



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

**Efecto de la administración de moduladores alostéricos
negativos selectivos para la subunidad GABA_Aα5 sobre los
procesos cognitivos implicados en las alteraciones de
aprendizaje y memoria de un modelo de síndrome de Down**

**Tesis Doctoral presentada por M^a Ángeles Diego Mantecón para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria**

Santander, abril 2017



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología y Farmacología

Dña. Carmen Martínez-Cué Pesini, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria y **D. José Antonio del Barrio del Campo**, Profesor Titular de Psicología de la Personalidad, Evaluación y Tratamientos Psicológicos, del Departamento de Educación de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICAN:

Que **Dña. M^ª Ángeles Diego Mantecón** ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Efecto de la administración de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA_Aα5 sobre los procesos cognitivos implicados en las alteraciones de aprendizaje y memoria de un modelo de síndrome de Down”.

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

Santander, 17 de abril de 2017.

Fdo. Carmen Martínez-Cué Pesini

Fdo. José Antonio del Barrio del Campo

“La libertad requiere sacrificio: es un deber antes de ser un derecho”

Oriana Fallaci

Agradecimientos

En primer lugar, quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, a Carmen Martínez-Cué, por acogerme y permitirme formar parte de su equipo de investigación, por toda la ayuda y el apoyo recibidos durante estos años. A José Antonio del Barrio, por ofrecerme esta oportunidad que ha significado tanto para mí, por transmitirme siempre su positividad y sus ánimos.

Durante estos últimos años he tenido el privilegio de poder compartir este trabajo con numerosas personas que tanto me han ayudado y de las que tanto he aprendido, por ello, quiero dar las gracias de manera muy especial a todos los compañeros del Grupo de Investigación de Neurobiología del Aprendizaje de la Facultad de Medicina. A Noemí Rueda, Andrea Corrales, Susana García, Paula Martínez, Eva García, Irene Ordóñez, Matilde Sainz, Eduardo Parisotto, Andrea Giacomini. A Sara Lantigua, por su apoyo y por compartir tantos momentos buenos durante esta etapa y a Verónica Vidal, por dedicarme lo más preciado que una persona puede poseer, su tiempo, por enseñarme y prestarme su ayuda incondicional. Gracias a todos y cada uno de vosotros que tanto aportáis al mundo de la ciencia.

Quiero hacer extensivo este agradecimiento a todo el Equipo de Investigación de M^a Amor Hurlé y resto de personal del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina.

Agradecer al personal del Servicio de Estabulación y Experimentación Animal su ayuda y amabilidad.

También quiero dar las gracias a todos los miembros de la Fundación Síndrome de Down de Cantabria, especialmente a M^a Victoria Troncoso y al equipo de la Unidad de Investigación en Psiquiatría del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Benedicto Crespo, Rosa Ayesa y Diana Tordesillas, por su amabilidad y por mostrarse siempre dispuestos a colaborar.

Así mismo quiero dar las gracias a Inés Rueda, Rebeca Alonso y Ángela del Barrio por su ayuda y apoyo durante la realización de esta tesis.

Por último, quiero dedicar esta tesis, con mucho cariño, a la memoria de mi abuela M^a Luz Sainz y mostrar mi más emotivo agradecimiento a mis amigos y a mi familia, especialmente a mis padres, a mi hermano y a Alberto, por estar siempre a mi lado.

*A mis padres,
A mi hermano,
A Alberto*

Índice

Abreviaturas	XXIII
Introducción	29
1. El síndrome de Down.....	31
1.1. Origen de la trisomía 21.....	32
1.2. El cromosoma 21 humano	33
1.3. Discapacidad intelectual en síndrome de Down	36
1.3.1. Procesos de aprendizaje y memoria	39
1.4. Otras alteraciones implicadas en la discapacidad intelectual del SD.....	40
1.5. Correlación entre las áreas cerebrales afectadas en el síndrome de Down y la disfunción cognitiva	41
1.6. Neurobiología de las alteraciones cognitivas y conductuales del síndrome de Down.....	43
1.7. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión	45
2. El sistema GABAérgico.....	46
2.1. El receptor GABA _A y la subunidad $\alpha 5$	48
3. Modelos murinos de síndrome de Down	50
3.1. El ratón Ts65Dn como modelo de SD	54
3.1.1. Alteraciones cognitivo-conductuales del ratón TS.....	57
3.1.2. Neuroanatomía y neurobiología del ratón TS.....	58
3.1.3. Alteraciones en la neurotransmisión: sobreinhibición en el ratón TS.....	60
4. Farmacoterapia dirigida a los receptores GABA _A	62
4.1. Moduladores alostéricos negativos NAMs selectivos	62
Objetivos.....	65
Material y métodos	69
1. Animales de experimentación.....	71
1.1. Mantenimiento y manipulación de los animales.....	71

1.2. Obtención del modelo animal	71
1.3. Cariotipado de los animales.....	72
1.3.1. Preparación de las muestras	72
1.3.2. Cariotipado mediante qPCR cuantitativa en tiempo real	72
1.4. Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos	74
1.4.1. Estudio I: Efecto de la administración crónica, durante etapas tempranas, de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA _A α5 sobre los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn	74
1.4.2. Estudio II: Estudio del efecto de la administración de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor GABA _A sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información en el ratón Ts65Dn	75
2. Caracterización cognitivo-conductual	76
2.1. Estudio I: Efecto de la administración crónica de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA _A α5, sobre los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn.....	77
2.1.1. Actividad espontánea: actimetría	77
2.1.2. Reflejos sensoriales y función motora	77
2.1.3. Ansiedad: campo abierto y laberinto en cruz	81
2.1.4. Atención y actividad exploratoria: tabla de agujeros	83
2.1.5. Aprendizaje y memoria espacial: laberinto acuático de Morris	84
2.2. Estudio II: Estudio del efecto de la administración subcrónica de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor GABA _A sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información en el ratón Ts65Dn ...	87
2.2.1. Aprendizaje y memoria espacial: laberinto acuático de Morris	87
3. Análisis estadístico de los resultados	91
Resultados	93

1. Estudio I: Efecto de la administración crónica, durante etapas tempranas, de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA _A α5 sobre los déficits cognitivos y conductuales del ratón TS65Dn.....	95
1.1. Actividad espontánea, reflejos sensorimotores y coordinación motora	95
1.1.1. Actimetría	95
1.1.2. Batería de pruebas sensoriales y motoras	97
1.1.3. Rotarod	99
1.2. Actividad general y ansiedad	100
1.2.1. Campo abierto	100
1.2.2. Laberinto elevado en cruz	102
1.3. Capacidad de atención y la actividad exploratoria	103
1.3.1. Tabla de agujeros.....	103
1.4. Cognición.....	105
1.4.1. Laberinto acuático de Morris	105
2. Estudio II: estudio del efecto de la administración subcrónica de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor GABA _A sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información en el ratón Ts65Dn.....	110
2.1. Efecto de RO4938581 sobre la cognición	110
2.1.1. Laberinto acuático de Morris	110
2.1.1.1. Aprendizaje y memoria de referencia	110
2.1.1.1.1. Efecto del tratamiento sobre los distintos procesos cognitivos....	113
2.1.1.2. Velocidad	118
2.1.1.3. Memoria de trabajo.....	119
2.1.1.4. Aprendizaje y memoria procedimental.....	124
2.1.1.4.1. Efecto del tratamiento sobre los distintos procesos cognitivos....	124
2.1.1.5. Memoria espacial	129

Discusión.....	135
1 Estudio I: Efecto de la administración crónica, durante etapas tempranas, de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA _A α5 sobre los déficits cognitivos y conductuales del ratón Ts65Dn	137
1.1. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 sobre el aprendizaje espacial y la memoria de referencia.....	138
1.2. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 sobre la capacidad de atención y la actividad exploratoria	141
1.3. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 sobre la actividad general y la ansiedad	142
1.4. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 sobre la actividad espontánea, los reflejos sensoriales y la coordinación motora	143
2. Estudio II: Estudio del efecto de la administración subcrónica de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor GABA _A sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información del ratón Ts65Dn.....	145
2.1. Efecto de la administración subcrónica de RO4938581 sobre el aprendizaje, la memoria de referencia y la memoria de trabajo.....	146
2.1.1. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en el ratón TS	147
2.1.2. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en el ratón CO	150
2.2. Efecto de la administración de RO4938581 sobre el aprendizaje y memoria procedimental.....	151
2.2.1. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en los ratones TS y CO	152
2.3. Efecto de la administración de RO4938581 sobre el aprendizaje y la memoria espacial	153

2.3.1. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en los ratones TS y CO	153
Conclusiones.....	155
Bibliografía.....	159

Abreviaturas

5-HT	Serotonina (5- <u>H</u> idroxit <u>r</u> iptamina)
ADN	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico
APP	<u>A</u> myloid <u>P</u> recursor <u>P</u> rotein
Aβ	β -amiloide (<u>A</u> myloid <u>β</u>)
CA1-CA3	Región CA1-3 del hipocampo (<u>C</u> ornu <u>A</u> mmonis <u>1-3</u>)
CI	Coeficiente Intelectual
CO	<u>C</u> ontrol euploide
DG	Giro dentado (<u>D</u> entate <u>G</u> yrus)
DSCR	Región Crítica síndrome de Down (<u>D</u> own <u>S</u> yndrome <u>C</u> ritical <u>R</u> egion)
DYRK1A	<u>D</u> ual <u>S</u> pecificity <u>T</u> yrosine <u>P</u> hosphorylation <u>R</u> egulated <u>k</u> inase <u>1A</u>
E.E.M	<u>E</u> rror <u>E</u> stándar de la <u>M</u> edia
EGL	Capa granular externa del cerebelo (<u>E</u> xternal <u>G</u> ranular <u>L</u> ayer)
F1	Primera generación filial
GABA	Ácido gamma-aminobutírico (<u>G</u> amma- <u>A</u> minob <u>u</u> tyric <u>A</u> cid)
GABA_A	Receptor para <u>GABA</u> tipo <u>A</u>
GABA_Aα5	Receptor para <u>GABA</u> tipo <u>A</u> que contiene la subunidad <u>α5</u>
GABA_B	Receptor para <u>GABA</u> tipo <u>B</u>
GAD 65-67	Descarboxilasa de ácido glutámico (<u>G</u> lutamic <u>A</u> cid <u>D</u> ecarboxylase 65-67)
GCL	Capa granular (<u>G</u> ranular <u>C</u> ell <u>L</u> ayer)
H₂O_mQ	Agua miliQ (<u>H</u> ₂ <u>O</u> <u>m</u> ili <u>Q</u>)
HSA21	Cromosoma 21 humano (<u>H</u> omo <u>S</u> apiens <u>A</u> utosome <u>21</u>)
IEGs	Genes inmediatos tempranos (<u>I</u> mmEDIATE <u>E</u> arly <u>G</u> enes)
LTP	Potenciación a largo plazo (<u>L</u> ong- <u>T</u> erm <u>P</u> otentiation)

Abreviaturas

ML	Capa molecular (<i><u>M</u>olecular <u>L</u>ayer</i>)
MMU16	Cromosoma 16 murino (<i><u>M</u>us <u>M</u>usculus chromosome <u>16</u></i>)
MRS	Espectroscopía por resonancia magnética (<i><u>M</u>agnetic <u>R</u>esonance <u>S</u>pectroscopy</i>)
<i>Mx1</i>	<i><u>M</u>X dynamin like GTPase <u>1</u></i>
NA	<u>N</u> or <u>a</u> drenalina
NAM	Modulador alostérico negativo (<i><u>N</u>egative <u>A</u>llosteric <u>M</u>odulator</i>)
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i><u>N</u>erve <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i>)
NMDA	<u>N</u> - <u>m</u> etil- <u>D</u> - <u>a</u> spartato
<i>OLIG1</i>	<i><u>O</u>ligodendrocyte <u>T</u>ranscription <u>F</u>actor <u>1</u></i>
<i>OLIG2</i>	<i><u>O</u>ligodendrocyte <u>T</u>ranscription <u>F</u>actor <u>2</u></i>
PAM	Modulador alostérico positivo (<i><u>P</u>ositive <u>A</u>llosteric <u>M</u>odulator</i>)
PTZ	<u>P</u> ent <u>i</u> lenotetrazol
Qpcr	PCR cuantitativa en tiempo real (<i><u>q</u>uantitative <u>p</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>)
r.p.m	<u>R</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto
REM	Movimientos oculares rápidos (<i><u>R</u>apid <u>E</u>ye <u>M</u>ovements</i>)
ROS	Especies de oxígeno reactivo (<i><u>R</u>eactive <u>O</u>xygen <u>S</u>pecies</i>)
SD	<u>S</u> índrome de <u>D</u> own
SGZ	Zona subgranular (<i><u>S</u>ub<u>g</u>ranular <u>Z</u>one</i>)
SNC	<u>S</u> istema <u>N</u> ervioso <u>C</u> entral
<i>SOD1</i>	<i><u>S</u>uperoxide <u>D</u>ismutase <u>1</u></i>
SVZ	Zona subventricular (<i><u>S</u>ub<u>v</u>entricular <u>Z</u>one</i>)
TS	<u>T</u> s65Dn
VGAT	Transportador vesicular de GABA (<i><u>V</u>esicular <u>G</u>ABA <u>T</u>ransporter</i>)

VZ | Zona Ventricular (Ventricular Zone)

Introducción

1. El síndrome de Down

El síndrome de Down (SD), la aneuploidía más común, es debido a la presencia de una copia extra total o parcial del cromosoma 21 (HSA21, *Homo sapiens autosome 21*) (Arumugam *et al.*, 2016). Esta trisomía 21 puede clasificarse en cuatro categorías según el tamaño de la región genómica triplicada: trisomía completa, parcial, microtrisomía y duplicación de un solo gen. Aunque la más común es la trisomía completa ya que alrededor del 95 % de las personas con SD tienen tres copias completas del HSA21 (Dierssen *et al.*, 2009).

