sin embargo, recuperó la proliferación celular en el hipocampo, mejoró parcialmente la diferenciación neuronal y corrigió parcialmente la fisiología celular, mejorando el balance excitador/inhibidor.
8. Tuvo efectos beneficiosos en la **morfología e histología del cerebelo** del ratón TS ya que recuperó el tamaño y la arquitectura del vermis cerebelar así como la densidad de células granulares y de Purkinje en esta estructura.
9. Por último, redujo la progresión del **proceso neurodegenerativo asociado al envejecimiento** característico del ratón TS reduciendo tanto los niveles de App en el hipocampo como los acúmulos de A β 42 en la corteza y el hipocampo.

La reducción de una copia del gen *Dyrk1A* en el ratón CO:

1. Produjo una reducción de su viabilidad y su peso corporal.
2. No generó alteraciones en su memoria de referencia, su memoria de trabajo o su aprendizaje procedimental. Sin embargo, produjo un ligero déficit en su memoria asociativa contextual.
3. No afectó a sus niveles de **ansiedad**.

Conclusiones

4. Produjo una ligera **hiperactividad** en situaciones nuevas y/o aversivas. Sin embargo, redujo su actividad espontanea durante la fase de oscuridad.
5. Ocasiono una leve disfunción motora en algunas pruebas sensorimotoras, pero mejoró la coordinación motora en el rotarod.
6. Deterioró su **LTP hipocampal**.
7. Afectó al **fenotipo histológico y morfológico del hipocampo** reduciendo el tamaño del DG y del área de la SGZ, disminuyendo la proliferación celular, produciendo un acusado déficit en el número total y la densidad de células granulares del DG y generando un desbalance en el equilibrio excitador/inhibidor, dando lugar a un exceso de inhibición en la ML del DG.
8. Afectó a la **morfología e histología cerebelar** produciendo una acusada reducción del vermis cerebelar, alterando la arquitectura de esta estructura, aumentando la densidad de células granulares y sin modificar la densidad de células de Purkinje.
9. Y, por último, no ocasionó ninguna **alteración neurodegenerativa**.

Bibliografía

- Abercrombie, M., 1946, Estimation of nuclear population from microtome sections: *Anat Rec*, v. 94, p. 239-47.
- Adayev, T., M. C. Chen-Hwang, N. Murakami, R. Wang, and Y. W. Hwang, 2006, MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 351, p. 1060-5.
- Ahn, K. J., H. K. Jeong, H. S. Choi, S. R. Ryoo, Y. J. Kim, J. S. Goo, S. Y. Choi, J. S. Han, I. Ha, and W. J. Song, 2006, DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects: *Neurobiol Dis*, v. 22, p. 463-72.
- Aimone, J. B., J. Wiles, and F. H. Gage, 2006, Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories: *Nat Neurosci*, v. 9, p. 723-7.
- Aimone, J. B., J. Wiles, and F. H. Gage, 2009, Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding: *Neuron*, v. 61, p. 187-202.
- Ait Yahya-Graison, E., J. Aubert, L. Dauphinot, I. Rivals, M. Prieur, G. Golfier, J. Rossier, L. Personnaz, N. Creau, H. Blehaut, S. Robin, J. M. Delabar, and M. C. Potier, 2007, Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes: *Am J Hum Genet*, v. 81, p. 475-91.
- Aldridge, K., R. H. Reeves, L. E. Olson, and J. T. Richtsmeier, 2007, Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models: *Am J Med Genet A*, v. 143a, p. 1060-70.
- Altafaj, X., M. Dierssen, C. Baamonde, E. Marti, J. Visa, J. Guimera, M. Oset, J. R. Gonzalez, J. Florez, C. Fillat, and X. Estivill, 2001, Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome: *Hum Mol Genet*, v. 10, p. 1915-23.
- Altafaj, X., E. D. Martín, J. Ortiz-Abalia, A. Valderrama, C. Lao-Peregrín, M. Dierssen, and C. Fillat, 2013, Normalization of Dyrk1A expression by AAV2/1-shDyrk1A attenuates hippocampal-dependent defects in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Neurobiol Dis*, v. 52, p. 117-27.
- Alvarez, M., X. Altafaj, S. Aranda, and S. de la Luna, 2007, DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 1167-78.
- Alvarez, M., X. Estivill, and S. de la Luna, 2003, DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly: *J Cell Sci*, v. 116, p. 3099-107.
- Ambrogini, P., D. Lattanzi, S. Ciuffoli, D. Agostini, L. Bertini, V. Stocchi, S. Santi, and R. Cuppini, 2004, Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus: *Brain Res*, v. 1017, p. 21-31.
- Anagnostaras, S. G., G. D. Gale, and M. S. Fanselow, 2001, Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances: *Hippocampus*, v. 11, p. 8-17.
- Antonarakis, S. E., R. Lyle, E. T. Dermitzakis, A. Reymond, and S. Deutsch, 2004, Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology: *Nat Rev Genet*, v. 5, p. 725-38.
- Antonarakis, S. E., and C. J. Epstein, 2006, The challenge of Down syndrome: *Trends Mol Med*, v. 12, p. 473-9.

- Aranda, S., M. Alvarez, S. Turro, A. Laguna, and S. de la Luna, 2008, Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A: *Mol Cell Biol*, v. 28, p. 5899-911.
- Arqué, G., V. Fotaki, D. Fernández, M. Martínez de Lagrán, M. L. Arbonés, and M. Dierssen, 2008, Impaired spatial learning strategies and novel object recognition in mice haploinsufficient for the dual specificity tyrosine-regulated kinase-1A (Dyrk1A): *PLoS One*, v. 3, p. e2575.
- Arqué, G., M. M. de Lagran, M. L. Arbones, and M. Dierssen, 2009, Age-associated motor and visuo-spatial learning phenotype in Dyrk1A heterozygous mutant mice: *Neurobiol Dis*, v. 36, p. 312-9.
- Arqué, G., A. Casanovas, and M. Dierssen, 2013, Dyrk1A is dynamically expressed on subsets of motor neurons and in the neuromuscular junction: possible role in Down syndrome: *PLoS One*, v. 8, p. e54285.
- Arron, J. R., M. M. Winslow, A. Polleri, C. P. Chang, H. Wu, X. Gao, J. R. Neilson, L. Chen, J. J. Heit, S. K. Kim, N. Yamasaki, T. Miyakawa, U. Francke, I. A. Graef, and G. R. Crabtree, 2006, NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21: *Nature*, v. 441, p. 595-600.
- Aylward, E. H., R. Habbak, A. C. Warren, M. B. Pulsifer, P. E. Barta, M. Jerram, and G. D. Pearlson, 1997, Cerebellar volume in adults with Down syndrome: *Arch Neurol*, v. 54, p. 209-12.
- Bahn, S., M. Mimmack, M. Ryan, M. A. Caldwell, E. Jauniaux, M. Starkey, C. N. Svendsen, and P. Emson, 2002, Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study: *Lancet*, v. 359, p. 310-5.
- Barallobre, M. J., C. Perier, J. Bove, A. Laguna, J. M. Delabar, M. Vila, and M. L. Arbones, 2014, DYRK1A promotes dopaminergic neuron survival in the developing brain and in a mouse model of Parkinson's disease: *Cell Death Dis*, v. 5, p. e1289.
- Bartesaghi, R., S. Guidi, and E. Ciani, 2011, Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome?: *Rev Neurosci*, v. 22, p. 419-55.
- Bartus, R. T., 2000, On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis: *Exp Neurol*, v. 163, p. 495-529.
- Baxter, M. G., and A. A. Chiba, 1999, Cognitive functions of the basal forebrain: *Curr Opin Neurobiol*, v. 9, p. 178-83.
- Baxter, L. L., T. H. Moran, J. T. Richtsmeier, J. Troncoso, and R. H. Reeves, 2000, Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse: *Hum Mol Genet*, v. 9, p. 195-202.
- Becker, L. E., D. L. Armstrong, and F. Chan, 1986, Dendritic atrophy in children with Down's syndrome: *Ann Neurol*, v. 20, p. 520-6.
- Becker, W., and H. G. Joost, 1999, Structural and functional characteristics of Dyrk, a novel subfamily of protein kinases with dual specificity: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, v. 62, p. 1-17.
- Becker, W., and W. Sippl, 2011, Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A: *Febs j*, v. 278, p. 246-56.

- Belichenko, P. V., E. Masliah, A. M. Kleschevnikov, A. J. Villar, C. J. Epstein, A. Salehi, and W. C. Mobley, 2004, Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome: *J Comp Neurol*, v. 480, p. 281-98.
- Belichenko, P. V., A. M. Kleschevnikov, A. Salehi, C. J. Epstein, and W. C. Mobley, 2007, Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships: *J Comp Neurol*, v. 504, p. 329-45.
- Belichenko, N. P., P. V. Belichenko, A. M. Kleschevnikov, A. Salehi, R. H. Reeves, and W. C. Mobley, 2009a, The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome: *J Neurosci*, v. 29, p. 5938-48.
- Belichenko, P. V., A. M. Kleschevnikov, E. Masliah, C. Wu, R. Takimoto-Kimura, A. Salehi, and W. C. Mobley, 2009b, Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *J Comp Neurol*, v. 512, p. 453-66.
- Benavides-Piccione, R., M. Dierssen, I. Ballesteros-Yanez, M. Martinez de Lagran, M. L. Arbones, V. Fotaki, J. DeFelipe, and G. N. Elston, 2005, Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/−} mouse: *Neurobiol Dis*, v. 20, p. 115-22.
- Bianchi, P., E. Ciani, A. Contestabile, S. Guidi, and R. Bartesaghi, 2010a, Lithium restores neurogenesis in the subventricular zone of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: *Brain Pathol*, v. 20, p. 106-18.
- Bianchi, P., E. Ciani, S. Guidi, S. Trazzi, D. Felice, G. Grossi, M. Fernandez, A. Giuliani, L. Calza, and R. Bartesaghi, 2010b, Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome: *J Neurosci*, v. 30, p. 8769-79.
- Biedenkapp, J. C., and J. W. Rudy, 2009, Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: role of ventral subiculum and amygdala: *Learn Mem*, v. 16, p. 38-45.
- Blazek, J. D., A. Gaddy, R. Meyer, R. J. Roper, and J. Li, 2011, Disruption of bone development and homeostasis by trisomy in Ts65Dn Down syndrome mice: *Bone*, v. 48, p. 275-80.
- Bothe, G. W., V. J. Bolivar, M. J. Vedder, and J. G. Geistfeld, 2005, Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models: *Comp Med*, v. 55, p. 326-34.
- Bowes, C., T. Li, W. N. Frankel, M. Danciger, J. M. Coffin, M. L. Applebury, and D. B. Farber, 1993, Localization of a retroviral element within the rd gene coding for the beta subunit of cGMP phosphodiesterase: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, p. 2955-9.
- Branchi, I., Z. Bichler, L. Minghetti, J. M. Delabar, F. Malchiodi-Albedi, M. C. Gonzalez, Z. Chettouh, A. Nicolini, C. Chabert, D. J. Smith, E. M. Rubin, D. Migliore-Samour, and E. Alleva, 2004, Transgenic mouse in vivo library of human Down syndrome critical region 1: association between DYRK1A overexpression, brain development abnormalities, and cell cycle protein alteration: *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 63, p. 429-40.
- Braudeau, J., B. Delatour, A. Duchon, P. L. Pereira, L. Dauphinot, F. de Chaumont, J. C. Olivo-Marin, R. H. Dodd, Y. Herault, and M. C. Potier, 2011, Specific targeting of the GABA-A receptor alpha5 subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice: *J Psychopharmacol*, v. 25, p. 1030-42.