El SD tiene una incidencia de uno entre 650-1000 nacimientos vivos en todo el mundo (Bittles *et al.*, 2007). Es un trastorno del neurodesarrollo que se asocia con muchas complicaciones neurológicas, incluyendo déficits cognitivos, convulsiones y neuropatología de inicio temprano que se asemeja a la de la enfermedad de Alzheimer (Lott y Dierssen, 2010). Además de estos rasgos, esta aneuploidia 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) (Arumugam *et al.*, 2016). Sin embargo, hay una gran variabilidad en la proporción de personas que presentan estas alteraciones y en la gravedad de sus manifestaciones (Flórez *et al.*, 2015).

Las causas más frecuentes de mortalidad de los individuos con SD son las enfermedades respiratorias (neumonía), las cardiopatías congénitas, los trastornos circulatorios y la demencia (Oster *et al.*, 1975; Howells, 1989; Englund *et al.*, 2013). Sin embargo, la tasa de supervivencia ha aumentado desde menos del 50 % a mediados de la década de 1990 hasta el 95 % a principios de los años 2000. En la actualidad la esperanza de vida de las personas con SD es de alrededor de 60 años (Englund *et al.*, 2013). Estos hechos pueden atribuirse a factores tales como la atención temprana, el

tratamiento de las malformaciones cardíacas congénitas y enfermedades infecciosas y una dieta más saludable (Glasson *et al.*, 2014).

1.1. Origen de la trisomía 21

Numerosos estudios han demostrado que existen diferentes causas que dan origen al SD. Aproximadamente el 95 % de estos casos se producen por un fenómeno de **no-disyunción meiótica** del cromosoma HSA21 en la línea germinal de uno de los dos progenitores, que daría como resultado una trisomía completa de dicho cromosoma (**figura 1**). El 3.2 % de los casos es debido a **translocaciones** en las que una copia completa o parcial del HSA21 se une a otro cromosoma, por lo general el HSA14, originándose una trisomía parcial. Por último, el 1.8 % restante da lugar a **mosaicismo**. En este caso la no disyunción se produce en las primeras divisiones embrionarias y por tanto hay una mezcla de dos tipos celulares, algunos con los 46 cromosomas habituales y otros que contendrán 47 (Kava *et al.*, 2004).

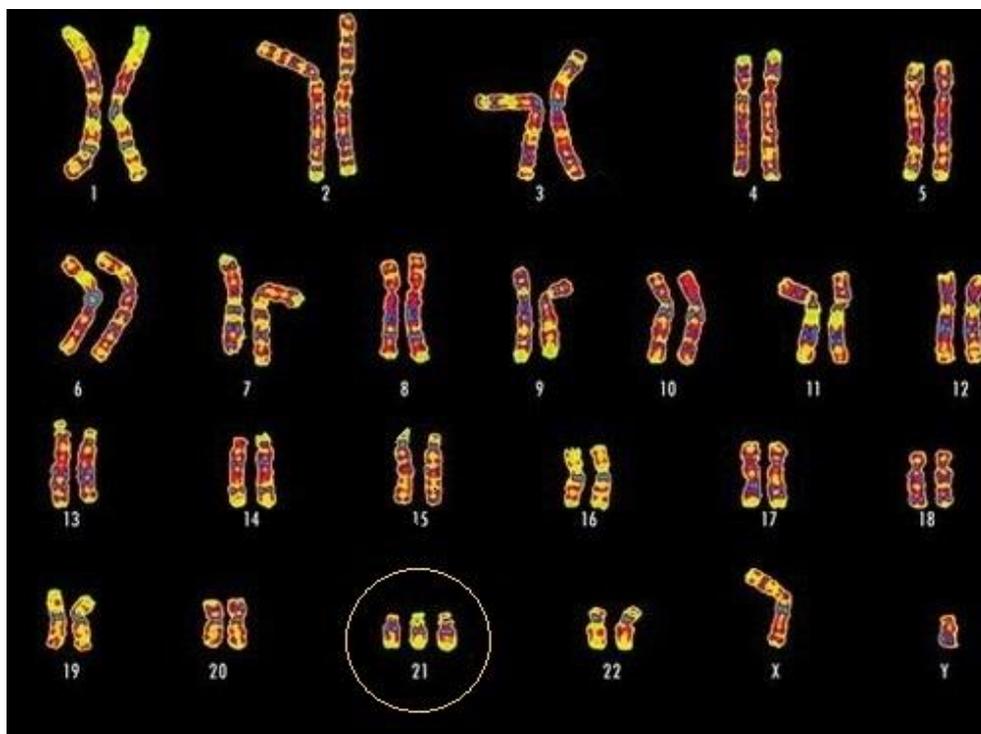


Figura 1. Cariotipo de una persona con SD con el HSA21 triplicado. Imagen modificada de <https://kdurotaract.files.wordpress.com/2016/04/zespol-downa-spl.jpeg>

1.2. El cromosoma 21 humano

El HSA21 es el autosoma más pequeño del genoma y representa alrededor del 1.5 % del contenido total de DNA en la célula. Está compuesto por 33.5 millones de pares de bases de DNA en su brazo largo (21q) y 285 mil en su brazo corto (21p) (Hattori *et al.*, 2000). Contiene aproximadamente 696 genes, de los cuales al menos 235 genes codifican para proteínas y 142 son pseudogenes. Las proteínas codificadas a partir de los genes que contiene el HSA21 están involucradas en 636 procesos biológicos diferentes, 304 funciones moleculares y participan en la formación de 163 componentes celulares diferentes (Letourneau y Antonarakis, 2012). El HSA21 tiene muy pocos genes en comparación con otros cromosomas, lo que explica la mayor viabilidad y esperanza de vida de las personas nacidas con trisomía del HSA21, en comparación con aquellas que presentan trisomías de otros cromosomas (Reeves, 2000).

Está ampliamente aceptado que los distintos fenotipos de las personas con SD son el resultado de la presencia de una copia adicional del HSA21, sin embargo, no está claro cuáles son los mecanismos moleculares por los que surgen estos fenotipos. Se han propuesto dos teorías que tratan de explicar los efectos causados por la presencia de un cromosoma adicional en los distintos fenotipos del SD. Una de ellas es la “**teoría de la dosis génica**” (Delabar *et al.*, 2006; Aït Yahya-Graison *et al.*, 2007; Arumugam *et al.*, 2016) y la otra es la “**teoría de inestabilidad del desarrollo**” (Pritchard y Kola, 1999; Shapiro, 2001; Roizen y Patterson, 2003; Arumugam *et al.*, 2016).

La primera de ellas establece que las alteraciones que se producen en el SD son debidas a un efecto acumulativo de los productos procedentes de la sobreexpresión de genes individuales del HSA21 (Gardiner, 2004). La segunda defiende que la causa más importante del conjunto de rasgos fenotípicos se debe al aumento de la actividad de grupos de genes que provoca una disminución de la estabilidad genética. Por ello, cuantos más genes estén en trisomía, mayor susceptibilidad tendrá el feto de que surjan anomalías en su desarrollo (Korbel *et al.*, 2009; Lyle *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010a).

El hecho de que existan individuos con trisomías completas que muestran rasgos fenotípicos muy ligeros o la existencia de otras trisomías que no generen síndromes similares al encontrado en el SD no apoyan la segunda teoría (Korbel *et al.*, 2009; Lyle *et al.*, 2009), por lo que la “teoría de la dosis génica” es la más aceptada actualmente.

Con el fin de conocer el origen de las alteraciones fenotípicas halladas en el SD y de identificar qué genes del HSA21 contribuyen a sus distintos fenotipos se han utilizado varias estrategias como: (i) el estudio de individuos con trisomías parciales del HSA21, (ii) la generación de modelos murinos con trisomías parciales de diferentes regiones de cromosomas que contienen genes ortólogos a los encontrados en el HSA21 y (iii) el análisis de la expresión diferencial de genes en células o tejidos de individuos con SD (Mao *et al.*, 2005; Aït Yahya-Graison *et al.*, 2007; Prandini *et al.*, 2007), o de modelos murinos de esta condición (Kahlem *et al.*, 2004; Lyle *et al.*, 2004; Dauphinot *et al.*, 2005; Sultan *et al.*, 2007).

A partir de los resultados obtenidos en varios estudios (Rahmani *et al.*, 1989; Delabar *et al.*, 1993; Korenberg *et al.*, 1994) se propuso la existencia de una región génica mínima en el HSA21, denominada **Región Crítica síndrome de Down** (*Down syndrome Critical Region*, DSCR), que debía estar en trisomía para que se manifestasen los rasgos más importantes del SD. Hoy en día la existencia de una DSCR es motivo de controversia debido a los resultados obtenidos en estudios tanto de individuos con trisomías parciales del HSA21 (Patterson, 2009; Lana-Elola *et al.*, 2011) como de ratones con trisomías parciales de regiones sinténicas del cromosoma murino 16 (*Mus Musculus chromosome 16*, MMU16) (Olson *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 MMU16. Sin embargo, la mayoría de los genes presentan variabilidad interindividual en su expresión, tanto en las muestras trisómicas como euploides (Sultan *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que la sobreexpresión de algunos de estos genes podría contribuir en mayor grado al desarrollo de distintas alteraciones anatomofuncionales del sistema nervioso central (SNC) de las personas con SD. Entre estos genes se encuentran:

- **APP** (*Amyloid precursor protein*). Se ha demostrado que este gen está implicado en diferentes fenotipos del SD, incluyendo el desarrollo de la neuropatología típica de la enfermedad de Alzheimer (Isacson *et al.*, 2002) y las alteraciones de neurogénesis características de la condición trisómica (Trazzi *et al.*, 2011).

- **OLIG1 y OLIG2** (*Oligodendrocyte Transcription Factor 1 y 2*). Estos genes están implicados en la neurogénesis y la oligodendrogénesis por lo que su sobreexpresión juega un papel importante en las alteraciones de estos procesos encontrados en el SD (Takebayashi *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2002; Zhou y Anderson, 2002). *OLIG1* y *OLIG2* también participan en la regulación del número de neuronas inhibitorias durante el desarrollo embrionario de un modelo murino de SD (Chakrabarti *et al.*, 2010). Por tanto, su sobreexpresión parece ser uno de los mecanismos responsables de los déficits cognitivos de esta población.

- **DYRK1A** (*Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*). Numerosos estudios sugieren que su sobreexpresión puede contribuir a las discapacidades cognitivas del SD debido, en parte, a su papel en la regulación de la proliferación celular y de múltiples vías de señalización que contribuyen al desarrollo y fisiología del cerebro (Altafaj *et al.*, 2001; De la Torre *et al.*, 2014; García-Cerro *et al.*, 2014).

- **SOD1** (*Superoxide Dismutase 1*) es responsable de la formación de la enzima superóxido dismutasa implicada en las vías metabólicas del oxígeno. La sobreproducción de esta enzima da lugar a un incremento en la generación de especies de oxígeno reactivas (*Reactive Oxygen Species*, ROS) que dañan las membranas celulares. Este proceso es evidente desde etapas tempranas del desarrollo en el SD (Jovanovic *et al.*, 1998; Capone *et al.*, 2002).

Otro tipo de genes que no se encuentran sobreexpresados pero que ejercen un importante papel sobre la cognición son los **IEGs** (*Immediate Early Genes*). Los *IEGs*, en particular el gen *ARC*, inducen una respuesta en la actividad neuronal por lo que su expresión está directamente involucrada en la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria (Miyashita *et al.*, 2008).

1.3. Discapacidad intelectual en síndrome de Down

El índice psicométrico más utilizado para definir la discapacidad cognitiva es el coeficiente intelectual (CI). El promedio de este coeficiente en las personas con SD alcanza un valor de 50, con un rango que varía entre 30 y 70, lo que se considera un retraso mental de moderado a grave (Vicari, 2006). La velocidad de aprendizaje es más lenta que en el resto de la población y como consecuencia el CI comienza a declinar con la edad (Nadel, 2003).

La **discapacidad intelectual** es el rasgo más destacado del SD, dicha discapacidad se asocia a un retraso del desarrollo psicomotor, alteraciones del aprendizaje, la memoria y el lenguaje (Sella *et al.*, 2013; Belacchi *et al.*, 2014; Yoder *et al.*, 2014), déficits cognitivos en el procesamiento auditivo-verbal y problemas adaptativos a la vida cotidiana (Lott y Dierssen, 2010). Estas alteraciones parecen estar mediadas por la dificultad de codificar, consolidar y recuperar la información y de elaborar respuestas adecuadas (Flórez, 1999; Maltese *et al.*, 2014).

En lo que se refiere a la **memoria**, ésta es un elemento fundamental para el adecuado funcionamiento cognitivo como lo son, de igual manera, la percepción, la atención, el razonamiento o el lenguaje (Anderson, 1990; Howes, 1990). Mientras que el aprendizaje es la capacidad para adquirir nueva información, la memoria es la capacidad para retener la información aprendida de modo que pueda ser evocada. Desde un punto de vista neuropsicológico se define el aprendizaje y la memoria como las funciones neurocognitivas que permiten registrar, codificar, consolidar, retener, almacenar, recuperar y evocar la información almacenada (Flórez, 1999). Para que se produzca un funcionamiento óptimo de estos procesos se debe producir la articulación integrada de numerosos circuitos que se localizan en distintas estructuras del SNC.

Este procesamiento de la información se produce de una manera secuencial a través de la memoria sensorial, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Atkinson y Shiffrin, 1968). La memoria a corto plazo o memoria de trabajo es la capacidad de almacenar temporalmente la información reciente y mantenerla disponible para su

uso, mientras que la memoria a largo plazo es la capacidad para retener la información durante periodos más prolongados de tiempo o de manera permanente. Las personas con SD presentan déficits tanto en la memoria a corto plazo como a largo plazo.

En el caso de la **memoria a corto plazo** o **memoria de trabajo**, las personas con SD no son capaces de almacenar y manipular la información reciente durante un corto periodo de tiempo o de utilizar dicha información para el desarrollo de tareas complejas (Vicari, 2006). Sin embargo, el déficit de la memoria de trabajo varía en la población SD dependiendo si la información codificada es de carácter *verbal* o de carácter *visuo-espacial* (Chapman y Hesketh, 2000; Laws y Bishop, 2003; Lanfranchi *et al.*, 2012). Es decir, mientras que la memoria verbal a corto plazo está alterada (Lemons y Fuchs, 2010), la memoria visuo-espacial se encuentra relativamente conservada (Nash y Heath, 2011). Las zonas cerebrales implicadas en el procesamiento de la memoria a corto plazo son la corteza cingulada y la corteza prefrontal, las áreas de asociación auditiva y visual (lóbulo temporal superior e inferior), las zonas parietales posteriores y el hipocampo (Lott y Dierssen, 2010).

La memoria a corto plazo está íntimamente relacionada con la **memoria a largo plazo**, pues la consolidación de la memoria de trabajo es uno de los mecanismos que dan lugar al almacenamiento permanente de la información (Flórez *et al.*, 2015). Este proceso también está deteriorado en las personas con SD (Pennington *et al.*, 2003). En este tipo de memoria se integran la **memoria explícita** o **declarativa** y la **implícita** o **procedimental**.

La **memoria explícita** o **declarativa** supone la capacidad de aprender intencional y conscientemente y requiere la codificación de la información adquirida, la consolidación de la misma y la recuperación de los recuerdos, así como un alto grado de atención (Bartesaghi *et al.*, 2011; Dierssen, 2012). Estas capacidades se encuentran mermadas en las personas con SD (Carlesimo *et al.*, 1997; Vicari *et al.*, 2000). Se ha demostrado de forma constante que en el síndrome de Down existe pobre codificación de la información, alteraciones en su capacidad de recuperación o evocación y déficit de atención (Clark y Wilson, 2003; Krinsky-Mchale *et al.*, 2008). Estudios realizados a

niños preescolares con SD revelan que éstos muestran un déficit en tareas de recuerdo diferido del aprendizaje de un lugar, lo que indica que existe también un trastorno de la memoria espacial a largo plazo (Pennington *et al.*, 2003). Estos déficits son debidos a las alteraciones encontradas en ciertas áreas del cerebro SD como la corteza prefrontal, los lóbulos temporales y, sobre todo, el hipocampo (Lott y Dierssen, 2010; Hanslmayr *et al.*, 2014).

La **memoria implícita** o **procedimental** se refiere a las habilidades o destrezas perceptivas, motoras y cognitivas adquiridas sin que exista una percepción consciente y sin requerir mucha atención, ya que opera de forma automática (Bussy *et al.*, 2011). En el SD este tipo de memoria parece estar menos afectada que la explícita (Dierssen, 2012). Una de las estructuras que controla este tipo de aprendizaje es el estriado (Teichmann *et al.*, 2006) que no presenta alteraciones morfológicas o funcionales en esta población (Flórez *et al.*, 2015).

La **función ejecutiva** abarca procesos como la planificación estratégica, la flexibilidad cognitiva, la inhibición de respuestas inapropiadas, la generación de nuevas respuestas y el razonamiento (Costanzo *et al.*, 2013). Las personas con SD muestran un déficit generalizado de todos estos procesos de la función ejecutiva (Rowe *et al.*, 2006; Porter *et al.*, 2007; Lanfranchi *et al.*, 2010; Pritchard *et al.*, 2015). Sus habilidades para controlar y regular la actividad tanto cognitiva como conductual y emocional se encuentran mermadas (Flórez *et al.*, 2015).

En cuanto a la **flexibilidad cognitiva**, las personas con SD muestran dificultades a la hora de reestructurar espontáneamente el conocimiento que han adquirido previamente para poder dar respuesta a las exigencias que plantean situaciones cambiantes. Varios estudios han evaluado la flexibilidad cognitiva de las personas con SD mediante el análisis de sus aptitudes verbales, concluyendo que tanto niños como adultos presentan un deterioro de esta función (Zelazo *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2013). Esta habilidad es fundamental en el proceso de aprendizaje y de resolución de problemas ya que una escasa flexibilidad cognitiva supone reproducir esquemas rígidos de forma automática lo que da lugar a procedimientos ineficaces.

1.3.1. Procesos de aprendizaje y memoria

Como se ha mencionado anteriormente, el aprendizaje y memoria tiene lugar en tres etapas: **codificación**, **consolidación** y **recuperación** de la información. En la **codificación** la información entra por los canales sensoriales (por ejemplo, a través de la vista, el olfato, el oído o el tacto) y luego es rápidamente codificada y pasa a la memoria de corto plazo. Parte de esta información puede ser **consolidada** en la memoria a largo plazo y en la etapa final del procesamiento está implicada la **recuperación** de la información que se almacenó anteriormente.

La relativa contribución de los déficits en la codificación, consolidación y recuperación de la información a la disfunción de la memoria en personas con discapacidad intelectual está aún en debate (Carlesimo *et al.*, 1997). Los déficits en la codificación de la información se han considerado como la causa principal de las alteraciones en la memoria a largo plazo de las personas con alteraciones cognitivas (Watkins, 1974; Spinnler y Tognoni, 1987). Sin embargo, parece que tanto la consolidación como la recuperación de la información almacenada también están involucradas en las alteraciones de la memoria a largo plazo (Winters y Semchuk, 1986).

En el caso del SD, varios estudios sugieren que alteraciones en la codificación y en la recuperación de la información podrían ser la causa de sus déficits en la memoria a largo plazo, memoria episódica y función ejecutiva (Carlesimo *et al.*, 1997; Milojevich y Lukowski, 2016). Sin embargo, otros estudios muestran que los déficits en la memoria y el aprendizaje de las personas con SD están relacionados con una inadecuada consolidación de la información (Lott y Dierssen, 2010). En conjunto, estos estudios sugieren que los tres procesos están alterados en las personas con SD.

Cada uno de estos procesos está mediado por distintos mecanismos moleculares (Abel y Lattal, 2001) y depende de la expresión de genes diferentes. En concreto, la consolidación de la información depende de la expresión de los *IEGs* sobre todo del gen *ARC* (Miyashita *et al.*, 2008). Los *IEGs* desempeñan un papel clave en el aprendizaje

y la memoria, procesos que están alterados en el ratón Ts65Dn, modelo murino del que se hablará en apartados posteriores (Braudeau *et al.*, 2011a; Potier *et al.*, 2014).

En el apartado 1.5. se describen los distintos mecanismos neuromorfológicos que podrían subyacer a las alteraciones de estos procesos en el SD.

1.4. Otras alteraciones implicadas en la discapacidad intelectual del SD

Las personas con SD presentan otras alteraciones que tienen un papel en su discapacidad intelectual. En primer lugar, esta población presenta numerosos **problemas de sueño**, como apneas y disminución de la fase REM, que tienen como consecuencia un deterioro en las funciones ejecutivas (Lal *et al.*, 2015). Además, dado que el sueño desempeña un papel activo en la consolidación de la memoria (Ashworth *et al.*, 2017), es posible que estas alteraciones jueguen también un papel en el deterioro de dicho proceso.

Por otro lado, las personas con SD también tienen más probabilidades de presentar **convulsiones**. En aquellos individuos en los que las convulsiones se producen de manera reiterada pueden afectar al desarrollo neuronal y contribuir a un deterioro del funcionamiento cognitivo (Lott y Dierssen, 2010; Lott, 2012).

Para que se produzca un correcto aprendizaje es necesario que el individuo mantenga una adecuada **atención** a los estímulos que ha de codificar, consolidar y recuperar (Jarrold *et al.*, 2008). Las personas con SD presentan problemas de concentración, tendencia a la distracción y una menor capacidad para poner en juego mecanismos de autoinhibición (Flórez, 1999; Cornish y Wilding, 2010; Ekstein *et al.*, 2011; Scerif y Steele, 2011). Se ha propuesto que éstas son las causas de que el aprendizaje de nuevo vocabulario y la capacidad de lectura estén afectados en el SD (Nash y Heath, 2011; Purser y Jarrold, 2013).

Por último, algunas personas con SD presentan además un **trastorno del espectro autista**, esto conlleva un deterioro cognitivo, un retraso en el desarrollo del lenguaje y

en habilidades adaptativas mayor que aquellas personas que sólo presentan SD (Capone *et al.*, 2005; Molloy *et al.*, 2009; Grieco *et al.*, 2015).

1.5. Correlación entre las áreas cerebrales afectadas en el síndrome de Down y la disfunción cognitiva

Las alteraciones cognitivo-conductuales presentes en el SD se deben a anomalías estructurales y funcionales del SNC (Bartesaghi *et al.*, 2011; Rueda *et al.*, 2012). Numerosos estudios demuestran que las personas con SD presentan menor volumen y peso cerebral durante las etapas pre y post-natales (Guilhard-Costa *et al.*, 2006; Guidi *et al.*, 2008; 2011). La reducción del tamaño cerebral aparece ya en los fetos con SD de 4-5 meses y se acentúa durante los tres últimos meses de gestación (Schmidt-Sidor *et al.*, 1990; Golden y Hyman, 1994; Wisniewski y Kida, 1994; Winter *et al.*, 2000; Engidawork y Lubec, 2003; Guilhard-Costa *et al.*, 2006). En adultos, la reducción del tamaño cerebral alcanza aproximadamente el 20 % (Jernigan *et al.*, 1993; Pinter *et al.*, 2001b; Rueda *et al.*, 2012). Esta reducción no es generalizada, sino que se produce en determinadas regiones del cerebro (Wisniewski *et al.*, 1984; Wisniewski y Schmidt-Sidor, 1989; Wisniewski, 1990; Wisniewski y Kida, 1994). Las mayores reducciones se encuentran en las cortezas frontal y temporal, siendo en esta última el hipocampo la estructura más deteriorada (Lott y Dierssen, 2010) (**figura 2**).