- Burguiere, E., A. Arleo, M. Hojjati, Y. Elgersma, C. I. De Zeeuw, A. Berthoz, and L. Rondi-Reig, 2005, Spatial navigation impairment in mice lacking cerebellar LTD: a motor adaptation deficit?: *Nat Neurosci*, v. 8, p. 1292-4.
- Campeau, S., and M. Davis, 1995, Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli: *J Neurosci*, v. 15, p. 2312-27.
- Campbell, C., O. Landry, N. Russo, H. Flores, S. Jacques, and J. A. Burack, 2013, Cognitive flexibility among individuals with Down syndrome: assessing the influence of verbal and nonverbal abilities: *Am J Intellect Dev Disabil*, v. 118, p. 193-200.
- Campenot, R. B., and B. L. MacInnis, 2004, Retrograde transport of neurotrophins: fact and function: *J Neurobiol*, v. 58, p. 217-29.
- Capone, G., P. Kim, S. Jovanovich, L. Payne, L. Freund, K. Welch, E. Miller, and M. Trush, 2002, Evidence for increased mitochondrial superoxide production in Down syndrome: *Life Sci*, v. 70, p. 2885-95.
- Capone, G., P. Goyal, W. Ares, and E. Lannigan, 2006, Neurobehavioral disorders in children, adolescents, and young adults with Down syndrome: *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, v. 142c, p. 158-72.
- Carlesimo, G. A., L. Marotta, and S. Vicari, 1997, Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome: *Neuropsychologia*, v. 35, p. 71-9.
- Chakrabarti, L., Z. Galdzicki, and T. F. Haydar, 2007, Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *J Neurosci*, v. 27, p. 11483-95.
- Chakrabarti, L., T. K. Best, N. P. Cramer, R. S. Carney, J. T. Isaac, Z. Galdzicki, and T. F. Haydar, 2010, Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome: *Nat Neurosci*, v. 13, p. 927-34.
- Chang, H. S., C. H. Lin, C. H. Yang, M. S. Yen, C. R. Lai, Y. R. Chen, Y. J. Liang, and W. C. Yu, 2007, Increased expression of Dyrk1a in HPV16 immortalized keratinocytes enable evasion of apoptosis: *Int J Cancer*, v. 120, p. 2377-85.
- Chao, M. V., R. Rajagopal, and F. S. Lee, 2006, Neurotrophin signalling in health and disease: *Clin Sci (Lond)*, v. 110, p. 167-73.
- Chapman, R. S., and L. J. Hesketh, 2000, Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome: *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, v. 6, p. 84-95.
- Chen, J. Y., J. R. Lin, F. C. Tsai, and T. Meyer, 2013, Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle: *Mol Cell*, v. 52, p. 87-100.
- Chen-Hwang, M. C., H. R. Chen, M. Elzinga, and Y. W. Hwang, 2002, Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate: *J Biol Chem*, v. 277, p. 17597-604.
- Choi, J. H., J. D. Berger, M. J. Mazzella, J. Morales-Corraliza, A. M. Cataldo, R. A. Nixon, S. D. Ginsberg, E. Levy, and P. M. Mathews, 2009, Age-dependent dysregulation of brain amyloid precursor protein in the Ts65Dn Down syndrome mouse model: *J Neurochem*, v. 110, p. 1818-27.
- Clark, S., J. Schwalbe, M. R. Stasko, P. J. Yarowsky, and A. C. Costa, 2006, Fluoxetine rescues deficient neurogenesis in hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome: *Exp Neurol*, v. 200, p. 256-61.

- Colas, D., B. Chuluun, D. Warriar, M. Blank, D. Z. Wetmore, P. Buckmaster, C. C. Garner, and H. C. Heller, 2013, Short-term treatment with the GABAA receptor antagonist pentylentetrazole produces a sustained pro-cognitive benefit in a mouse model of Down's syndrome: *Br J Pharmacol*, v. 169, p. 963-73.
- Contestabile, A., T. Fila, C. Ceccarelli, P. Bonasoni, L. Bonapace, D. Santini, R. Bartesaghi, and E. Ciani, 2007, 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*, v. 17, p. 665-78.
- Contestabile, A., and E. Ciani, 2008, The place of choline acetyltransferase activity measurement in the "cholinergic hypothesis" of neurodegenerative diseases: *Neurochem Res*, v. 33, p. 318-27.
- Contestabile, A., T. Fila, R. Bartesaghi, and E. Ciani, 2009a, Cell cycle elongation impairs proliferation of cerebellar granule cell precursors in the Ts65Dn mouse, an animal model for Down syndrome: *Brain Pathol*, v. 19, p. 224-37.
- Contestabile, A., T. Fila, A. Cappellini, R. Bartesaghi, and E. Ciani, 2009b, Widespread impairment of cell proliferation in the neonate Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: *Cell Prolif*, v. 42, p. 171-81.
- Contestabile, A., F. Benfenati, and L. Gasparini, 2010, Communication breaks-Down: from neurodevelopment defects to cognitive disabilities in Down syndrome: *Prog Neurobiol*, v. 91, p. 1-22.
- Contestabile, A., B. Greco, D. Ghezzi, V. Tucci, F. Benfenati, and L. Gasparini, 2013, Lithium rescues synaptic plasticity and memory in Down syndrome mice: *J Clin Invest*, v. 123, p. 348-61.
- Cooper, J. D., A. Salehi, J. D. Delcroix, C. L. Howe, P. V. Belichenko, J. Chua-Couzens, J. F. Kilbridge, E. J. Carlson, C. J. Epstein, and W. C. Mobley, 2001, Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 10439-44.
- Corrales, A., P. Martínez, S. García, V. Vidal, E. García, J. Flórez, E. J. Sanchez-Barceló, C. Martínez-Cué, and N. Rueda, 2013, Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: *J Pineal Res*, v. 54, p. 346-58.
- Corrales, A., R. Vidal, S. García, V. Vidal, P. Martínez, E. García, J. Flórez, E. J. Sanchez-Barceló, C. Martínez-Cué, and N. Rueda, 2014, Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome: *J Pineal Res*, v. 56, p. 51-61.
- Costa, A. C., K. Walsh, and M. T. Davisson, 1999, Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome: *Physiol Behav*, v. 68, p. 211-20.
- Costa, A. C., and M. J. Grybko, 2005, Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome: *Neurosci Lett*, v. 382, p. 317-22.
- Coussons-Read, M. E., and L. S. Crnic, 1996, Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field: *Behav Genet*, v. 26, p. 7-13.
- Coyle, J. T., M. L. Oster-Granite, and J. D. Gearhart, 1986, The neurobiologic consequences of Down syndrome: *Brain Res Bull*, v. 16, p. 773-87.

- Dahmane, N., and A. Ruiz i Altaba, 1999, Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum: *Development*, v. 126, p. 3089-100.
- Das, I., J. M. Park, J. H. Shin, S. K. Jeon, H. Lorenzi, D. J. Linden, P. F. Worley, and R. H. Reeves, 2013, Hedgehog agonist therapy corrects structural and cognitive deficits in a Down syndrome mouse model: *Sci Transl Med*, v. 5, p. 201ra120.
- Dauphinot, L., R. Lyle, I. Rivals, M. T. Dang, R. X. Moldrich, G. Golfier, L. Ettwiller, K. Toyama, J. Rossier, L. Personnaz, S. E. Antonarakis, C. J. Epstein, P. M. Sinet, and M. C. Potier, 2005, The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome: *Hum Mol Genet*, v. 14, p. 373-84.
- Davisson, M. T., C. Schmidt, R. H. Reeves, N. G. Irving, E. C. Akesson, B. S. Harris, and R. T. Bronson, 1993, Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome: *Prog Clin Biol Res*, v. 384, p. 117-33.
- de Campos, A. C., K. R. Francisco, G. J. Savelsbergh, and N. A. Rocha, 2011, How do object size and rigidity affect reaching and grasping in infants with Down syndrome?: *Res Dev Disabil*, v. 32, p. 246-52.
- de Campos, A. C., C. S. da Costa, G. J. Savelsbergh, and N. A. Rocha, 2013, Infants with Down syndrome and their interactions with objects: development of exploratory actions after reaching onset: *Res Dev Disabil*, v. 34, p. 1906-16.
- de Graaf, K., P. Hekerman, O. Spelten, A. Herrmann, L. C. Packman, K. Bussow, G. Muller-Newen, and W. Becker, 2004, Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors: *J Biol Chem*, v. 279, p. 4612-24.
- de Graaf, K., H. Czajkowska, S. Rottmann, L. C. Packman, R. Lilischkis, B. Luscher, and W. Becker, 2006, The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site: *BMC Biochem*, v. 7, p. 7.
- Delabar, J. M., D. Theophile, Z. Rahmani, Z. Chettouh, J. L. Blouin, M. Prieur, B. Noel, and P. M. Sinet, 1993, Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21: *Eur J Hum Genet*, v. 1, p. 114-24.
- Delabar, J. M., R. Aflalo-Rattenbac, and N. Creau, 2006, Developmental defects in trisomy 21 and mouse models: *ScientificWorldJournal*, v. 6, p. 1945-64.
- De la Torre, R., S. De Sola, M. Pons, A. Duchon, M. M. de Lagran, M. Farré, M. Fitó, B. Benejam, K. Langohr, J. Rodriguez, M. Pujadas, J. C. Bizot, A. Cuenca, N. Janel, S. Catuara, M. I. Covas, H. Blehaut, Y. Herault, J. M. Delabar, and M. Dierssen, 2014, Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans: *Mol Nutr Food Res*, v. 58, p. 278-88.
- Demas, G. E., R. J. Nelson, B. K. Krueger, and P. J. Yarowsky, 1996, Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice: *Behav Brain Res*, v. 82, p. 85-92.
- Deng, W., J. B. Aimone, and F. H. Gage, 2010, New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?: *Nat Rev Neurosci*, v. 11, p. 339-50.
- Devenny, D. A., W. P. Silverman, A. L. Hill, E. Jenkins, E. A. Sersen, and K. E. Wisniewski, 1996, Normal ageing in adults with Down's syndrome: a longitudinal study: *J Intellect Disabil Res*, v. 40 (Pt 3), p. 208-21.
- Dickson, P. E., T. D. Rogers, N. Del Mar, L. A. Martin, D. Heck, C. D. Blaha, D. Goldowitz, and G. Mittleman, 2010, Behavioral flexibility in a mouse model of