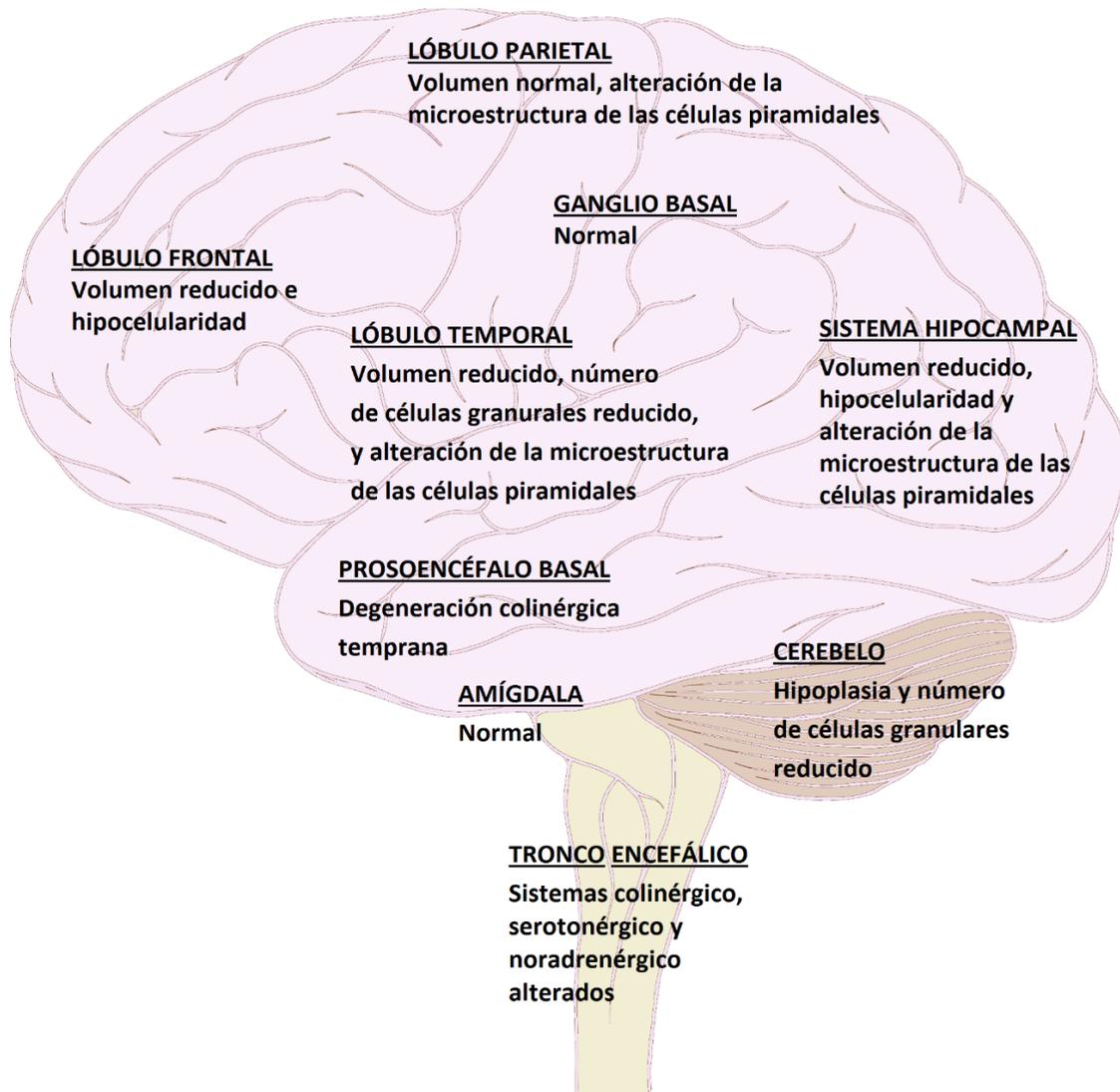


Figura 2. Resumen de las alteraciones morfológicas del cerebro SD. Modificada de Lott y Dierssen (2010). Imagen adquirida en https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brain_human_lateral_view.svg

Está bien establecido que existe una correlación entre las anomalías de carácter estructural y cognitivo-conductuales en el SD. El hipocampo es fundamental para la formación de la memoria explícita y para el establecimiento de una organización sistemática de los recuerdos, es decir, funciona como una especie de "índice" de los recuerdos. Esta estructura es crucial para la codificación, consolidación y almacenamiento de la información (Eichenbaum, 2001). El hipocampo también es necesario para la expresión de las relaciones que se establecen entre distintos elementos en la memoria, ya que permite la conexión entre recuerdos que sólo están indirectamente relacionados entre sí, pero que para determinadas acciones es necesario que actúen conjuntamente como, por ejemplo, en la memoria espacial

(Eichenbaum, 1999). Las alteraciones en el lóbulo temporal, especialmente en el hipocampo, tienen un papel fundamental en los déficits cognitivos del SD, incluyendo las alteraciones en memoria explícita, memoria espacial, codificación, consolidación y recuperación de la información (Holt y Maren, 1999; Pennington *et al.*, 2003; Ofen *et al.*, 2007).

Sin embargo, el hipocampo no es una estructura independiente ya que interactúa con la corteza prefrontal en la consolidación y recuperación de la información espacial (Churchwell *et al.*, 2010; Milojevich y Lukowski, 2016). Por tanto, las alteraciones neuromorfológicas de esta área encontradas en las personas con SD pueden ser responsables de los déficits en estos procesos de aprendizaje. También hay evidencia de que la corteza prefrontal juega un papel importante en la función ejecutiva (Ofen *et al.*, 2007), por lo que los déficits en esta función encontrados en las personas con SD pueden ser debidos a las anomalías neuromorfológicas encontradas en esta área (Lott y Dierssen, 2010).

El cerebelo de las personas con SD también presenta un menor volumen e hipocelularidad (Aylward *et al.*, 1997a). Dado el papel de esta estructura en el control motor y en distintos procesos cognitivos como la atención, la memoria espacial, la flexibilidad cognitiva y la función ejecutiva (Schmahmann, 2004; Teipel *et al.*, 2004), su morfología anormal podría contribuir a las alteraciones cognitivas en el SD.

1.6. Neurobiología de las alteraciones cognitivas y conductuales del síndrome de Down

La disminución en el volumen del cerebro de las personas con SD es debido a una reducción en el **número de neuronas** (hipoplasia) (Guidi *et al.*, 2011) producida por un marcado déficit en los procesos de neurogénesis pre- y post-natal. Esta reducción en la neurogénesis afecta de manera preferente a determinadas áreas, en especial al cerebelo, a la corteza prefrontal, al hipocampo y a determinadas circunvalaciones del lóbulo temporal (Contestabile *et al.*, 2010). 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 (Shors *et al.*, 2002; Sweatt, 2016). Por tanto, la menor neurogénesis encontrada en el SD podría ser parcialmente responsable de los déficits cognitivos de esta población.

Las alteraciones de neurogénesis parecen ser debidas a **anomalías en la proliferación de precursores neurales**, ya que existe una desaceleración del ciclo celular que ralentiza la división de los progenitores. En el cerebro de fetos con SD, la proliferación celular está profundamente comprometida 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).

Además, las alteraciones en **los procesos de diferenciación** encontrados en los cerebros con SD tienen como resultado una disminución en el número final de neuronas (Bahn *et al.*, 2002; Contestabile *et al.*, 2007; Espósito *et al.*, 2008; Rueda *et al.*, 2012) que son evidentes tanto en las etapas pre-natales como post-natales.

Por otro lado, las neuronas de las personas con SD presentan una citoarquitectura alterada, es decir, se encuentran menos desarrolladas y poseen menos prolongaciones dendríticas (Becker *et al.*, 1991; Kasai *et al.*, 2003; Newpher y Ehlers, 2009; Garner y Wetmore, 2012). Esta patología 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 enfermedad de Alzheimer (Takashima *et al.*, 1989; Ferrer y Gullotta, 1990). Dicha patología dendrítica da lugar a un menor número de sinapsis interneuronales y a una **pérdida de neuroplasticidad cerebral**, proceso esencial que subyace al aprendizaje y a la memoria (Koo *et al.*, 1992; Wisniewski y Rabe, 1986; Wisniewski y Schmidt-Sidor, 1989).

La correcta sinaptogénesis en el DG del hipocampo y en la corteza prefrontal en niños con desarrollo normal favorece la recuperación de la información (Bauer, 2004, 2006).

A nivel bioquímico, la consolidación de la información requiere de una transformación de procesos sinápticos bioquímicos de corta duración en procesos funcionales y estructurales más estables. Se han observado problemas en esta transformación en modelos murinos de SD (Dierssen *et al.*, 2003). Por tanto, las alteraciones sinápticas podrían ser responsables de sus déficits en la codificación, consolidación y recuperación de la información encontrada en personas con SD (Jernigan *et al.* 1993; Pinter *et al.* 2001a; Newpher y Ehlers, 2009).

1.7. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión

Por otro lado, la pérdida de neuroplasticidad cerebral se ve empeorada por irregularidades 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. Éstas alteraciones pueden ser responsables de la aparición de defectos de la neurogénesis, de la transmisión sináptica y de la cognición (Flórez *et al.*, 2015).

Las personas con SD presentan alteraciones en el **sistema serotoninérgico**. Estudios realizados en cerebros de fetos (Whittle *et al.*, 2007) y adultos (Yates *et al.*, 1986; Godridge *et al.*, 1987; Risser *et al.*, 1997) con SD han mostrado una reducción en los niveles de **serotonina (5-HT)** en la corteza frontal, así como un menor número de receptores **5-HT_{1A}** (Bar-Peled *et al.*, 1991). Dado que la serotonina tiene un importante papel en la neurogénesis, diferenciación neuronal, desarrollo dendrítico, mielinización y sinaptogénesis (Whitaker-Azmitia, 2001), la alteración de este sistema podría estar implicada en los déficits cognitivos del SD.

También se han descrito alteraciones en el **sistema noradrenérgico** de las personas con SD. Aunque los niveles de **noradrenalina (NA)** son normales en fetos con SD (Whittle *et al.*, 2007), en los cerebros adultos se encuentran reducidos (Godridge *et al.*, 1987; Risser *et al.*, 1997), probablemente como consecuencia de la neurodegeneración del *locus coeruleus* (Mann *et al.*, 1985; Coyle *et al.*, 1986). Dado el papel del sistema noradrenérgico en los procesos de neurogénesis (Duman *et al.*, 2001), las alteraciones

de la transmisión noradrenérgica podrían tener un papel en el daño en la neurogénesis, y, por tanto, en los déficits cognitivos encontrados en el SD. Además, se ha demostrado que las vías aferentes desde el *locus coeruleus* a las neuronas del hipocampo tienen un importante papel en el aprendizaje contextual (Murchison *et al.*, 2004), proceso cognitivo que está dañado en personas con SD (Nadel, 2003).

Uno de los substratos anatómicos del aprendizaje y la atención es el sistema **colinérgico septohipocampal** (Baxter y Chiba, 1999; Bartus, 2000). En etapas tempranas de la vida, las personas con SD no presentan alteraciones en el **sistema colinérgico**. (Kish *et al.*, 1989; Lubec *et al.*, 2001). Sin embargo, al llegar a la etapa adulta muestran una pérdida significativa de los terminales colinérgicos en el hipocampo (Godridge *et al.*, 1987; Risser *et al.*, 1997; Schliebs y Arendt, 2011). Es decir, la degeneración del sistema colinérgico ocurre durante el envejecimiento del cerebro con SD.

El **sistema glutamatérgico** también se ve afectado en el SD. El **glutamato** es el neurotransmisor excitador más importante en el SNC. Aunque los niveles de este neurotransmisor son normales en fetos con SD (Sairanen *et al.*, 2005), en etapas más tardías, especialmente tras la aparición de la neuropatología típica de la enfermedad de Alzheimer, se ha encontrado un desequilibrio de la actividad glutamatérgica (hiperactividad en estadios intermedios e hipoactividad en estadios avanzados) (Harkany *et al.*, 2000; Butterfield y Pocernich, 2003), provocando un daño neuronal hipocampal que deteriora diversos procesos cognitivos.