- developmental cerebellar Purkinje cell loss: *Neurobiol Learn Mem*, v. 94, p. 220-8.
- Dierssen, M., R. Benavides-Piccione, C. Martínez-Cué, X. Estivill, J. Flórez, G. N. Elston, and J. DeFelipe, 2003, Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment: *Cereb Cortex*, v. 13, p. 758-64.
- Dierssen, M., and M. M. de Lagrán, 2006, DYRK1A (dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase 1A): a gene with dosage effect during development and neurogenesis: *ScientificWorldJournal*, v. 6, p. 1911-22.
- Dierssen, M., Y. Herault, and X. Estivill, 2009, Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome: *Physiol Rev*, v. 89, p. 887-920.
- Dierssen, M., 2012, Down syndrome: the brain in trisomic mode: *Nat Rev Neurosci*, v. 13, p. 844-58.
- Driscoll, L. L., J. C. Carroll, J. Moon, L. S. Crnic, D. A. Levitsky, and B. J. Strupp, 2004, Impaired sustained attention and error-induced stereotypy in the aged Ts65Dn mouse: a mouse model of Down syndrome and Alzheimer's disease: *Behav Neurosci*, v. 118, p. 1196-205.
- Duchon, A., M. Raveau, C. Chevalier, V. Nalesso, A. J. Sharp, and Y. Herault, 2011, Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome: *Mamm Genome*, v. 22, p. 674-84.
- Dykens, E. M., R. M. Hodapp, and D. W. Evans, 1994, Profiles and development of adaptive behavior in children with Down syndrome: *Am J Ment Retard*, v. 98, p. 580-7.
- Eichenbaum, H., 1999, The hippocampus and mechanisms of declarative memory: *Behav Brain Res*, v. 103, p. 123-33.
- Eichenbaum, H., 2001, The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes: *Behav Brain Res*, v. 127, p. 199-207.
- Ekstein, S., B. Glick, M. Weill, B. Kay, and I. Berger, 2011, Down syndrome and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): *J Child Neurol*, v. 26, p. 1290-5.
- Elton, T. S., S. E. Sansom, and M. M. Martin, 2010, Trisomy-21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins: *RNA Biol*, v. 7, p. 540-7.
- Escorihuela, R. M., A. Fernandez-Teruel, I. F. Vallina, C. Baamonde, M. A. Lumbreras, M. Dierssen, A. Tobena, and J. Florez, 1995, A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model: *Neurosci Lett*, v. 199, p. 143-6.
- Escorihuela, R. M., I. F. Vallina, C. Martinez-Cue, C. Baamonde, M. Dierssen, A. Tobena, J. Florez, and A. Fernandez-Teruel, 1998, Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: *Neurosci Lett*, v. 247, p. 171-4.
- Esposito, G., J. Imitola, J. Lu, D. De Filippis, C. Scuderi, V. S. Ganesh, R. Folkerth, J. Hecht, S. Shin, T. Iuvone, J. Chesnut, L. Steardo, and V. Sheen, 2008, Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury: *Hum Mol Genet*, v. 17, p. 440-57.
- Fernandez, F., W. Morishita, E. Zuniga, J. Nguyen, M. Blank, R. C. Malenka, and C. C. Garner, 2007, Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome: *Nat Neurosci*, v. 10, p. 411-3.

- Fernandez, F., J. C. Trinidad, M. Blank, D. D. Feng, A. L. Burlingame, and C. C. Garner, 2009, Normal protein composition of synapses in Ts65Dn mice: a mouse model of Down syndrome: *J Neurochem*, v. 110, p. 157-69.
- Fernandez-Martinez, J., E. M. Vela, M. Tora-Ponsioen, O. H. Ocana, M. A. Nieto, and J. Galceran, 2009, Attenuation of Notch signalling by the Down-syndrome-associated kinase DYRK1A: *J Cell Sci*, v. 122, p. 1574-83.
- Ferrer, I., and F. Gullotta, 1990, Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus: *Acta Neuropathol*, v. 79, p. 680-5.
- Ferrer, I., M. Barrachina, B. Puig, M. Martinez de Lagran, E. Marti, J. Avila, and M. Dierssen, 2005, Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models: *Neurobiol Dis*, v. 20, p. 392-400.
- Fillat, C., M. Dierssen, M. M. de Lagrán, and X. Altfaj, 2010, Insights from mouse models to understand neurodegeneration in Down syndrome: *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v. 9, p. 429-38.
- Fine, E. J., C. C. Ionita, and L. Lohr, 2002, The history of the development of the cerebellar examination: *Semin Neurol*, v. 22, p. 375-84.
- Fotaki, V., M. Dierssen, S. Alcantara, S. Martinez, E. Marti, C. Casas, J. Visa, E. Soriano, X. Estivill, and M. L. Arbones, 2002, Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice: *Mol Cell Biol*, v. 22, p. 6636-47.
- Fotaki, V., M. Martinez De Lagran, X. Estivill, M. Arbones, and M. Dierssen, 2004, Haploinsufficiency of Dyrk1A in mice leads to specific alterations in the development and regulation of motor activity: *Behav Neurosci*, v. 118, p. 815-21.
- Fukuda, Y., T. L. Berry, M. Nelson, C. L. Hunter, K. Fukuhara, H. Imai, S. Ito, A. C. Granholm-Bentley, A. P. Kaplan, and T. Mutoh, 2010, Stimulated neuronal expression of brain-derived neurotrophic factor by Neurotrophin: *Mol Cell Neurosci*, v. 45, p. 226-33.
- Gahtan, E., J. M. Auerbach, Y. Groner, and M. Segal, 1998, Reversible impairment of long-term potentiation in transgenic Cu/Zn-SOD mice: *Eur J Neurosci*, v. 10, p. 538-44.
- Galli, M., V. Cimolin, P. Patti, D. Ferrario, G. Heaney, G. Albertini, and R. Freedland, 2010, Quantifying established clinical assessment measures using 3D-movement analysis in individuals with Down syndrome: *Disabil Rehabil*, v. 32, p. 1768-74.
- Galliano, E., Z. Gao, M. Schonewille, B. Todorov, E. Simons, A. S. Pop, E. D'Angelo, A. M. van den Maagdenberg, F. E. Hoebeek, and C. I. De Zeeuw, 2013, Silencing the majority of cerebellar granule cells uncovers their essential role in motor learning and consolidation: *Cell Rep*, v. 3, p. 1239-51.
- Gandhi, C. C., R. M. Kelly, R. G. Wiley, and T. J. Walsh, 2000, Impaired acquisition of a Morris water maze task following selective destruction of cerebellar purkinje cells with OX7-saporin: *Behav Brain Res*, v. 109, p. 37-47.
- Gao, Z., B. J. van Beugen, and C. I. De Zeeuw, 2012, Distributed synergistic plasticity and cerebellar learning: *Nat Rev Neurosci*, v. 13, p. 619-35.
- Gardiner, K., 2004, Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models: *Genome Biol*, v. 5, p. 244.

- Garthe, A., and G. Kempermann, 2013, An old test for new neurons: refining the Morris water maze to study the functional relevance of adult hippocampal neurogenesis: *Front Neurosci*, v. 7, p. 63.
- Gockler, N., G. Jofre, C. Papadopoulos, U. Soppa, F. J. Tejedor, and W. Becker, 2009, Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation: *Febs j*, v. 276, p. 6324-37.
- Godridge, H., G. P. Reynolds, C. Czudek, N. A. Calcutt, and M. Benton, 1987, Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue: *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 50, p. 775-8.
- Goldman-Rakic, P. S., 1999, The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia: *Biol Psychiatry*, v. 46, p. 650-61.
- Goosens, K. A., and S. Maren, 2001, Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats: *Learn Mem*, v. 8, p. 148-55.
- Goto, Y., C. R. Yang, and S. Otani, 2010, Functional and dysfunctional synaptic plasticity in prefrontal cortex: roles in psychiatric disorders: *Biol Psychiatry*, v. 67, p. 199-207.
- Granhölm, A. C., L. A. Sanders, and L. S. Crnic, 2000, Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome: *Exp Neurol*, v. 161, p. 647-63.
- Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, S. van Dongen, and A. J. Enright, 2008, miRBase: tools for microRNA genomics: *Nucleic Acids Res*, v. 36, p. D154-8.
- Guedj, F., C. Sebré, I. Rivals, A. Ledru, E. Paly, J. C. Bizot, D. Smith, E. Rubin, B. Gillet, M. Arbones, and J. M. Delabar, 2009, Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A: *PLoS One*, v. 4, p. e4606.
- Guedj, F., P. L. Pereira, S. Najas, M. J. Barallobre, C. Chabert, B. Souchet, C. Sebré, C. Verney, Y. Herault, M. Arbones, and J. M. Delabar, 2012, DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth: *Neurobiol Dis*, v. 46, p. 190-203.
- Guidi, S., P. Bonasoni, C. Ceccarelli, D. Santini, F. Gualtieri, E. Ciani, and R. Bartsaghi, 2008, Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome: *Brain Pathol*, v. 18, p. 180-97.
- Guidi, S., E. Ciani, P. Bonasoni, D. Santini, and R. Bartsaghi, 2011, Widespread proliferation impairment and hypocellularity in the cerebellum of fetuses with down syndrome: *Brain Pathol*, v. 21, p. 361-73.
- Guimera, J., C. Casas, C. Pucharcos, A. Solans, A. Domenech, A. M. Planas, J. Ashley, M. Lovett, X. Estivill, and M. A. Pritchard, 1996, A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region: *Hum Mol Genet*, v. 5, p. 1305-10.
- Guimera, J., C. Casas, X. Estivill, and M. Pritchard, 1999, Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome: *Genomics*, v. 57, p. 407-18.
- Guo, X., J. G. Williams, T. T. Schug, and X. Li, 2010, DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1: *J Biol Chem*, v. 285, p. 13223-32.

- Gutierrez-Castellanos, N., B. H. Winkelman, L. Tolosa-Rodriguez, J. R. De Gruijl, and C. I. De Zeeuw, 2013a, Impact of aging on long-term ocular reflex adaptation: *Neurobiol Aging*, v. 34, p. 2784-92.
- Gutierrez-Castellanos, N., B. H. Winkelman, L. Tolosa-Rodriguez, B. Devenney, R. H. Reeves, and C. I. De Zeeuw, 2013b, Size does not always matter: Ts65Dn Down syndrome mice show cerebellum-dependent motor learning deficits that cannot be rescued by postnatal SAG treatment: *J Neurosci*, v. 33, p. 15408-13.
- Gwack, Y., S. Sharma, J. Nardone, B. Tanasa, A. Iuga, S. Srikanth, H. Okamura, D. Bolton, S. Feske, P. G. Hogan, and A. Rao, 2006, A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT: *Nature*, v. 441, p. 646-50.
- Hammerle, B., A. Carnicero, C. Elizalde, J. Ceron, S. Martinez, and F. J. Tejedor, 2003, Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation: *Eur J Neurosci*, v. 17, p. 2277-86.
- Hammerle, B., C. Elizalde, and F. J. Tejedor, 2008, The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene *Mnb/Dyrk1A* in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development: *Eur J Neurosci*, v. 27, p. 1061-74.
- Hampton, T. G., M. R. Stasko, A. Kale, I. Amende, and A. C. Costa, 2004, Gait dynamics in trisomic mice: quantitative neurological traits of Down syndrome: *Physiol Behav*, v. 82, p. 381-9.
- Hardy, J., 2002, Testing times for the "amyloid cascade hypothesis": *Neurobiol Aging*, v. 23, p. 1073-4.
- Harris-Cerruti, C., A. Kamsler, B. Kaplan, B. Lamb, M. Segal, and Y. Groner, 2004, Functional and morphological alterations in compound transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase and amyloid precursor protein [correction]: *Eur J Neurosci*, v. 19, p. 1174-90.
- Hattori, M., A. Fujiyama, and Y. Sakaki, 2001, [The DNA sequence of human chromosome 21]: *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, v. 46, p. 2254-61.
- He, X. J., Y. Xiao, Q. Zhang, L. P. Ma, N. Li, and J. Yang, 2013, Detection and functional annotation of misregulated microRNAs in the brain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Chin Med J (Engl)*, v. 126, p. 108-13.
- Hibaoui, Y., I. Grad, A. Letourneau, M. R. Sailani, S. Dahoun, F. A. Santoni, S. Gimelli, M. Guipponi, M. F. Pelte, F. Bena, S. E. Antonarakis, and A. Feki, 2014, Modelling and rescuing neurodevelopmental defect of Down syndrome using induced pluripotent stem cells from monozygotic twins discordant for trisomy 21: *EMBO Mol Med*, v. 6, p. 259-77.
- Hijazi, M., C. Fillat, J. M. Medina, and A. Velasco, 2013, Overexpression of DYRK1A inhibits choline acetyltransferase induction by oleic acid in cellular models of Down syndrome: *Exp Neurol*, v. 239, p. 229-34.
- Himpel, S., P. Panzer, K. Eirnbter, H. Czajkowska, M. Sayed, L. C. Packman, T. Blundell, H. Kentrup, J. Grotzinger, H. G. Joost, and W. Becker, 2001, Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A: *Biochem J*, v. 359, p. 497-505.
- Holtzman, D. M., D. Santucci, J. Kilbridge, J. Chua-Couzens, D. J. Fontana, S. E. Daniels, R. M. Johnson, K. Chen, Y. Sun, E. Carlson, E. Alleva, C. J. Epstein, and W. C. Mobley, 1996, Developmental abnormalities and age-related

- neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 13333-8.
- Huang, Y., M. C. Chen-Hwang, G. Dolios, N. Murakami, J. C. Padovan, R. Wang, and Y. W. Hwang, 2004, Mnb/Dyrk1A phosphorylation regulates the interaction of dynamin 1 with SH3 domain-containing proteins: *Biochemistry*, v. 43, p. 10173-85.
- Hunter, C. L., H. A. Bimonte, and A. C. Granholm, 2003, Behavioral comparison of 4 and 6 month-old Ts65Dn mice: age-related impairments in working and reference memory: *Behav Brain Res*, v. 138, p. 121-31.
- Hunter, C. L., D. Bachman, and A. C. Granholm, 2004, Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome: *Ann Neurol*, v. 56, p. 675-88.
- Hyde, L. A., L. S. Crnic, A. Pollock, and P. C. Bickford, 2001, Motor learning in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: *Dev Psychobiol*, v. 38, p. 33-45.
- Ihara, M., N. Yamasaki, A. Hagiwara, A. Tanigaki, A. Kitano, R. Hikawa, H. Tomimoto, M. Noda, M. Takanashi, H. Mori, N. Hattori, T. Miyakawa, and M. Kinoshita, 2007, Sept4, a component of presynaptic scaffold and Lewy bodies, is required for the suppression of alpha-synuclein neurotoxicity: *Neuron*, v. 53, p. 519-33.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, T. Ohtsuka, K. Takao, T. Miyakawa, M. Yamaguchi, K. Mori, T. Ikeda, S. Itoharu, and R. Kageyama, 2008, Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain: *Nat Neurosci*, v. 11, p. 1153-61.
- Insausti, A. M., M. Megias, D. Crespo, L. M. Cruz-Orive, M. Dierssen, I. F. Vallina, R. Insausti, and J. Florez, 1998, Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome: *Neurosci Lett*, v. 253, p. 175-8.
- Jovanovic, S. V., D. Clements, and K. MacLeod, 1998, Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome: *Free Radic Biol Med*, v. 25, p. 1044-8.
- Jung, M. S., J. H. Park, Y. S. Ryu, S. H. Choi, S. H. Yoon, M. Y. Kwen, J. Y. Oh, W. J. Song, and S. H. Chung, 2011, Regulation of RCAN1 protein activity by Dyrk1A protein-mediated phosphorylation: *J Biol Chem*, v. 286, p. 40401-12.
- Kaczmarek, W., M. Barua, B. Mazur-Kolecka, J. Frackowiak, W. Dowjat, P. Mehta, D. Bolton, Y. W. Hwang, A. Rabe, G. Albertini, and J. Wegiel, 2014, Intracellular distribution of differentially phosphorylated dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A): *J Neurosci Res*, v. 92, p. 162-73.
- Kahlem, P., M. Sultan, R. Herwig, M. Steinfath, D. Balzeret, B. Eppens, N. G. Saran, M. T. Pletcher, S. T. South, G. Stetten, H. Lehrach, R. H. Reeves, and M. L. Yaspo, 2004, Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome: *Genome Res*, v. 14, p. 1258-67.
- Kang, C. S., Z. Y. Zhang, Z. F. Jia, G. X. Wang, M. Z. Qiu, H. X. Zhou, S. Z. Yu, J. Chang, H. Jiang, and P. Y. Pu, 2006, Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth in vitro and in vivo: *Cancer Gene Ther*, v. 13, p. 530-8.
- Keck-Wherley, J., D. Grover, S. Bhattacharyya, X. Xu, D. Holman, E. D. Lombardini, R. Verma, R. Biswas, and Z. Galdzicki, 2011, Abnormal microRNA expression in Ts65Dn hippocampus and whole blood: contributions to Down syndrome phenotypes: *Dev Neurosci*, v. 33, p. 451-67.
- Kemp, A., and D. Manahan-Vaughan, 2007, Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes?: *Trends Neurosci*, v. 30, p. 111-8.

- Kim, D., J. Won, D. W. Shin, J. Kang, Y. J. Kim, S. Y. Choi, M. K. Hwang, B. W. Jeong, G. S. Kim, C. O. Joe, S. H. Chung, and W. J. Song, 2004, Regulation of Dyrk1A kinase activity by 14-3-3: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 323, p. 499-504.
- Kim, E. J., J. Y. Sung, H. J. Lee, H. Rhim, M. Hasegawa, T. Iwatsubo, S. Min do, J. Kim, S. R. Paik, and K. C. Chung, 2006, Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation: *J Biol Chem*, v. 281, p. 33250-7.
- Kim, H. S., and Y. H. Suh, 2009, Minocycline and neurodegenerative diseases: *Behav Brain Res*, v. 196, p. 168-79.
- Kim, W. R., O. H. Park, S. Choi, S. Y. Choi, S. K. Park, K. J. Lee, I. J. Rhyu, H. Kim, Y. K. Lee, H. T. Kim, R. W. Oppenheim, and W. Sun, 2009, The maintenance of specific aspects of neuronal function and behavior is dependent on programmed cell death of adult-generated neurons in the dentate gyrus: *Eur J Neurosci*, v. 29, p. 1408-21.
- Kimura, R., K. Kamino, M. Yamamoto, A. Nuripa, T. Kida, H. Kazui, R. Hashimoto, T. Tanaka, T. Kudo, H. Yamagata, Y. Tabara, T. Miki, H. Akatsu, K. Kosaka, E. Funakoshi, K. Nishitomi, G. Sakaguchi, A. Kato, H. Hattori, T. Uema, and M. Takeda, 2007, The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease: *Hum Mol Genet*, v. 16, p. 15-23.
- Kishnani, P. S., J. A. Sullivan, B. K. Walter, G. A. Spiridigliozzi, P. M. Doraiswamy, and K. R. Krishnan, 1999, Cholinergic therapy for Down's syndrome, *Lancet*, v. 353: England, p. 1064-5.
- Kleschevnikov, A. M., P. V. Belichenko, A. J. Villar, C. J. Epstein, R. C. Malenka, and W. C. Mobley, 2004, Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome: *J Neurosci*, v. 24, p. 8153-60.
- Kleschevnikov, A. M., P. V. Belichenko, M. Faizi, L. F. Jacobs, K. Htun, M. Shamloo, and W. C. Mobley, 2012a, Deficits in cognition and synaptic plasticity in a mouse model of Down syndrome ameliorated by GABAB receptor antagonists: *J Neurosci*, v. 32, p. 9217-27.
- Kleschevnikov, A. M., P. V. Belichenko, J. Gall, L. George, R. Nosheny, M. T. Maloney, A. Salehi, and W. C. Mobley, 2012b, Increased efficiency of the GABAA and GABAB receptor-mediated neurotransmission in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Neurobiol Dis*, v. 45, p. 683-91.
- Koo, B. K., S. Blaser, D. Harwood-Nash, L. E. Becker, and E. G. Murphy, 1992, Magnetic resonance imaging evaluation of delayed myelination in Down syndrome: a case report and review of the literature: *J Child Neurol*, v. 7, p. 417-21.
- Korbel, J. O., T. Tirosh-Wagner, A. E. Urban, X. N. Chen, M. Kasowski, L. Dai, F. Grubert, C. Erdman, M. C. Gao, K. Lange, E. M. Sobel, G. M. Barlow, A. S. Aylsworth, N. J. Carpenter, R. D. Clark, M. Y. Cohen, E. Doran, T. Falik-Zaccai, S. O. Lewin, I. T. Lott, B. C. McGillivray, J. B. Moeschler, M. J. Pettenati, S. M. Puschel, K. W. Rao, L. G. Shaffer, M. Shohat, A. J. Van Riper, D. Warburton, S. Weissman, M. B. Gerstein, M. Snyder, and J. R. Korenberg, 2009, The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, p. 12031-6.
- Korenberg, J. R., X. N. Chen, R. Schipper, Z. Sun, R. Gonsky, S. Gerwehr, N. Carpenter, C. Daumer, P. Dignan, C. Disteche, and *et al.*, 1994, Down syndrome phenotypes:

- the consequences of chromosomal imbalance: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, p. 4997-5001.
- Kurabayashi, N., T. Hirota, M. Sakai, K. Sanada, and Y. Fukada, 2010, DYRK1A and glycogen synthase kinase 3 β , a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping: *Mol Cell Biol*, v. 30, p. 1757-68.
- Kurt, M. A., D. C. Davies, M. Kidd, M. Dierssen, and J. Florez, 2000, Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice: *Brain Res*, v. 858, p. 191-7.
- Kurt, M. A., M. I. Kafa, M. Dierssen, and D. C. Davies, 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 Res*, v. 1022, p. 101-9.
- Laguna, A., S. Aranda, M. J. Barallobre, R. Barhoum, E. Fernandez, V. Fotaki, J. M. Delabar, S. de la Luna, P. de la Villa, and M. L. Arbones, 2008, The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development: *Dev Cell*, v. 15, p. 841-53.
- Laguna, A., M. J. Barallobre, M. Marchena, C. Mateus, E. Ramírez, C. Martínez-Cue, J. M. Delabar, M. Castelo-Branco, P. de la Villa, and M. L. Arbonés, 2013, Triplication of DYRK1A causes retinal structural and functional alterations in Down syndrome: *Hum Mol Genet*, v. 22, p. 2775-84.
- Lanfranchi, S., A. Baddeley, S. Gathercole, and R. Vianello, 2012, Working memory in Down syndrome: is there a dual task deficit?: *J Intellect Disabil Res*, v. 56, p. 157-66.
- Latash, M. L., and D. M. Corcos, 1991, Kinematic and electromyographic characteristics of single-joint movements of individuals with Down syndrome: *Am J Ment Retard*, v. 96, p. 189-201.
- Lazzouni, L., and F. Lepore, 2014, Compensatory plasticity: time matters: *Front Hum Neurosci*, v. 8, p. 340.
- Lee, M. S., S. C. Kao, C. A. Lemere, W. Xia, H. C. Tseng, Y. Zhou, R. Neve, M. K. Ahljianian, and L. H. Tsai, 2003, APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation: *J Cell Biol*, v. 163, p. 83-95.
- Lemons, C. J., and D. Fuchs, 2010, Phonological awareness of children with Down syndrome: its role in learning to read and the effectiveness of related interventions: *Res Dev Disabil*, v. 31, p. 316-30.
- Leverenz, J. B., and M. A. Raskind, 1998, Early amyloid deposition in the medial temporal lobe of young Down syndrome patients: a regional quantitative analysis: *Exp Neurol*, v. 150, p. 296-304.
- Li, D., R. A. Jackson, P. Yusoff, and G. R. Guy, 2010, Direct association of Sprouty-related protein with an EVH1 domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A modifies substrate/kinase interactions: *J Biol Chem*, v. 285, p. 35374-85.
- Li, Y. Y., P. N. Alexandrov, A. I. Pogue, Y. Zhao, S. Bhattacharjee, and W. J. Lukiw, 2012, miRNA-155 upregulation and complement factor H deficits in Down's syndrome: *Neuroreport*, v. 23, p. 168-73.
- Lippa, C. F., M. L. Schmidt, V. M. Lee, and J. Q. Trojanowski, 1999, Antibodies to alpha-synuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease: *Ann Neurol*, v. 45, p. 353-7.

- Liu, F., Z. Liang, J. Wegiel, Y. W. Hwang, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, N. Ramakrishna, and C. X. Gong, 2008, Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome: *FASEB J*, v. 22, p. 3224-33.
- Llorens-Martin, M., I. Torres-Aleman, and J. L. Trejo, 2006, Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons: *Hippocampus*, v. 16, p. 480-90.
- Llorens-Martín, M. V., N. Rueda, G. S. Tejeda, J. Flórez, J. L. Trejo, and C. Martínez-Cué, 2010, Effects of voluntary physical exercise on adult hippocampal neurogenesis and behavior of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: *Neuroscience*, v. 171, p. 1228-40.
- Lochhead, P. A., G. Sibbet, N. Morrice, and V. Cleghon, 2005, Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs: *Cell*, v. 121, p. 925-36.
- Lorenzi, H. A., and R. H. Reeves, 2006, Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development: *Brain Res*, v. 1104, p. 153-9.
- Lorenzo, L. P., K. E. Shatynski, S. Clark, P. J. Yarowsky, and M. S. Williams, 2013, Defective thymic progenitor development and mature T-cell responses in a mouse model for Down syndrome: *Immunology*, v. 139, p. 447-58.
- Lott, I. T., and M. Dierssen, 2010, Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome: *Lancet Neurol*, v. 9, p. 623-33.
- Lu, Q. R., T. Sun, Z. Zhu, N. Ma, M. Garcia, C. D. Stiles, and D. H. Rowitch, 2002, Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection: *Cell*, v. 109, p. 75-86.
- Lyle, R., C. Gehrig, C. Neergaard-Henrichsen, S. Deutsch, and S. E. Antonarakis, 2004, Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of down syndrome: *Genome Res*, v. 14, p. 1268-74.
- Lyle, R., F. Bena, S. Gagos, C. Gehrig, G. Lopez, A. Schinzel, J. Lespinasse, A. Bottani, S. Dahoun, L. Taine, M. Doco-Fenzy, P. Cornillet-Lefebvre, A. Pelet, S. Lyonnet, A. Toutain, L. Colleaux, J. Horst, I. Kennerknecht, N. Wakamatsu, M. Descartes, J. C. Franklin, L. Florentin-Arar, S. Kitsiou, E. Ait Yahya-Graison, M. Costantine, P. M. Sinet, J. M. Delabar, and S. E. Antonarakis, 2009, Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21: *Eur J Hum Genet*, v. 17, p. 454-66.
- Maenz, B., P. Hekerman, E. M. Vela, J. Galceran, and W. Becker, 2008, Characterization of the human DYRK1A promoter and its regulation by the transcription factor E2F1: *BMC Mol Biol*, v. 9, p. 30.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, E. J. Nestler, and R. S. Duman, 2000, Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus: *J Neurosci*, v. 20, p. 9104-10.
- Mann, D. M., and T. Iwatsubo, 1996, Diffuse plaques in the cerebellum and corpus striatum in Down's syndrome contain amyloid beta protein (A beta) only in the form of A beta 42(43): *Neurodegeneration*, v. 5, p. 115-20.
- Manto, M. U., 2006, On the cerebello-cerebral interactions: *Cerebellum*, v. 5, p. 286-8.
- Mao, R., X. Wang, E. L. Spitznagel, Jr., L. P. Frelin, J. C. Ting, H. Ding, J. W. Kim, I. Ruczinski, T. J. Downey, and J. Pevsner, 2005, Primary and secondary t

- transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart: *Genome Biol*, v. 6, p. R107.
- Marin-Padilla, M., 1976, Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study: *J Comp Neurol*, v. 167, p. 63-81.
- Marti, E., X. Altafaj, M. Dierssen, S. de la Luna, V. Fotaki, M. Alvarez, M. Perez-Riba, I. Ferrer, and X. Estivill, 2003, Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system: *Brain Res*, v. 964, p. 250-63.
- Martinez de Lagran, M., X. Altafaj, X. Gallego, E. Marti, X. Estivill, I. Sahun, C. Fillat, and M. Dierssen, 2004, Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction: *Neurobiol Dis*, v. 15, p. 132-42.
- Martinez de Lagran, M., A. Bortolozzi, O. Millan, J. D. Gispert, J. R. Gonzalez, M. L. Arbones, F. Artigas, and M. Dierssen, 2007, Dopaminergic deficiency in mice with reduced levels of the dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A, Dyrk1A(+/-): *Genes Brain Behav*, v. 6, p. 569-78.
- Martinez de Lagran, M., R. Benavides-Piccione, I. Ballesteros-Yañez, M. Calvo, M. Morales, C. Fillat, J. Defelipe, G. J. Ramakers, and M. Dierssen, 2012, Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons: *Cereb Cortex*, v. 22, p. 2867-77.
- Martínez-Cué, C., C. Baamonde, M. Lumbreras, J. Paz, M. T. Davisson, C. Schmidt, M. Dierssen, and J. Flórez, 2002, Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: *Behav Brain Res*, v. 134, p. 185-200.
- Martinez-Cue, C., N. Rueda, E. Garcia, M. T. Davisson, C. Schmidt, and J. Florez, 2005, Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: *Behav Brain Res*, v. 163, p. 174-85.
- Martinez-Cue, C., N. Rueda, E. Garcia, and J. Florez, 2006, Anxiety and panic responses to a predator in male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: *Genes Brain Behav*, v. 5, p. 413-22.
- Martínez-Cué, C., P. Martínez, N. Rueda, R. Vidal, S. García, V. Vidal, A. Corrales, J. A. Montero, Á. Pazos, J. Flórez, R. Gasser, A. W. Thomas, M. Honer, F. Knoflach, J. L. Trejo, J. G. Wettstein, and M. C. Hernández, 2013, Reducing GABAA $\alpha 5$ receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of down syndrome: *J Neurosci*, v. 33, p. 3953-66.
- Martínez-Cué, C., B. Delatour, and M. C. Potier, 2014, Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: Use of GABA $\alpha 5$ -selective inverse agonists: *Neurosci Biobehav Rev*.
- Matsuo, R., W. Ochiai, K. Nakashima, and T. Taga, 2001, A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody: *J Immunol Methods*, v. 247, p. 141-51.
- Mazur-Kolecka, B., A. Golabek, E. Kida, A. Rabe, Y. W. Hwang, T. Adayev, J. Wegiel, M. Flory, W. Kaczmarek, E. Marchi, and J. Frackowiak, 2012, Effect of DYRK1A activity inhibition on development of neuronal progenitors isolated from Ts65Dn mice: *J Neurosci Res*, v. 90, p. 999-1010.
- McGaugh, J. L., 2004, The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences: *Annu Rev Neurosci*, v. 27, p. 1-28.

- McKay, S. M., and R. M. Angulo-Barroso, 2006, Longitudinal assessment of leg motor activity and sleep patterns in infants with and without Down syndrome: *Infant Behav Dev*, v. 29, p. 153-68.
- Millan Sanchez, M., S. N. Heyn, D. Das, S. Moghadam, K. J. Martin, and A. Salehi, 2012, Neurobiological elements of cognitive dysfunction in down syndrome: exploring the role of APP: *Biol Psychiatry*, v. 71, p. 403-9.
- Moller, R. S., S. Kubart, M. Hoeltzenbein, B. Heye, I. Vogel, C. P. Hansen, C. Menzel, R. Ullmann, N. Tommerup, H. H. Ropers, Z. Tumer, and V. M. Kalscheuer, 2008, Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly: *Am J Hum Genet*, v. 82, p. 1165-70.
- Morita, K., C. Lo Celso, B. Spencer-Dene, C. C. Zouboulis, and F. M. Watt, 2006, HAN11 binds mDia1 and controls GLI1 transcriptional activity: *J Dermatol Sci*, v. 44, p. 11-20.
- Morris, R. G., P. Garrud, J. N. Rawlins, and J. O'Keefe, 1982, Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions: *Nature*, v. 297, p. 681-3.
- Morris, R. G., F. Schenk, F. Tweedie, and L. E. Jarrard, 1990, Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning: *Eur J Neurosci*, v. 2, p. 1016-1028.
- Murakami, N., W. Xie, R. C. Lu, M. C. Chen-Hwang, A. Wieraszko, and Y. W. Hwang, 2006, Phosphorylation of amphiphysin I by minibrain kinase/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, a kinase implicated in Down syndrome: *J Biol Chem*, v. 281, p. 23712-24.
- Mural, R. J., M. D. Adams, E. W. Myers, H. O. Smith, G. L. Miklos, R. Wides, A. Halpern, P. W. Li, G. G. Sutton, J. Nadeau, S. L. Salzberg, R. A. Holt, C. D. Kodira, F. Lu, L. Chen, Z. Deng, C. C. Evangelista, W. Gan, T. J. Heiman, J. Li, Z. Li, G. V. Merkulov, N. V. Milshina, A. K. Naik, R. Qi, B. C. Shue, A. Wang, J. Wang, X. Wang, X. Yan, J. Ye, S. Yooseph, Q. Zhao, L. Zheng, S. C. Zhu, K. Biddick, R. Bolanos, A. L. Delcher, I. M. Dew, D. Fasulo, M. J. Flanagan, D. H. Huson, S. A. Kravitz, J. R. Miller, C. M. Mobarry, K. Reinert, K. A. Remington, Q. Zhang, X. H. Zheng, D. R. Nusskern, Z. Lai, Y. Lei, W. Zhong, A. Yao, P. Guan, R. R. Ji, Z. Gu, Z. Y. Wang, F. Zhong, C. Xiao, C. C. Chiang, M. Yandell, J. R. Wortman, P. G. Amanatides, S. L. Hladun, E. C. Pratts, J. E. Johnson, K. L. Dodson, K. J. Woodford, C. A. Evans, B. Gropman, D. B. Rusch, E. Venter, M. Wang, T. J. Smith, J. T. Houck, D. E. Tompkins, C. Haynes, D. Jacob, S. H. Chin, D. R. Allen, C. E. Dahlke, R. Sanders, K. Li, X. Liu, A. A. Levitsky, W. H. Majoros, Q. Chen, A. C. Xia, J. R. Lopez, M. T. Donnelly, M. H. Newman, A. Glodek, C. L. Kraft, M. Nodell, F. Ali, H. J. An, D. Baldwin-Pitts, K. Y. Beeson, S. Cai, *et al.*, 2002, A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome: *Science*, v. 296, p. 1661-71.
- Nadel, L., 2003, Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective: *Genes Brain Behav*, v. 2, p. 156-66.
- Nash, H., and J. Heath, 2011, The role of vocabulary, working memory and inference making ability in reading comprehension in Down syndrome: *Res Dev Disabil*, v. 32, p. 1782-91.
- Necchi, D., S. Lomoio, and E. Scherini, 2008, Axonal abnormalities in cerebellar Purkinje cells of the Ts65Dn mouse: *Brain Res*, v. 1238, p. 181-8.
- Netzer, W. J., C. Powell, Y. Nong, J. Blundell, L. Wong, K. Duff, M. Flajolet, and P. Greengard, 2010, Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model: *PLoS One*, v. 5, p. e10943.