2. El sistema GABAérgico

En el desarrollo neuronal, el sistema GABAérgico regula la proliferación, la migración, la diferenciación y la formación de las redes neuronales ejerciendo su función mediante dos tipos de receptores: GABA_A y GABA_B. Los receptores GABA_A son ionotrópicos (canales de cloro dependientes de ligando) mientras que los receptores GABA_B son metabotrópicos (acoplados a proteínas G) (Deidda *et al.*, 2014). La familia

de receptores GABA_A, en la que se centran los estudios de esta tesis doctoral, es el tipo predominante en el cerebro (Potier *et al.*, 2014).

El neurotransmisor GABA es sintetizado a partir del ácido glutámico, gracias a la acción de las enzimas glutamato descarboxilasa (*Glutamic Acid Decarboxylase*, GAD) GAD 65 y GAD 67 (Pinal y Tobin, 1998). Una vez sintetizado, el GABA es introducido en vesículas por el transportador vesicular del GABA (*Vesicular GABA Transporter*, VGAT), preparado para su liberación cuando se produzca el estímulo nervioso (Deidda *et al.*, 2014). Su papel inhibitor en el SNC coordina la actividad de diferentes tipos de células neuronales ampliamente interconectadas, modulando la actividad sináptica al establecer un equilibrio entre la actividad excitadora e inhibitora, un requisito fundamental en la mayoría de las funciones cerebrales (Enna y Möhler, 2007). Esta regulación de la actividad neuronal por GABA depende de su metabolismo, expresión y de la actividad de los receptores pre y postsinápticos (Deidda *et al.*, 2014).

Funcionalmente, la inhibición medida por GABA puede ser clasificada como **fásica** (sináptica) o **tónica** (extrasináptica). La inhibición fásica está mediada por receptores GABA_A de baja afinidad localizados en la sinapsis, mientras que la inhibición tónica surge de la activación de receptores extrasinápticos de alta afinidad activados por bajas concentraciones de GABA ambiental (Glykys y Mody, 2006).

En el SD se ha observado una reducción en los niveles de GABA en la corteza frontal de fetos con SD (Whittle *et al.*, 2007). Dado que GABA es excitador durante los estadios embrionarios (Ben-Ari *et al.*, 2012; Miles *et al.*, 2012), esta reducción de sus niveles podría dar lugar a una sobre-inhibición. Sin embargo, estudios realizados en niños de entre 3 y 17 años, cuando GABA ya ejerce un efecto inhibitor, mediante espectroscopía por resonancia magnética (*Magnetic Resonance Spectroscopy*, MRS), han demostrado una disminución de los niveles de GABA en los lóbulos temporales, mientras que no han observado cambios en los lóbulos frontales (Smigielska-Kuzia y Sobaniec, 2007; Smigielska-Kuzia *et al.*, 2010). Estudios postmortem mostraron que los niveles de GABA permanecen globalmente inalterados en adultos con SD y patología tipo Alzheimer (Seidl *et al.*, 2001). Sin embargo, en el hipocampo y la corteza temporal

de personas con SD y enfermedad de Alzheimer se ha observado un déficit significativo de GABA. Estos resultados son probablemente debidos a la pérdida de neuronas corticales que contienen este neurotransmisor (Reynolds y Warner, 1988).

Por lo tanto, el hecho de que diferentes estudios hayan encontrado concentraciones de GABA normales o reducidas en adultos con SD, hace improbable que la posible sobre-inhibición presente en el cerebro de los individuos con SD sea consecuencia de un incremento de las concentraciones de GABA.

Aunque no se hayan encontrado cambios en las concentraciones del neurotransmisor, se ha propuesto que este exceso de inhibición mediada por los receptores GABA_A y GABA_B es uno de los principales mecanismos responsables de los déficits cognitivos que presentan las personas con SD (Martínez-Cué *et al.*, 2014). En modelos animales de SD se ha establecido que el desequilibrio excitación/inhibición mediado por estos receptores tiene un papel en la reducción de la LTP (Siarey *et al.*, 1999; Kleschevnikov *et al.*, 2004) que junto a las alteraciones en la neurogénesis hipocampal adulta parecen ser las principales causas de los déficits cognitivos presentes en estas personas.

2.1. El receptor GABA_A y la subunidad $\alpha 5$

Los receptores GABA_A están formados por cinco subunidades ($\alpha 1-6$; $\beta 1-3$; $\gamma 1-3$; δ ; ϵ ; θ ; π) que forman un canal de cloro (**figura 3**). Cada subunidad tiene un dominio transmembrana y porta lugares de unión para GABA y otros moduladores (benzodiazepinas, barbitúricos, etc.). En el cerebro adulto, la unión de GABA al receptor GABA_A y su posterior apertura dan lugar a la entrada de iones cloro al interior de la célula. Como consecuencia se produce la hiperpolarización de la membrana, provocando la inhibición de la actividad neuronal (Potier *et al.*, 2014). Su acción es regulada dinámicamente por una amplia gama de mecanismos moleculares para ajustar la fuerza de la inhibición a las necesidades cambiantes de las redes neuronales.

Los receptores GABA_A que contienen la subunidad $\alpha 5$ se expresan principalmente en el hipocampo. En concreto, están localizados fundamentalmente en la base de las

espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo tanto en roedores como en humanos (Laurie *et al.*, 1992; Fritschy y Möhler, 1995; Lingford-Hughes *et al.*, 2002; Olsen y Sieghart, 2009; Klausberger, 2009) y se ha demostrado que dicha subunidad está implicada en los procesos de memoria y aprendizaje (Möhler *et al.*, 1996; Rudolph y Möhler, 2006). Los receptores GABA_A α 5 son receptores extrasinápticos con respuestas tónicas (Banks y Pearce, 2000; Glykys y Mody, 2006; Brickley y Mody, 2012).

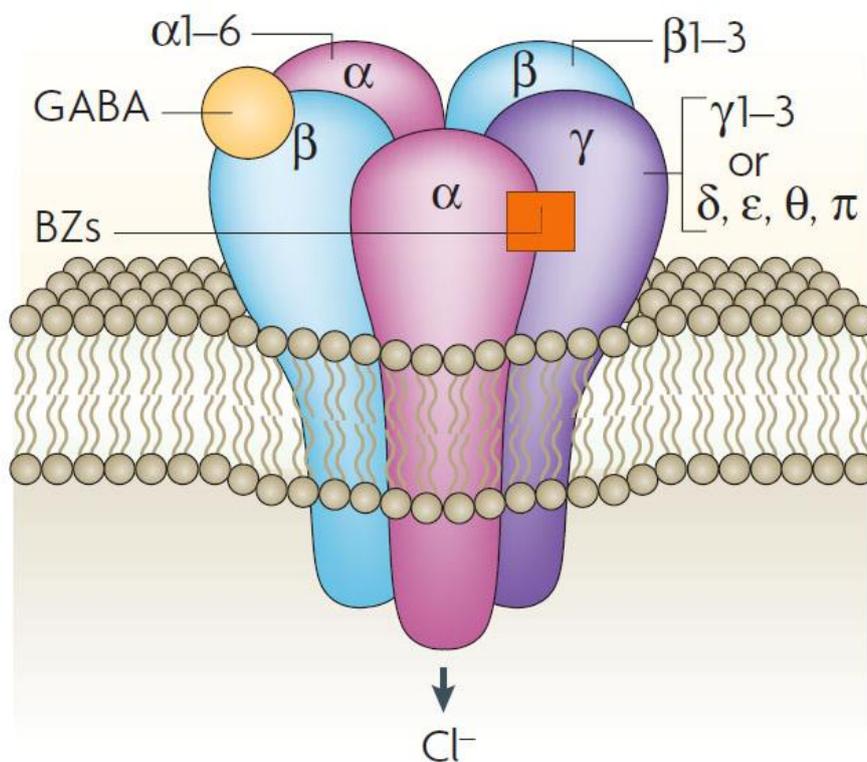


Figura 3. Estructura del receptor GABA_A. Cinco subunidades de siete subfamilias de subunidades (α , β , γ , δ , ϵ , θ , π) se ensamblan para formar un canal de cloro permeable. La mayoría de los receptores GABA_A expresados en el cerebro consisten en dos subunidades α , dos β , y una subunidad γ que puede ser sustituida por δ , ϵ o π . La unión con el neurotransmisor GABA se produce en la interfaz entre las subunidades α y β y provoca la apertura del canal, permitiendo la rápida afluencia de iones de cloro. La unión con las benzodiazepinas se produce en la interfase entre las subunidades α (1, 2, 3 ó 5) y la subunidad γ . Figura modificada de Jacob *et al.* (2008).

3. Modelos murinos de síndrome de Down

Gracias a las investigaciones realizadas con modelos animales se han producido grandes avances científicos que han permitido comprender mejor los mecanismos biológicos subyacentes a las alteraciones fenotípicas encontradas en el SD y poder así diseñar alternativas terapéuticas para esta condición.

Existe una gran similitud entre el genoma del ratón y del humano ya que ambos comparten muchas regiones sinténicas. De los 552 genes que se encuentran en el brazo largo del HSA21, 176 son ortólogos a los del ratón, aunque, estos últimos genes no se encuentran en un solo cromosoma, sino distribuidos en tres cromosomas murinos: el MMU16 con 115 genes ortólogos, el MMU17 con 20 genes ortólogos y el MMU10 con 41 genes ortólogos (Roubertoux y Carlier, 2010; Sturgeon y Gardiner, 2011).

Basándose en estas homologías se han desarrollado varios modelos murinos trisómicos para diferentes grupos de genes del HSA21. Estos modelos poseen unas características fenotípicas diferentes dependiendo de su composición cromosómica (**figura 4**). En general, se pueden agrupar en tres tipos de modelos: i) los que presentan un incremento, normalización o reducción del número de copias de genes ortólogos, (ii) aquellos modelos en los que se ha insertado la totalidad o parte del HSA21 en el genoma del ratón y (iii) los modelos en los que se ha insertado una copia extra total o parcial de alguno de los cromosomas murinos que albergan los genes ortólogos a los encontrados en HSA21. La validez de cada uno de los modelos diseñados depende de su similitud con la patología en el humano. Es decir, para considerarse un buen modelo deberá de existir una similitud entre la etiopatogenia de la condición humana y la del modelo animal (en el caso de los modelos de SD, la triplicación de los genes del HSA21 o de sus ortólogos). A su vez, deberá presentar las mismas características moleculares, celulares, morfológicas, fisiológicas y/o conductuales observadas en el trastorno humano y permitir, con la información que se obtenga de su estudio, realizar predicciones precisas de lo que ocurrirá en el ser humano (Crawley, 2004; Bourin *et al.*,

2007; Rueda *et al.*, 2012). Ésta última condición es particularmente importante para dilucidar los mecanismos neurobiológicos responsables de los déficits cognitivos encontrados en el SD que no pueden ser evaluados en humanos por razones éticas o prácticas y para el desarrollo y evaluación de nuevas terapias (Rueda *et al.*, 2012). A continuación, se describen las características más importantes de algunos de los modelos murinos usados en el estudio del SD (ver Rueda *et al.*, 2012).