- Nishizawa, Y., T. Fujita, K. Matsuoka, and H. Nakagawa, 2006, Contact pressure distribution features in Down syndrome infants in supine and prone positions, analyzed by photoelastic methods: *Pediatr Int*, v. 48, p. 484-8.
- O'Doherty, A., S. Ruf, C. Mulligan, V. Hildreth, M. L. Errington, S. Cooke, A. Sesay, S. Modino, L. Vanes, D. Hernandez, J. M. Linehan, P. T. Sharpe, S. Brandner, T. V. Bliss, D. J. Henderson, D. Nizetic, V. L. Tybulewicz, and E. M. Fisher, 2005, An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes: *Science*, v. 309, p. 2033-7.
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari, and F. M. LaFerla, 2003, Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction: *Neuron*, v. 39, p. 409-21.
- Ofen, N., Y. C. Kao, P. Sokol-Hessner, H. Kim, S. Whitfield-Gabrieli, and J. D. Gabrieli, 2007, Development of the declarative memory system in the human brain: *Nat Neurosci*, v. 10, p. 1198-205.
- Olson, L. E., R. J. Roper, C. L. Sengstaken, E. A. Peterson, V. Aquino, Z. Galdzicki, R. Siarey, M. Pletnikov, T. H. Moran, and R. H. Reeves, 2007, Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice: *Hum Mol Genet*, v. 16, p. 774-82.
- Olton, D. S., and B. C. Papas, 1979, Spatial memory and hippocampal function: *Neuropsychologia*, v. 17, p. 669-82.
- Ortiz-Abalia, J., I. Sahún, X. Altafaj, N. Andreu, X. Estivill, M. Dierssen, and C. Fillat, 2008, Targeting Dyrk1A with AAVshRNA attenuates motor alterations in TgDyrk1A, a mouse model of Down syndrome: *Am J Hum Genet*, v. 83, p. 479-88.
- Papoulidis, I., E. Papageorgiou, E. Siomou, E. Oikonomidou, L. Thomaidis, A. Vetro, O. Zuffardi, T. Liehr, E. Manolakos, and P. Vassilis, 2014, A patient with partial trisomy 21 and 7q deletion expresses mild Down syndrome phenotype: *Gene*, v. 536, p. 441-3.
- Park, J., E. J. Yang, J. H. Yoon, and K. C. Chung, 2007, Dyrk1A overexpression in immortalized hippocampal cells produces the neuropathological features of Down syndrome: *Mol Cell Neurosci*, v. 36, p. 270-9.
- Park, J., Y. Oh, L. Yoo, M. S. Jung, W. J. Song, S. H. Lee, H. Seo, and K. C. Chung, 2010, Dyrk1A phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells: *J Biol Chem*, v. 285, p. 31895-906.
- Park, J., J. Y. Sung, W. J. Song, S. Chang, and K. C. Chung, 2012a, Dyrk1A negatively regulates the actin cytoskeleton through threonine phosphorylation of N-WASP: *J Cell Sci*, v. 125, p. 67-80.
- Park, J. H., M. S. Jung, Y. S. Kim, W. J. Song, and S. H. Chung, 2012b, Phosphorylation of Munc18-1 by Dyrk1A regulates its interaction with Syntaxin 1 and X11alpha: *J Neurochem*, v. 122, p. 1081-91.
- Park, J., and K. C. Chung, 2013, New Perspectives of Dyrk1A Role in Neurogenesis and Neuropathologic Features of Down Syndrome: *Exp Neurobiol*, v. 22, p. 244-8.
- Patterson, D., 2009, Molecular genetic analysis of Down syndrome: *Hum Genet*, v. 126, p. 195-214.
- Paz-Miguel, J. E., R. Flores, P. Sanchez-Velasco, G. Ocejó-Vinyals, J. Escribano de Diego, J. Lopez de Rego, and F. Leyva-Cobian, 1999, Reactive oxygen intermediates

- during programmed cell death induced in the thymus of the Ts(1716)65Dn mouse, a murine model for human Down's syndrome: *J Immunol*, v. 163, p. 5399-410.
- Pereira, K., R. P. Basso, A. R. Lindquist, L. G. da Silva, and E. Tudella, 2013, Infants with Down syndrome: percentage and age for acquisition of gross motor skills: *Res Dev Disabil*, v. 34, p. 894-901.
- Pereira, P. L., L. Magnol, I. Sahun, V. Brault, A. Duchon, P. Prandini, A. Gruart, J. C. Bizot, B. Chadeaux-Vekemans, S. Deutsch, F. Trovero, J. M. Delgado-Garcia, S. E. Antonarakis, M. Dierssen, and Y. Herault, 2009, A new mouse model for the trisomy of the *Abcg1-U2af1* region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of down syndrome: *Hum Mol Genet*, v. 18, p. 4756-69.
- Perez-Cremades, D., S. Hernandez, J. M. Blasco-Ibanez, C. Crespo, J. Nacher, and E. Varea, 2010, Alteration of inhibitory circuits in the somatosensory cortex of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome: *J Neural Transm*, v. 117, p. 445-55.
- Petrosini, L., M. Molinari, and M. E. Dell'Anna, 1996, Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze: *Eur J Neurosci*, v. 8, p. 1882-96.
- Pinal, C. S., and A. J. Tobin, 1998, Uniqueness and redundancy in GABA production: *Perspect Dev Neurobiol*, v. 5, p. 109-18.
- Pollonini, G., V. Gao, A. Rabe, S. Palmiello, G. Albertini, and C. M. Alberini, 2008, Abnormal expression of synaptic proteins and neurotrophin-3 in the Down syndrome mouse model Ts65Dn: *Neuroscience*, v. 156, p. 99-106.
- Popov, V. I., A. M. Kleschevnikov, O. A. Klimenko, M. G. Stewart, and P. V. Belichenko, 2011, Three-dimensional synaptic ultrastructure in the dentate gyrus and hippocampal area CA3 in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *J Comp Neurol*, v. 519, p. 1338-54.
- Porta, S., E. Marti, S. de la Luna, and M. L. Arbones, 2007, Differential expression of members of the RCAN family of calcineurin regulators suggests selective functions for these proteins in the brain: *Eur J Neurosci*, v. 26, p. 1213-26.
- Porter, M. A., M. Coltheart, and R. Langdon, 2007, The neuropsychological basis of hypersociability in Williams and Down syndrome: *Neuropsychologia*, v. 45, p. 2839-49.
- Prandini, P., S. Deutsch, R. Lyle, M. Gagnebin, C. Delucinge Vivier, M. Delorenzi, C. Gehrig, P. Descombes, S. Sherman, F. Dagna Bricarelli, C. Baldo, A. Novelli, B. Dallapiccola, and S. E. Antonarakis, 2007, Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance: *Am J Hum Genet*, v. 81, p. 252-63.
- Prinz, M., B. Prinz, and E. Schulz, 1997, The growth of non-pyramidal neurons in the primary motor cortex of man: a Golgi study: *Histol Histopathol*, v. 12, p. 895-900.
- Pritchard, M. A., and I. Kola, 1999, The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome: *J Neural Transm Suppl*, v. 57, p. 293-303.
- Qian, W., N. Jin, J. Shi, X. Yin, X. Jin, S. Wang, M. Cao, K. Iqbal, C. X. Gong, and F. Liu, 2013, Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (*Dyrk1A*) enhances tau expression: *J Alzheimers Dis*, v. 37, p. 529-38.
- Rachidi, M., C. Lopes, C. Vayssettes, D. J. Smith, E. M. Rubin, and J. M. Delabar, 2007, New cerebellar phenotypes in YAC transgenic mouse in vivo library of human

- Down syndrome critical region-1: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 364, p. 488-94.
- Rahmani, Z., J. L. Blouin, N. Creau-Goldberg, P. C. Watkins, J. F. Mattei, M. Poissonnier, M. Prieur, Z. Chettouh, A. Nicole, A. Aurias, and *et al.*, 1989, Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, p. 5958-62.
- Rechsteiner, M., and S. W. Rogers, 1996, PEST sequences and regulation by proteolysis: *Trends Biochem Sci*, v. 21, p. 267-71.
- Reeves, R. H., N. G. Irving, T. H. Moran, A. Wohn, C. Kitt, S. S. Sisodia, C. Schmidt, R. T. Bronson, and M. T. Davisson, 1995, A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits: *Nat Genet*, v. 11, p. 177-84.
- Reeves, R. H., 2000, Recounting a genetic story: *Nature*, v. 405, p. 283-4.
- Reeves, R. H., 2001, Down's syndrome. A complicated genetic insult: *Lancet*, v. 358 Suppl, p. S23.
- Richtsmeier, J. T., A. Zumwalt, E. J. Carlson, C. J. Epstein, and R. H. Reeves, 2002, Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome: *Am J Med Genet*, v. 107, p. 317-24.
- Risser, D., G. Lubec, N. Cairns, and M. Herrera-Marschitz, 1997, Excitatory amino acids and monoamines in parahippocampal gyrus and frontal cortical pole of adults with Down syndrome: *Life Sci*, v. 60, p. 1231-7.
- Rocheffort, C., J. M. Lefort, and L. Rondi-Reig, 2013, The cerebellum: a new key structure in the navigation system: *Front Neural Circuits*, v. 7, p. 35.
- Roizen, N. J., and D. Patterson, 2003, Down's syndrome: *Lancet*, v. 361, p. 1281-9.
- Roper, R. J., and R. H. Reeves, 2006, Understanding the basis for Down syndrome phenotypes: *PLoS Genet*, v. 2, p. e50.
- Roper, R. J., L. L. Baxter, N. G. Saran, D. K. Klinedinst, P. A. Beachy, and R. H. Reeves, 2006a, Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down [corrected] syndrome mice: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 1452-6.
- Roper, R. J., H. K. St John, J. Philip, A. Lawler, and R. H. Reeves, 2006b, Perinatal loss of Ts65Dn Down syndrome mice: *Genetics*, v. 172, p. 437-43.
- Rueda, N., R. Mostany, A. Pazos, J. Florez, and C. Martínez-Cue, 2005, Cell proliferation is reduced in the dentate gyrus of aged but not young Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: *Neurosci Lett*, v. 380, p. 197-201.
- Rueda, N., M. Llorens-Martín, J. Flórez, E. Valdizán, P. Banerjee, J. L. Trejo, and C. Martínez-Cué, 2010, Memantine normalizes several phenotypic features in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *J Alzheimers Dis*, v. 21, p. 277-90.
- Rueda, N., J. Flórez, and C. Martínez-Cué, 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: *Int J Dev Neurosci*, v. 29, p. 711-6.
- Rueda, N., J. Flórez, and C. Martínez-Cué, 2012, Mouse models of Down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities: *Neural Plast*, v. 2012, p. 584071.
- Rueda, N., J. Flórez, and C. Martínez-Cué, 2013, Apoptosis in Down's syndrome: lessons from studies of human and mouse models: *Apoptosis*, v. 18, p. 121-34.
- Rumble, B., R. Retallack, C. Hilbich, G. Simms, G. Multhaup, R. Martins, A. Hockey, P. Montgomery, K. Beyreuther, and C. L. Masters, 1989, Amyloid A4 protein and

- its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease: *N Engl J Med*, v. 320, p. 1446-52.
- Ryoo, S. R., H. K. Jeong, C. Radnaabazar, J. J. Yoo, H. J. Cho, H. W. Lee, I. S. Kim, Y. H. Cheon, Y. S. Ahn, S. H. Chung, and W. J. Song, 2007, DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease: *J Biol Chem*, v. 282, p. 34850-7.
- Ryoo, S. R., H. J. Cho, H. W. Lee, H. K. Jeong, C. Radnaabazar, Y. S. Kim, M. J. Kim, M. Y. Son, H. Seo, S. H. Chung, and W. J. Song, 2008, Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease: *J Neurochem*, v. 104, p. 1333-44.
- Ryu, Y. S., S. Y. Park, M. S. Jung, S. H. Yoon, M. Y. Kwen, S. Y. Lee, S. H. Choi, C. Radnaabazar, M. K. Kim, H. Kim, K. Kim, W. J. Song, and S. H. Chung, 2010, Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease: *J Neurochem*, v. 115, p. 574-84.
- Sago, H., E. J. Carlson, D. J. Smith, J. Kilbridge, E. M. Rubin, W. C. Mobley, C. J. Epstein, and T. T. Huang, 1998, Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 6256-61.
- Sago, H., E. J. Carlson, D. J. Smith, E. M. Rubin, L. S. Crnic, T. T. Huang, and C. J. Epstein, 2000, Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome: *Pediatr Res*, v. 48, p. 606-13.
- Sango, K., S. Yamanaka, A. Hoffmann, Y. Okuda, A. Grinberg, H. Westphal, M. P. McDonald, J. N. Crawley, K. Sandhoff, K. Suzuki, and R. L. Proia, 1995, Mouse models of Tay-Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism: *Nat Genet*, v. 11, p. 170-6.
- Salehi, A., J. D. Delcroix, P. V. Belichenko, K. Zhan, C. Wu, J. S. Valletta, R. Takimoto-Kimura, A. M. Kleschevnikov, K. Sambamurti, P. P. Chung, W. Xia, A. Villar, W. A. Campbell, L. S. Kulnane, R. A. Nixon, B. T. Lamb, C. J. Epstein, G. B. Stokin, L. S. Goldstein, and W. C. Mobley, 2006, Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration: *Neuron*, v. 51, p. 29-42.
- Salehi, A., M. Faizi, D. Colas, J. Valletta, J. Laguna, R. Takimoto-Kimura, A. Kleschevnikov, S. L. Wagner, P. Aisen, M. Shamloo, and W. C. Mobley, 2009, Restoration of norepinephrine-modulated contextual memory in a mouse model of Down syndrome: *Sci Transl Med*, v. 1, p. 7ra17.
- Sanchez-Mut, J. V., D. Huertas, and M. Esteller, 2012, Aberrant epigenetic landscape in intellectual disability: *Prog Brain Res*, v. 197, p. 53-71.
- Saran, N. G., M. T. Pletcher, J. E. Natale, Y. Cheng, and R. H. Reeves, 2003, Global disruption of the cerebellar transcriptome in a Down syndrome mouse model: *Hum Mol Genet*, v. 12, p. 2013-9.
- Scales, T. M., S. Lin, M. Kraus, R. G. Goold, and P. R. Gordon-Weeks, 2009, Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons: *J Cell Sci*, v. 122, p. 2424-35.
- Schebesta, M., and F. C. Serluca, 2009, olig1 Expression identifies developing oligodendrocytes in zebrafish and requires hedgehog and notch signaling: *Dev Dyn*, v. 238, p. 887-98.

- Schliebs, R., and T. Arendt, 2011, The cholinergic system in aging and neuronal degeneration: *Behav Brain Res*, v. 221, p. 555-63.
- Schmahmann, J. D., 2004, Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome: *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, v. 16, p. 367-78.
- Schupf, N., and G. H. Sergievsky, 2002, Genetic and host factors for dementia in Down's syndrome: *Br J Psychiatry*, v. 180, p. 405-10.
- Schupf, N., D. Pang, B. N. Patel, W. Silverman, R. Schubert, F. Lai, J. K. Kline, Y. Stern, M. Ferin, B. Tycko, and R. Mayeux, 2003, Onset of dementia is associated with age at menopause in women with Down's syndrome: *Ann Neurol*, v. 54, p. 433-8.
- Schupf, N., S. Winsten, B. Patel, D. Pang, M. Ferin, W. B. Zigman, W. Silverman, and R. Mayeux, 2006, Bioavailable estradiol and age at onset of Alzheimer's disease in postmenopausal women with Down syndrome: *Neurosci Lett*, v. 406, p. 298-302.
- Seamans, J. K., S. B. Floresco, and A. G. Phillips, 1995, Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex: *Behav Neurosci*, v. 109, p. 1063-73.
- Sebrie, C., C. Chabert, A. Ledru, F. Guedj, C. Po, D. J. Smith, E. Rubin, I. Rivals, J. C. Beloeil, B. Gillet, and J. M. Delabar, 2008, Increased dosage of DYRK1A and brain volumetric alterations in a YAC model of partial trisomy 21: *Anat Rec (Hoboken)*, v. 291, p. 254-62.
- Seifert, A., L. A. Allan, and P. R. Clarke, 2008, DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine: *Febs j*, v. 275, p. 6268-80.
- Seo, H., and O. Isacson, 2005, Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice: *Exp Neurol*, v. 193, p. 469-80.
- Shapiro, B. L., 1989, The pathogenesis of aneuploid phenotypes: the fallacy of explanatory reductionism: *Am J Med Genet*, v. 33, p. 146-51.
- Shapiro, B. L., 2001, Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome: *J Neural Transm Suppl*, p. 11-34.
- Sheppard, O., F. Plattner, A. Rubin, A. Slender, J. M. Linehan, S. Brandner, V. L. Tybulewicz, E. M. Fisher, and F. K. Wiseman, 2012, Altered regulation of tau phosphorylation in a mouse model of down syndrome aging: *Neurobiol Aging*, v. 33, p. 828.e31-44.
- Shi, J., T. Zhang, C. Zhou, M. O. Chohan, X. Gu, J. Wegiel, J. Zhou, Y. W. Hwang, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, C. X. Gong, and F. Liu, 2008, Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome: *J Biol Chem*, v. 283, p. 28660-9.
- Shin, M., L. M. Besser, J. E. Kucik, C. Lu, C. Siffel, and A. Correa, 2009, Prevalence of Down syndrome among children and adolescents in 10 regions of the United States: *Pediatrics*, v. 124, p. 1565-71.
- Shors, T. J., G. Miesegaes, A. Beylin, M. Zhao, T. Rydel, and E. Gould, 2001, Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories: *Nature*, v. 410, p. 372-6.
- Shors, T. J., D. A. Townsend, M. Zhao, Y. Kozorovitskiy, and E. Gould, 2002, Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning: *Hippocampus*, v. 12, p. 578-84.

- Siarey, R. J., J. Stoll, S. I. Rapoport, and Z. Galdzicki, 1997, Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down Syndrome: *Neuropharmacology*, v. 36, p. 1549-54.
- Siarey, R. J., E. J. Carlson, C. J. Epstein, A. Balbo, S. I. Rapoport, and Z. Galdzicki, 1999, Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome: *Neuropharmacology*, v. 38, p. 1917-20.
- Siarey, R. J., A. Kline-Burgess, M. Cho, A. Balbo, T. K. Best, C. Harashima, E. Klann, and Z. Galdzicki, 2006, Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *J Neurochem*, v. 98, p. 1266-77.
- Siew, W. H., K. L. Tan, M. A. Babaei, P. S. Cheah, and K. H. Ling, 2013, MicroRNAs and intellectual disability (ID) in Down syndrome, X-linked ID, and Fragile X syndrome: *Front Cell Neurosci*, v. 7, p. 41.
- Sitz, J. H., K. Baumgartel, B. Hammerle, C. Papadopoulos, P. Hekerman, F. J. Tejedor, W. Becker, and B. Lutz, 2008, The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4: *Neuroscience*, v. 157, p. 596-605.
- Sitz, J. H., M. Tigges, K. Baumgartel, L. G. Khaspekov, and B. Lutz, 2004, Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4: *Mol Cell Biol*, v. 24, p. 5821-34.
- Skurat, A. V., and A. D. Dietrich, 2004, Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases: *J Biol Chem*, v. 279, p. 2490-8.
- Smith, D. J., Y. Zhu, J. Zhang, J. F. Cheng, and E. M. Rubin, 1995, Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2: *Genomics*, v. 27, p. 425-34.
- Smith, D. J., M. E. Stevens, S. P. Sudanagunta, R. T. Bronson, M. Makhinson, A. M. Watabe, T. J. O'Dell, J. Fung, H. U. Weier, J. F. Cheng, and E. M. Rubin, 1997, Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome: *Nat Genet*, v. 16, p. 28-36.
- Sommer, C. A., E. C. Pavarino-Bertelli, E. M. Goloni-Bertollo, and F. Henrique-Silva, 2008, Identification of dysregulated genes in lymphocytes from children with Down syndrome: *Genome*, v. 51, p. 19-29.
- Song, W. J., L. R. Sternberg, C. Kasten-Sportes, M. L. Keuren, S. H. Chung, A. C. Slack, D. E. Miller, T. W. Glover, P. W. Chiang, L. Lou, and D. M. Kurnit, 1996, Isolation of human and murine homologues of the *Drosophila* minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region": *Genomics*, v. 38, p. 331-9.
- Song, W. J., E. A. Song, S. H. Choi, H. H. Baik, B. K. Jin, J. H. Kim, and S. H. Chung, 2013, Dyrk1A-mediated phosphorylation of RCAN1 promotes the formation of insoluble RCAN1 aggregates: *Neurosci Lett*, v. 554, p. 135-40.
- Soppa, U., J. Schumacher, V. Florencio Ortiz, T. Pasqualon, F. J. Tejedor, and W. Becker, 2014, The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation: *Cell Cycle*, v. 13, p. 2084-100.
- Souchet, B., F. Guedj, I. Sahún, A. Duchon, F. Daubigney, A. Badel, Y. Yanagawa, M. J. Barallobre, M. Dierssen, E. Yu, Y. Herault, M. Arbones, N. Janel, N. Créau, and J.