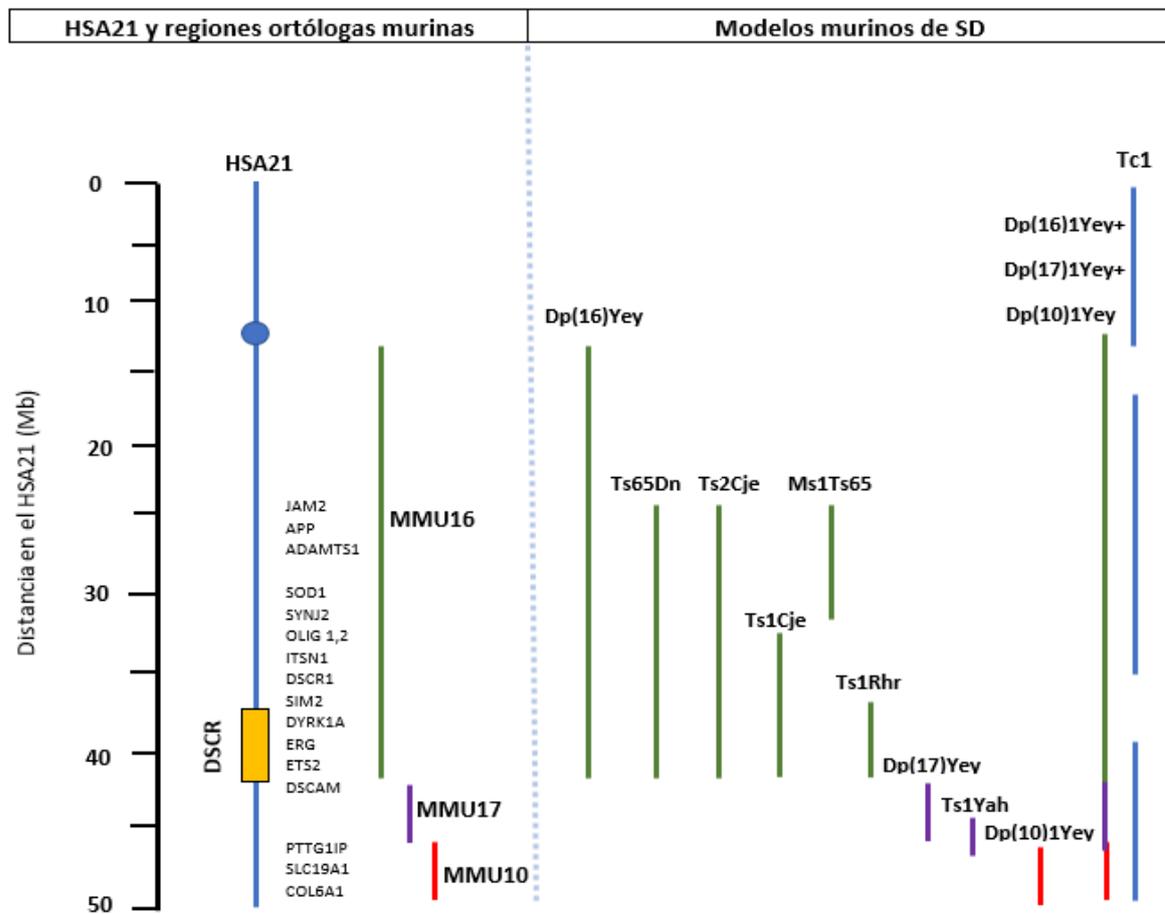


Figura 4. Representación esquemática del HSA21 y las regiones ortólogas murinas del MMU16 (verde), MMU17 (morado) y MMU10 (rojo) y de la extensión de la trisomía en los diferentes modelos murinos de SD. El círculo azul indica el centrómero y el rectángulo naranja la posición aproximada de la DSCR. Figura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

La mayor parte de los modelos murinos de SD presentan una triplicación total o parcial del HSA21. El primer modelo de SD que se desarrolló fue el ratón **Ts16**, trisómico para el MMU16 completo (Gropp *et al.*, 1975). Este modelo no reproduce adecuadamente

las causas etiopatológicas del síndrome SD porque el MMU16 presenta sintonías con regiones del HSA3, HSA8, HSA16 y HSA21. Por tanto, el ratón Ts16 tiene triplicados muchos genes que no lo están en el SD. Además, su caracterización está limitada al periodo prenatal ya que los embriones de este modelo mueren en el útero haciendo imposible la evaluación del fenotipo en ratones jóvenes y adultos. A pesar de ello, este modelo ha permitido el estudio de importantes alteraciones inherentes al desarrollo del SNC o de las malformaciones cardíacas encontradas en muchos individuos con SD (Waller, *et al.*, 2000; Bambrick y Fiskum, 2008; Acuña *et al.*, 2012).

A continuación, se diseñó el que en la actualidad es el modelo murino de SD mejor caracterizado y más utilizado, el ratón **Ts65Dn**, creado en 1993 por Davisson *et al.* Este modelo tiene una trisomía parcial de un segmento del MMU16, desde el gen *Mrp139* hasta el gen *Znf295*, y contiene aproximadamente 92 genes ortólogos al 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 con el SD, especialmente a nivel del SNC. Por ello es el modelo 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 (Vacano *et al.*, 2012). Por todo ello ha sido el modelo de ratón elegido para desarrollar los estudios de esta tesis doctoral (ver descripción en el apartado 3.1).

Existen además otros modelos murinos de SD con trisomías parciales, como el ratón **Ts2Cje**, que porta el mismo segmento del MMU16 triplicado que el Ts65Dn, pero translocado al 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 **Ms1Ts65Dn**, que se obtuvo a partir del cruce entre los modelos Ts65Dn y Ts1Cje, tiene una trisomía parcial de 33 genes situados en el

MMU16 que se extiende desde *App* a *Sod1* (Sago *et al.*, 2000). Este ratón tiene menos alteraciones fenotípicas comunes con el SD que los anteriores modelos trisómicos (Sago *et al.*, 2000; Belichenko *et al.*, 2007; Moldrich *et al.*, 2007). Por otro lado, Olson *et al.* (2004) crearon el ratón **Ts1Rhr** que tiene triplicados 33 genes de la región comprendida entre los genes *Cbr1-Orf9*. Este ratón no presenta alteraciones craneofaciales ni los defectos cognitivos de los modelos anteriores (Richtsmeier, *et al.*, 2002; Olson *et al.*, 2007). 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/+**.

Para modelar la trisomía de los genes ortólogos al HSA21 localizados en el MMU17 se han generado dos modelos murinos: 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 la región del MMU17 sinténica al HSA21 completa, que contiene 19 genes ortólogos (Yu *et al.*, 2010a, 2010b; Sturgeon y Gardiner, 2011).

El último modelo generado con una trisomía segmentaria es un ratón que tiene triplicados los genes ortólogos al HSA21 localizados en el MMU10. El ratón **Dp(10)1Yey/+** es trisómico para la región del MMU10 sinténica a la parte distal del HSA21 que contiene 37 genes ortólogos (Yu *et al.*, 2010a; Sturgeon y Gardiner, 2011).

Una vez que los tres modelos trisómicos para todas las regiones sinténicas al HSA21 en el MMU10 (**Dp(10)1Yey/+**), el MMU16 (**Dp(16)1Yey/+**) y el MMU17 (**Dp(10)1Yey/+**) fueron generados, Yu *et al.* (2010a) los cruzaron para dar lugar a un ratón trisómico para todas las regiones sinténicas al HSA21 de los tres cromosomas, el ratón **Dp(10)1Yey/+; Dp(16)1Yey/+; Dp(10)1Yey/+**. Este es un nuevo modelo muy prometedor con una excelente validez ya que muestra varios fenotipos SD, aunque es difícil de criar y aún se encuentra sin terminar de caracterizar.

Por otro lado, el ratón **Tc1** presenta una trisomía casi total del HSA21 (O'Doherty *et al.*, 2005) y muestra numerosos fenotipos relevantes encontrados en el SD, como

malformaciones cardíacas similares a las observadas en personas con SD y déficits de aprendizaje y memoria (O'Doherty *et al.*, 2005; Reynolds, 2010; Duchon *et al.*, 2010; Haas *et al.*, 2013). Este modelo de SD es considerado uno de los más completos, sin embargo, también muestra varias limitaciones. Uno de los problemas es que presenta niveles variables de mosaicismo del HSA21 en diferentes tejidos, es decir, no todas sus células llevan una copia de HSA21 lo que dificulta el análisis de las consecuencias fenotípicas (Reeves *et al.*, 2006). Además, este modelo tiene una delección de aproximadamente 19 genes, por lo tanto, sólo tiene triplicados el 83 % de los genes del HSA21.

3.1. El ratón Ts65Dn como modelo de SD

El ratón Ts65Dn (TS) fue el primer modelo murino viable para el estudio del SD. Estos ratones se obtuvieron mediante una translocación Robertsoniana, resultado de la exposición experimental a radiación (Davisson *et al.*, 1990). El ratón TS muestra retraso en el desarrollo y anomalías en varios órganos, en particular en el cerebro, que se asemejan a las características patológicas que se observan en el SD. En la **tabla 1** se detallan las principales similitudes fenotípicas entre el SD y el ratón TS. Estos animales alcanzan la edad adulta y envejecen, lo que permite estudiarlos durante todas las etapas de la vida pre- y post-natal. Al igual que ocurre en el SD, las hembras TS pueden reproducirse, con una frecuencia aproximada de trisomía en la descendencia del 35 %. Sin embargo, los machos son estériles. La frecuencia de trisomía en la descendencia es menor a la esperada (50 %) debido a la pérdida de crías trisómicas durante la gametogénesis, en las últimas etapas de la gestación, inmediatamente después del nacimiento y durante las primeras semanas de vida debido a malformaciones cardíacas congénitas (Moore, 2006; Roper *et al.*, 2006).

Tabla 1. Principales características fenotípicas comunes entre el SD y el ratón TS. Adaptado de Rueda *et al.* (2012).

Alteraciones	SD	Ts65Dn
Volumen cerebral	Reducido	Reducido
Densidad neuronal	Reducida	Reducida
Volumen cerebelar	Reducido	Reducido
Densidad neuronal cerebelar	Reducida	Reducida
Neurogénesis	<ul style="list-style-type: none"> - Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales - Retraso del ciclo celular - Alteraciones en la neurodiferenciación - Alteraciones en la neurogénesis cerebelar 	<ul style="list-style-type: none"> - Alteraciones en la proliferación de los precursores neurales - Retraso del ciclo celular - Alteraciones en la neurodiferenciación - Alteraciones en la neurogénesis cerebelar
Neurodegeneración	<ul style="list-style-type: none"> - Neuropatología de tipo enfermedad de Alzheimer - Presencia de placas de β-amiloide y ovillos neurofibrilares - Pérdida de neuronas colinérgicas - Aumento del estrés oxidativo - Microglía sobreactivada - Aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en los niveles de APP y péptidos β-amiloides - Degeneración de las neuronas colinérgicas - Aumento del estrés oxidativo - Microglía sobreactivada
Dendritas y Espinas dendríticas	<ul style="list-style-type: none"> - Alteraciones en la morfología - Densidad reducida 	<ul style="list-style-type: none"> - Alteraciones en la morfología - Densidad reducida
Densidad sináptica		Reducida

Tabla 1 (Continuación)

<p>Balance excitación/inhibición</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Niveles reducidos de GABA en fetos - Niveles reducidos de glutamato y aspartato en adultos 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento del número de sinapsis inhibitoras - Disminución del número de sinapsis excitadoras - Redistribución de las sinapsis inhibitoras - Aumento del número de interneuronas GABAérgicas - Alteraciones en la estructura del receptor GABA_A
<p>Cognitivo-Conductuales</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Retraso en el desarrollo - Hiperactividad ocasional - Atención reducida - Alteración del aprendizaje - Alteración de la memoria - Adquisición tardía de habilidades motoras - Habilidades lingüísticas alteradas 	<ul style="list-style-type: none"> - Retraso en el desarrollo - Hiperactividad - Atención reducida - Alteración del aprendizaje - Alteración de la memoria - Adquisición tardía de habilidades motoras
<p>Otras</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Infertilidad varones - Menor respuesta al dolor - Alteraciones craneofaciales 	<ul style="list-style-type: none"> - Infertilidad machos - Menor respuesta al dolor - Alteraciones craneofaciales

Entre las numerosas características fenotípicas que comparten el ratón TS y las personas con SD se encuentran la braquicefalia, la reducción del tamaño de la mandíbula y del cráneo y de la distancia interorbital (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). Así como anomalías en el sistema inmunológico (Paz-Miguel *et al.*, 1999).

3.1.1. Alteraciones cognitivo-conductuales del ratón TS

Desde el punto de vista cognitivo, el ratón TS muestra un claro retraso en el desarrollo durante el periodo post-natal con alteraciones similares a las encontradas en personas con SD (Holtzman *et al.*, 1996). Al igual que en la condición humana (Nadel, 2003), el ratón TS muestra acusados déficits en su aprendizaje y memoria especialmente en la ejecución de las tareas dependientes de hipocampo, tales como en la prueba de reconocimiento de objetos (Fernández *et al.*, 2007), la alternancia espontánea en el laberinto en T o Y, que evalúan la memoria de trabajo (Belichenko *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009), y el laberinto acuático de Morris que analiza la memoria de trabajo y de referencia espacial (Belichenko *et al.*, 2007; Salehi *et al.*, 2009; Bianchi *et al.*, 2010b; Martínez-Cué *et al.*, 2014). Además, su memoria asociativa contextual está afectada en la prueba del condicionamiento del miedo (Salehi *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010b). Todas ellas son tareas 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 (Petrosini *et al.*, 1996; Gandhi *et al.*, 2000; Dickson *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista conductual, este ratón no presenta alteraciones en habilidades sensorimotoras tales como la fuerza de las extremidades anteriores, los reflejos posturales, el equilibrio o la capacidad de tracción (Escorihuela *et al.*, 1995; Baxter *et al.*, 2000). Sin embargo, muestran deterioro en la estabilidad y en la coordinación motora (Costa *et al.*, 1999). Además, el ratón TS es hiperactivo en la oscuridad (Escorihuela *et al.*, 1995; Reeves *et al.*, 1995; Holtzman *et al.*, 1996) y en situaciones que provocan precaución e inhiben el movimiento en los ratones normales, como en las pruebas del campo abierto y el laberinto elevado en cruz (Escorihuela *et al.*, 1995; Coussons-Read y Crnic, 1996; Martínez-Cué *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 2007). Esta hiperactividad puede deberse a la falta de inhibición de ciertos comportamientos o a un déficit en la capacidad de prestar atención a estímulos relevantes (Escorihuela *et al.*, 1998; Crnic y Pennington, 2000; Martínez-Cué *et al.*, 2006). De hecho, Driscoll *et al.* (2004) confirmaron la presencia de déficits de atención en el ratón TS. Muchas de

estas alteraciones cognitivas y conductuales también han sido encontradas en personas con SD (Reeves *et al.*, 1995; Pennington *et al.*, 2003; Edgin *et al.*, 2010).