- M. Delabar, 2014, Excitation/inhibition balance and learning are modified by Dyrk1a gene dosage: *Neurobiol Dis*, v. 69C, p. 65-75.
- Sterio, D. C., 1984, The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector: *J Microsc*, v. 134, p. 127-36.
- Stewart, L. S., M. A. Persinger, M. A. Cortez, and O. C. Snead, 3rd, 2007, Chronobiometry of behavioral activity in the Ts65Dn model of Down syndrome: *Behav Genet*, v. 37, p. 388-98.
- Stasko, M. R., and A. C. Costa, 2004, Experimental parameters affecting the Morris water maze performance of a mouse model of Down syndrome: *Behav Brain Res*, v. 154, p. 1-17.
- Strick, P. L., R. P. Dum, and J. A. Fiez, 2009, Cerebellum and nonmotor function: *Annu Rev Neurosci*, v. 32, p. 413-34.
- Stuchlik, A., 2014, Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update: *Front Behav Neurosci*, v. 8, p. 106.
- Sturgeon, X., and K. J. Gardiner, 2011, Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions: *Mamm Genome*, v. 22, p. 261-71.
- Suetsugu, M., and P. Mehraein, 1980, Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study: *Acta Neuropathol*, v. 50, p. 207-10.
- Sultan, M., I. Piccini, D. Balzereit, R. Herwig, N. G. Saran, H. Lehrach, R. H. Reeves, and M. L. Yaspo, 2007, Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes: *Genome Biol*, v. 8, p. R91.
- Sumarsono, S. H., T. J. Wilson, M. J. Tymms, D. J. Venter, C. M. Corrick, R. Kola, M. H. Lahoud, T. S. Papas, A. Seth, and I. Kola, 1996, Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice: *Nature*, v. 379, p. 534-7.
- Takashima, S., L. E. Becker, D. L. Armstrong, and F. Chan, 1981, Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study: *Brain Res*, v. 225, p. 1-21.
- Takashima, S., A. Ieshima, H. Nakamura, and L. E. Becker, 1989, Dendrites, dementia and the Down syndrome: *Brain Dev*, v. 11, p. 131-3.
- Takebayashi, H., S. Yoshida, M. Sugimori, H. Kosako, R. Kominami, M. Nakafuku, and Y. Nabeshima, 2000, Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3: *Mech Dev*, v. 99, p. 143-8.
- Teipel, S. J., M. B. Schapiro, G. E. Alexander, J. S. Krasuski, B. Horwitz, C. Hoehne, H. J. Moller, S. I. Rapoport, and H. Hampel, 2003, Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome: *Am J Psychiatry*, v. 160, p. 1870-8.
- Tejedor, F., X. R. Zhu, E. Kaltenbach, A. Ackermann, A. Baumann, I. Canal, M. Heisenberg, K. F. Fischbach, and O. Pongs, 1995, minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*: *Neuron*, v. 14, p. 287-301.
- Teipel, S. J., G. E. Alexander, M. B. Schapiro, H. J. Moller, S. I. Rapoport, and H. Hampel, 2004, Age-related cortical grey matter reductions in non-demented Down's syndrome adults determined by MRI with voxel-based morphometry: *Brain*, v. 127, p. 811-24.

- Tejedor, F. J., and B. Hammerle, 2011, MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development: *Febs j*, v. 278, p. 223-35.
- Thomazeau, A., O. Lassalle, J. lafrati, B. Souchet, F. Guedj, N. Janel, P. Chavis, J. Delabar, and O. J. Manzoni, 2014, Prefrontal deficits in a murine model overexpressing the down syndrome candidate gene *dyrk1a*: *J Neurosci*, v. 34, p. 1138-47.
- Tiso, N., A. Filippi, F. Benato, E. Negrisol, N. Modena, E. Vaccari, W. Driever, and F. Argenton, 2009, Differential expression and regulation of olig genes in zebrafish: *J Comp Neurol*, v. 515, p. 378-96.
- Toiber, D., G. Azkona, S. Ben-Ari, N. Torán, H. Soreq, and M. Dierssen, 2010, Engineering DYRK1A overdosage yields Down syndrome-characteristic cortical splicing aberrations: *Neurobiol Dis*, v. 40, p. 348-59.
- Trazzi, S., V. M. Mitrugno, E. Valli, C. Fuchs, S. Rizzi, S. Guidi, G. Perini, R. Bartesaghi, and E. Ciani, 2011, APP-dependent up-regulation of *Ptch1* underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome: *Hum Mol Genet*, v. 20, p. 1560-73.
- Treit, D., J. Menard, and C. Royan, 1993, Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze: *Pharmacol Biochem Behav*, v. 44, p. 463-9.
- Trejo, J. L., J. Piriz, M. V. Llorens-Martin, A. M. Fernandez, M. Bolos, D. LeRoith, A. Nunez, and I. Torres-Aleman, 2007, Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects: *Mol Psychiatry*, v. 12, p. 1118-28.
- Tudella, E., K. Pereira, R. P. Basso, and G. J. Savelsbergh, 2011, Description of the motor development of 3-12 month old infants with Down syndrome: the influence of the postural body position: *Res Dev Disabil*, v. 32, p. 1514-20.
- Vicari, S., S. Bellucci, and G. A. Carlesimo, 2000, Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome: *Neuropsychologia*, v. 38, p. 240-51.
- Vicari, S., 2006, Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome: *Behav Genet*, v. 36, p. 355-64.
- Vidal, V., S. García, P. Martínez, A. Corrales, J. Flórez, N. Rueda, A. Sharma, and C. Martínez-Cué, 2012, Lack of behavioral and cognitive effects of chronic ethosuximide and gabapentin treatment in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Neuroscience*, v. 220, p. 158-68.
- Villar, A. J., P. V. Belichenko, A. M. Gillespie, H. M. Kozy, W. C. Mobley, and C. J. Epstein, 2005, Identification and characterization of a new Down syndrome model, Ts[Rb(12.1716)]2Cje, resulting from a spontaneous Robertsonian fusion between T(171)65Dn and mouse chromosome 12: *Mamm Genome*, v. 16, p. 79-90.
- Vingtdeux, V., M. Hamdane, M. Gompel, S. Begard, H. Drobecq, A. Ghestem, M. E. Grosjean, V. Kostanjevecki, P. Grognet, E. Vanmechelen, L. Buee, A. Delacourte, and N. Sergeant, 2005, Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism: *Neurobiol Dis*, v. 20, p. 625-37.
- Voikar, V., S. Koks, E. Vasar, and H. Rauvala, 2001, Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies: *Physiol Behav*, v. 72, p. 271-81.

- von Groote-Bidlingmaier, F., D. Schmoll, H. M. Orth, H. G. Joost, W. Becker, and A. Barthel, 2003, DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 300, p. 764-9.
- Vuksic, M., Z. Petanjek, M. R. Rasin, and I. Kostovic, 2002, Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome: *Pediatr Neurol*, v. 27, p. 36-8.
- Wallace, V. A., 1999, Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum: *Curr Biol*, v. 9, p. 445-8.
- Wang, G. W., and J. X. Cai, 2006, Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats: *Behav Brain Res*, v. 175, p. 329-36.
- Webb, R. L., and M. P. Murphy, 2012, beta-Secretases, Alzheimer's Disease, and Down Syndrome: *Curr Gerontol Geriatr Res*, v. 2012, p. 362839.
- Wechsler-Reya, R. J., and M. P. Scott, 1999, Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog: *Neuron*, v. 22, p. 103-14.
- Wegiel, J., I. Kuchna, K. Nowicki, J. Frackowiak, K. Dowjat, W. P. Silverman, B. Reisberg, M. DeLeon, T. Wisniewski, T. Adayev, M. C. Chen-Hwang, and Y. W. Hwang, 2004, Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain: *Brain Res*, v. 1010, p. 69-80.
- Wegiel, J., C. X. Gong, and Y. W. Hwang, 2011, The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases: *Febs j*, v. 278, p. 236-45.
- West, M. J., and H. J. Gundersen, 1990, Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus: *J Comp Neurol*, v. 296, p. 1-22.
- Whittle, N., S. B. Sartori, M. Dierssen, G. Lubec, and N. Singewald, 2007, Fetal Down syndrome brains exhibit aberrant levels of neurotransmitters critical for normal brain development: *Pediatrics*, v. 120, p. e1465-71.
- Wilcock, D. M., and W. S. Griffin, 2013, Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis: *J Neuroinflammation*, v. 10, p. 84.
- Wisniewski, K. E., H. M. Wisniewski, and G. Y. Wen, 1985, Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome: *Ann Neurol*, v. 17, p. 278-82.
- Wisniewski, H. M., and A. Rabe, 1986, Discrepancy between Alzheimer-type neuropathology and dementia in persons with Down's syndrome: *Ann N Y Acad Sci*, v. 477, p. 247-60.
- Wisniewski, K. E., and B. Schmidt-Sidor, 1989, Postnatal delay of myelin formation in brains from Down syndrome infants and children: *Clin Neuropathol*, v. 8, p. 55-62.
- Woods, Y. L., P. Cohen, W. Becker, R. Jakes, M. Goedert, X. Wang, and C. G. Proud, 2001, The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase: *Biochem J*, v. 355, p. 609-15.
- Xie, W., N. Ramakrishna, A. Wieraszko, and Y. W. Hwang, 2008, Promotion of neuronal plasticity by (-)-epigallocatechin-3-gallate: *Neurochem Res*, v. 33, p. 776-83.
- Yang, E. J., Y. S. Ahn, and K. C. Chung, 2001, Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells: *J Biol Chem*, v. 276, p. 39819-24.

- Yeo, W., and J. Gautier, 2004, Early neural cell death: dying to become neurons: *Dev Biol*, v. 274, p. 233-44.
- Yu, T., Z. Li, Z. Jia, S. J. Clapcote, C. Liu, S. Li, S. Asrar, A. Pao, R. Chen, N. Fan, S. Carattini-Rivera, A. R. Bechard, S. Spring, R. M. Henkelman, G. Stoica, S. Matsui, N. J. Nowak, J. C. Roder, C. Chen, A. Bradley, and Y. E. Yu, 2010a, A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions: *Hum Mol Genet*, v. 19, p. 2780-91.
- Yu, T., C. Liu, P. Belichenko, S. J. Clapcote, S. Li, A. Pao, A. Kleschevnikov, A. R. Bechard, S. Asrar, R. Chen, N. Fan, Z. Zhou, Z. Jia, C. Chen, J. C. Roder, B. Liu, A. Baldini, W. C. Mobley, and Y. E. Yu, 2010b, Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice: *Brain Res*, v. 1366, p. 162-71.
- Zelazo, P. D., J. A. Burack, E. Benedetto, and D. Frye, 1996, Theory of mind and rule use in individuals with Down's syndrome: a test of the uniqueness and specificity claims: *J Child Psychol Psychiatry*, v. 37, p. 479-84.
- Zhou, Q., and D. J. Anderson, 2002, The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification: *Cell*, v. 109, p. 61-73.
- Zigman, W. B., and I. T. Lott, 2007, Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk: *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, v. 13, p. 237-46
- .