3.1.2. Neuroanatomía y neurobiología del ratón TS

De manera similar a lo encontrado en el SD, el volumen cerebral también está reducido en el ratón TS durante el periodo embrionario pero, a diferencia del SD, no lo está tras el nacimiento o durante la edad adulta (Holtzman *et al.*, 1996; Aldridge *et al.*, 2007; Belichenko *et al.*, 2007; Chakrabarti *et al.*, 2007). Sin embargo, algunas estructuras encefálicas como el hipocampo o el cerebelo, que tienen un papel fundamental en los procesos cognitivos, sí presentan un volumen reducido durante la edad adulta (Baxter *et al.*, 2000; Lorenzi y Reeves, 2006; Bianchi *et al.*, 2010a, 2010b). Como ya se mencionó en apartados anteriores, la integridad anatomofuncional del hipocampo es necesaria 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 reducción de volumen de distintas estructuras del encéfalo del ratón TS está relacionada con una menor densidad celular de estas áreas, tal y como ocurre en las personas con SD, lo cual empobrece enormemente la conectividad cerebral. Sin embargo, esta menor celularidad no se observa en todas las áreas al mismo tiempo. Por ejemplo, el neocortex presenta una disminución de la densidad neuronal desde las etapas embrionarias tardías y postnatales tempranas, que se correlaciona con el retraso en la formación de sinapsis en la corteza y el hipocampo (Chakrabarti *et al.*, 2007). Sin embargo, el número de neuronas en las áreas CA1-CA3 (Cornu Ammonis 1-3) del hipocampo es normal durante los primeros meses de vida (Lorenzi y Reeves, 2006) y disminuye a los 17-18 meses en CA1 (Insausti *et al.*, 1998). Además, el DG de este modelo de SD tiene un número reducido de células granulares a todas las edades estudiadas (Insausti *et al.*, 1998; Lorenzi y Reeves, 2006; Contestabile *et al.*, 2007; Rueda *et al.*, 2010; Bianchi *et al.*, 2010b). En el cerebelo del ratón TS también se observa una reducción en la densidad

de células granulares y de Purkinje desde etapas postnatales tempranas hasta la edad adulta (Baxter *et al.*, 2000; Roper y Reeves, 2006; Contestabile *et al.*, 2009a).

Al igual que en el SD, esta hipocelularidad encontrada en el ratón TS es debida a alteraciones en la neurogénesis pre- y post-natal. Estos animales presentan menor proliferación de los precursores neurales en la zona neocortical ventricular durante las etapas embrionarias (Chakrabarti *et al.*, 2007). Además, en el ratón TS el ciclo celular se encuentra ralentizado en las etapas embrionarias en CA3 (Chakrabarti *et al.*, 2007) y en las primeras etapas postnatales en el DG (Contestabile *et al.*, 2007).

En numerosas especies, incluidos roedores y 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.*, 1997, 2002; Van Praag *et al.*, 1999, 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 excitadoras 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 LTP y que juega un papel importante en el aprendizaje y la memoria dependientes de hipocampo (Malberg *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2002; Bianchi *et al.*, 2010a). Por lo tanto, la menor neurogénesis adulta y el deterioro de la LTP son dos importantes mecanismos que subyacen el deterioro cognitivo del ratón TS.

Por otro lado, como ocurre en las personas con SD (Risser *et al.*, 1997), diversos estudios han demostrado un deterioro del sistema colinérgico dependiente de la edad en el ratón TS. Como ya se ha mencionado, el sistema colinérgico es también un sustrato anatómico del aprendizaje y la atención (Baxter y Chiba, 1999; Bartus, 2000). A partir de los 6 meses de edad los ratones TS muestran una pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal, así como una disminución del tamaño de los somas de estas neuronas (Granholm *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2003). Esta hipocelularidad parece ser una de las causas de la discapacidad intelectual en la condición trisómica.

Respecto a la **neurodegeneración**, al contrario de lo que ocurre en las personas con SD de más de 40 años, los ratones TS no presentan placas seniles, ni ovillos neurofibrilares (Yu *et al.*, 2010b). Sin embargo, en el ratón TS de avanzada edad sí que se han observado procesos neurodegenerativos como la pérdida de neuronas colinérgicas, descrita en el apartado anterior, y de neuronas noradrenérgicas (Sánchez *et al.*, 2012), el incremento de los procesos de neuroinflamación (Kim y Suh, 2009) y un incremento del estrés oxidativo (Parisotto *et al.*, 2016). Estos ratones también muestran un incremento en los niveles de la proteína APP y de los péptidos A β (*Amyloid β* , β -amiloide), alteraciones típicas de la enfermedad de Alzheimer (Seo y Isacson, 2005).

3.1.3. Alteraciones en la neurotransmisión: sobreinhibición en el ratón TS

Como sucede en las personas con SD, en el ratón TS también se han observado alteraciones en varios neurotransmisores y cambios en la expresión y función de sus receptores (**tabla 1**) lo que da lugar a los característicos déficits cognitivos.

En lo que se refiere al **sistema serotoninérgico**, aunque los niveles del neurotransmisor 5-HT y el número de neuronas serotoninérgicas de los núcleos dorsal y medial del rafe son normales en el ratón TS (Megías *et al.*, 1997; Bianchi *et al.*, 2010b), el número de receptores 5HT_{1A} es menor en los ratones TS recién nacidos lo que puede ser una de las razones por las que la neurogénesis en el ratón TS se encuentra alterada (Bianchi *et al.*, 2010b), ya que este receptor está implicado en la regulación de la neurogénesis.

En el **sistema noradrenérgico**, como ocurre en las personas con SD, el ratón TS presenta una degeneración asociada al aumento de la edad, debido a que estos animales muestran una pérdida de neuronas en el *locus coeruleus* durante la etapa adulta (Salehi *et al.*, 2009). Este sistema también tiene un importante papel en la neurogénesis (Duman *et al.*, 2001) así como en el aprendizaje contextual (Murchison *et al.*, 2004). Por tanto, los déficits encontrados en este sistema pueden estar implicados en las alteraciones encontradas en ambos procesos en el ratón TS.

Como se describió en el apartado anterior, el **sistema colinérgico** septohipocampal, implicado en el aprendizaje, sufre una degeneración dependiente de la edad en el ratón TS (Cooper *et al.*, 2001; Granholm *et al.*, 2000).

Por otro lado, los daños encontrados en la LTP en el hipocampo del ratón TS se han relacionado con una activación reducida de los receptores NMDA (*N-metil-D-aspartato*) del **sistema glutamatérgico** (Kleschevnikov *et al.*, 2004).

Por último, el **sistema GABAérgico** es uno de los grandes implicados en los déficits cognitivos encontrados en el ratón TS.

En el ratón TS se ha observado un incremento del número de neuronas inhibitorias que es debida a la sobreexpresión de los genes *Olig1* y *Olig2* (Chakrabarti *et al.*, 2010; Pérez-Cremades *et al.*, 2010). La primera evidencia de que la sobreinhibición mediada por los receptores GABA_A podría ser parcialmente responsable de los déficits cognitivos del ratón TS se obtuvo en experimentos en los que se bloqueó farmacológicamente este receptor. La administración crónica de los antagonistas no selectivos del receptor GABA_A picrotoxina, bilobalida o pentilenotetrazol (PTZ) mejora la memoria dependiente del hipocampo en el ratón TS y normaliza su LTP (Kleschevnikov *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2007; Rueda *et al.*, 2008; Colas *et al.*, 2013). Por ello, se ha sugerido que la sobre-activación de los receptores GABA_A y GABA_B podría ser responsable del incremento de los potenciales postsinápticos inhibitorios observados en el hipocampo de este ratón (Kleschevnikov *et al.*, 2012), lo que daría lugar a los déficits en LTP y en aprendizaje característicos del ratón TS.

Por otro lado, está bien establecido que el sistema GABAérgico regula la proliferación, la migración, la diferenciación y la integración de las nuevas neuronas (Tozuka *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006; Earnheart *et al.*, 2007). Por tanto, el aumento de la inhibición mediada por GABA_A que se ha mostrado en los ratones TS podría estar implicado en las alteraciones de la proliferación y de la supervivencia neuronal y en sus déficits cognitivos.

4. Farmacoterapia dirigida a los receptores GABA_A

Está bien establecido que los moduladores alostéricos positivos (*Positive Allosteric Modulators*, PAM) no selectivos del receptor GABA_A deterioran los procesos de aprendizaje y memoria (Lister, 1985; Cole, 1986; Ghoneim y Mewaldt, 1990). Mientras que los moduladores alostéricos negativos (*Negative Allosteric Modulators*, NAM) no selectivos de este receptor mejoran los procesos cognitivos (Venault *et al.*, 1987; Jensen *et al.*, 1987; Sarter *et al.*, 2001; Venault y Chapouthier, 2007). Sin embargo, tanto los NAMs como los antagonistas no selectivos del receptor GABA_A no son adecuados para el tratamiento de los déficits cognitivos debido a sus efectos secundarios ansiogénicos y proconvulsivantes (Wetmore y Garner, 2010).

El papel de los receptores GABA_Aα5 en la cognición se ha confirmado en estudios realizados con ratones a los que se ha bloqueado el gen de la subunidad α5 o a los que se les ha administrado fármacos que bloquean selectivamente esta subunidad (Collinson *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2006). Los estudios realizados con ratones que carecían de la subunidad GABA_Aα5 demostraron la implicación de esta subunidad en procesos cognitivos, ya que estos ratones mostraron una mejor memoria y aprendizaje sin cambios en los niveles de ansiedad o en la aparición de convulsiones (Collinson *et al.*, 2002; Crestani *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2004). Dados estos efectos beneficiosos sobre el aprendizaje varias compañías farmacéuticas han desarrollado NAMs selectivos para los receptores GABA_Aα5.

4.1. Moduladores alostéricos negativos NAMs selectivos

El primer NAM selectivo para la subunidad GABA_Aα5 que se desarrolló fue **L-655 708**. La administración de este fármaco a ratones incrementa la LTP y el aprendizaje y memoria espacial sin producir convulsiones (Navarro *et al.*, 2002; Glykys *et al.*, 2008; Atack, 2011). Sin embargo, la administración de L-655 708 sí que produjo un efecto ansiogénico, probablemente por su actividad sobre otras subunidades además de las α5 (Atack, 2011).

Más tarde, la farmacéutica Merck diseñó **MRK-016**, otro candidato clínico con selectividad funcional para los receptores GABA_Aα5, que mejora la cognición sin efectos secundarios ansiogénicos o proconvulsivantes en animales (Atack, 2010). A continuación, la misma empresa diseñó otro NAM, llamado **α5IA** (Chambers *et al.*, 2004; Sternfeld *et al.*, 2004; Collinson *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2006), con una eficacia más alta sobre los receptores GABA_Aα5 que sobre los que contienen las subunidades α1, α2 o α3 (Sternfeld *et al.*, 2004; Potier *et al.*, 2014). Este fármaco mejora la cognición en los ratones TS sin provocar ansiedad o convulsiones. Por otro lado, α5IA aumenta la activación de los IEGs, en particular de los genes *c-Fos* y *Arc* en ratones TS (Braudeau *et al.*, 2011a). Dado que este tipo de genes parece estar implicado en el proceso de la consolidación de la memoria, el incremento de la activación de estos genes podría estar mediando los efectos procognitivos encontrados tras la administración de este fármaco (Braudeau *et al.*, 2011a). Sin embargo, otros estudios observaron que tras la administración de α5IA las ratas mostraban una mejoría en los procesos de codificación y recuperación de la información, pero no en el de consolidación (Collinson *et al.*, 2006).

Por último, Hoffmann-La Roche ha desarrollado tres NAMs, **RO4938581**, **R1** y **R2**, cuyos efectos sobre las alteraciones cognitivo-conductuales que muestra el ratón TS son el objeto de estudio de esta tesis doctoral. Estos tres NAMs muestran una selectividad superior por los receptores GABA_Aα5 que α5IA y MRK-016.

RO4938581 es un potente NAM de los receptores GABA_Aα5 (Knust *et al.*, 2009) con una mayor afinidad por los receptores GABA_A que contienen la subunidad α5 que por aquellos que contienen las subunidades α1, α2 o α3. Su selectividad, tanto funcional como de afinidad, ofrece un perfil ideal para la mejoría de la cognición sin los efectos secundarios relacionados con otras subunidades de receptores GABA_A. Ballard *et al.*, (2009) demostraron que el tratamiento con este fármaco ejerce efectos procognitivos en monos, ratas y ratones sin provocar ansiedad ni incrementar la probabilidad de padecer convulsiones. Por otro lado, estudios realizados en este laboratorio, revelaron que la administración de RO4938581 mejora la función cognitiva, la LTP y la neurogénesis de los ratones TS adultos (Martínez-Cué *et al.*, 2013).

Introducción

Estudios de toxicidad realizados por los laboratorios de Hoffman-La Roche han confirmado que la administración del fármaco es segura ya que no produce ningún tipo de toxicidad en otros órganos (datos no publicados).

Objetivos

La presente tesis doctoral tiene como **principal objetivo** evaluar el efecto de la administración de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA α 5 sobre los déficits cognitivos y conductuales del ratón Ts65Dn.

Los **objetivos concretos** son:

Estudio I: Evaluar los efectos de la administración crónica, durante etapas tempranas, de los NAMs RO4938581, R1 y R2, que actúan sobre los receptores GABA α 5, sobre los siguientes fenotipos del ratón Ts65Dn:

1. Actividad espontánea, reflejos sensorimotora y coordinación motora
2. Actividad general y ansiedad
3. Capacidad de atención y actividad exploratoria
4. Aprendizaje y memoria de referencia espacial

Estudio II: Evaluar el efecto de la administración subcrónica de RO4938581 al ratón Ts65Dn sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información durante el aprendizaje y memoria:

1. De referencia
2. De trabajo
3. Procedimental
4. Espacial

Material y métodos

1. Animales de experimentación

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

1.1. Mantenimiento y manipulación de los animales

Los ratones utilizados en este trabajo fueron estabulados en grupos de dos o tres en jaulas transparentes de plexiglás (20 x 22 x 20 cm) en condiciones estándar de laboratorio, a una temperatura de 22 ± 2 °C, con 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.) para realizar los estudios de comportamiento durante el periodo 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.

Para los dos estudios se utilizaron ratones Ts65Dn (TS) con trisomía segmentaria del cromosoma 16 murino (MMU16). Los ratones se obtuvieron cruzando hembras TS con machos híbridos C57BL/6Ei x C3H/HeSNJ (B6EiCSn) F1. La generación parental fue suministrada por The Robertsonian Chromosome Resources (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) y el apareamiento se realizó en el Servicio de Estabulación y Experimentación de la Universidad de Cantabria.

En todos los experimentos, los ratones TS fueron comparados con los controles disómicos (CO), con una dotación cromosómica normal, de las mismas camadas.

1.3. Cariotipado de los animales

Para poder diferenciar entre ratones CO y TS los animales fueron cariotipados mediante qPCR utilizando el protocolo descrito por Liu *et al.* (2003).

1.3.1. Preparación de las muestras

El ADN genómico necesario para el cariotipado de los animales se obtuvo mediante la digestión de fragmentos de cola de ratón. En el momento del destete de los animales (día posnatal 21) se tomaron muestras de aproximadamente 2 mm y se colocaron en un tubo de 1.5 ml tipo Eppendorf. Se añadieron 300 μ l de NaOH 50mM y se incubaron durante 30 minutos en un bloque seco Tembloc (JP Selecta, Barcelona, España) 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 μ l de Tris 1M (pH=8) para neutralizar la reacción. A continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 r.p.m. en una centrifuga Biofuge fresco (Heraeus Instruments, Hanau, Alemania) y se recogió el sobrenadante.

Para finalizar se cuantificó el ADN en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermoscientific, Waltham, MA, USA) (A260) y se diluyó en H₂O hasta una concentración de 20 ng/ μ l.

1.3.2. Cariotipado mediante qPCR cuantitativa en tiempo real

Como marcadores se usaron los genes codificantes para la proteína precursora del β -amiloide (*App*) y la de resistencia a Mixovirus 1 (*Mx1*). Ambos se encuentran situados cerca de los extremos proximal y distal, respectivamente, del segmento del cromosoma MMU16 triplicado en el ratón TS. Como control interno, para normalizar las variaciones en cantidad de ADN, 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 y sondas de tipo TaqMan específicos para cada gen. Para cuantificar simultáneamente el número de copias de los tres genes de interés, las sondas presentaban fluorocromos con longitud de onda máxima de excitación y emisión diferentes: VIC para el gen *ApoB* (538-554 nm) y FAM (494-518 nm) para *App* y *Mx1*. Para comparar cada par de genes se utilizó: 8 µl de ADN genómico diluido a 20 ng/µl (160 ng/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 (**tabla 2**) 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 (**tabla 2**) a una concentración de 5 µM (Applied Biosystems).

Tabla 2. Cebadores y sondas TaqMan utilizadas para la qPCR

	<i>App</i>	<i>Mx1</i>	<i>ApoB</i>
Cebador sentido	5'-TGC TGA AGA TGT GGG TTC GA-3'	5'-TCT CCG ATT AAC CAG GCT AGC TAT-3'	5'-CAC GTG GGC TCC AGC ATT-3'
Cebador antisentido	5'-GAC AAT CAC GGT TGC TAT GAC AA-3'	5'-GAC ATA AGG TTA GCA GCT AAA GGA TCA- 3'	5'-TCA CCA GTC ATT TCT GCC TTT G-3'
Sonda	5'-6FAM- CAA AGG CGC CAT CAT CGG ACT CA- TAMRA-3'	5'-6FAM- CTT TCC TGG TCG CTG TGC A- TAMRA-3'	5'-VIC-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, Derio, Vizcaya, 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 mediante el método Livak o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001), donde la cuantificación relativa de la expresión génica se realizó utilizando la fórmula:

$$Ratio = \frac{2^{(Ct\ ApoB - Ct\ App\ o\ Mx1)\ problema}}{2^{(Ct\ ApoB - Ct\ App\ o\ Mx1)\ control}}$$

Donde Ct (Cycle Threshold) es el ciclo de la qPCR en el cual se detecta un incremento significativo de la fluorescencia. Los resultados se presentan como cantidades en número de veces con respecto al control (calibre): valor de 1 para los animales CO y valor de 1.5 para los TS.

La evaluación 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.

1.4. Grupos experimentales y tratamientos farmacológicos

1.4.1. Estudio I: Efecto de la administración crónica, durante etapas tempranas, de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA_Aα5 sobre los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn

Para este primer estudio se utilizó un total de 99 ratones machos (**tabla 3**) que fueron tratados desde el día postnatal 21 hasta los 6-7 meses de edad. Los animales se dividieron en 4 grupos, cada grupo recibía un tratamiento distinto: RO4938581, R1, R2 o vehículo. Los experimentos o pruebas cognitivo-conductuales comenzaron cuando los animales tenían 5-6 meses de edad y duraron un mes durante el que todos los animales seguían recibiendo sus respectivos tratamientos. Los fármacos o el vehículo fueron administrados empezando siempre a la misma hora de la mañana (10:00 horas).

Tabla 3. Número de animales utilizados en cada grupo experimental del Estudio I

Tratamiento	TS	CO	Total
RO4938581	11	13	24
R1	13	14	27
R2	10	13	23
Vehículo	12	13	25
Total	46	53	99

El objetivo de este estudio era evaluar los efectos de la administración desde etapas tempranas de tres NAMs selectivos para la subunidad GABA_Aα5, RO4938581, R1 y R2 (cedidos por F. Hoffmann-La Roche Ltd.), sobre los déficits cognitivos del ratón TS. Los tres compuestos fueron administrados a una concentración 20 mg/kg en una única dosis diaria por vía subcutánea. Esta dosis se eligió porque daba lugar a unas concentraciones plasmáticas de los tres fármacos que, en el caso de RO4938581, se correlacionaba con una ocupación de los receptores GABA_Aα5 del 50-70 % en el hipocampo y con una mejoría cognitiva (Martínez-Cué *et al.*, 2013). Los animales del grupo vehículo recibieron salino a través de la misma vía de administración.

1.4.2. Estudio II: Estudio del efecto de la administración de un modulador alostérico negativo para la subunidad α5 del receptor GABA_A sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información en el ratón Ts65Dn

En el segundo estudio se administró el NAM RO4938581 y se valoró su efecto sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información. Para ello se utilizó un total de 127 ratones machos (**tabla 4**) que tenían entre 5 y 7 meses de edad al inicio del tratamiento. En este caso, los animales fueron tratados únicamente durante los 16 días en que se realizaron las pruebas cognitivo-conductuales. RO4938581 fue administrado a una dosis de 20 mg/kg oralmente, mediante sonda intragástrica, disuelto en el vehículo (batido de chocolate, Puleva, Granada, España). Para comprobar que se estaban alcanzando las concentraciones plasmáticas correctas, se obtuvieron muestras de sangre de ratones CO y TS tratados de los tres grupos desde

Material y métodos

el inicio del tratamiento, dichas muestras eran enviadas a F. Hoffmann-La Roche Ltd. para su análisis.

Para este estudio se utilizaron 12 grupos experimentales (ver **tabla 4**) CO y TS tratados con RO4938581 o vehículo antes de la *codificación*, de la *consolidación* o de la *recuperación* de la información en una tarea de aprendizaje espacial (ver apartado 2.2.1.). Todos los animales recibieron el fármaco o el vehículo por la tarde, empezando siempre a la misma hora (15:00 horas).

Tabla 4. Número de animales utilizados en cada grupo experimental del Estudio II

Tratamiento	CODIFICACIÓN		CONSOLIDACIÓN		RECUPERACIÓN		Total
	CO	TS	CO	TS	CO	TS	
RO4938581	14	9	11	10	10	10	64
Vehículo	14	6	11	10	11	11	63
Total	28	15	22	20	21	21	127

2. Caracterización cognitivo-conductual

A continuación, se describirán las pruebas cognitivo-conductuales que se realizaron a los animales en cada uno de los estudios.

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. Las pruebas se realizaron en el siguiente orden: actimetría, pruebas sensorimotoras, rotarod, campo abierto, tabla de agujeros y laberinto acuático de Morris.

Todos los experimentos se realizaron a ciegas con respecto al tratamiento y al cariotipo de los animales con el fin de prevenir posibles sesgos.

2.1. Estudio I: Efecto de la administración crónica de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA_Aα5, sobre los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn

2.1.1. Actividad espontánea: actimetría

En esta prueba se evaluó la variación circadiana de la actividad locomotora espontánea de los animales en su jaula habitual 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. Durante un ciclo continuo de 24 horas (12 horas de luz y 12 de oscuridad) se registró la actividad espontánea de los animales 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 media por cada uno de los grupos objeto de estudio.

2.1.2. 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 Martínez-Cué *et al.* (2013).

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) 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.

c) 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 (3) si caía sobre las cuatro patas, (2) si caía sobre un lado, (1) si caía de espaldas y (0) si no se daba la vuelta al ser colocado de espaldas sobre una superficie plana (reflejo de enderezamiento en superficie).

d) 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 sujeta con las patas delanteras ejerciendo resistencia a ser separado de ella. Se puntuó (4) si el agarre era muy eficaz, (3) si se sujetaba activamente, (2) si lo hacía de forma moderada, (1) si se agarraba levemente y (0) si no se agarraba.

e) 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).

f) 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 5**). 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).



Figura 5. Prueba de equilibrio sobre barra de madera (A) y de aluminio (B). Prueba de la percha (C).

g) 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 5**). 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.

h) Coordinación motora: rotarod

Esta prueba se utilizó para evaluar la coordinación motora de los animales siguiendo el protocolo descrito por Martínez-Cué *et al.* (2013). Para ello se utilizó un Rotarod (UGO BASILE, Comerio, VA, Italia). El aparato consta de un rodillo de plástico, con una superficie estriada para facilitar el agarre, de 37 cm de longitud que gira a distintas velocidades y está dividido por 6 discos de plástico de 12 cm de diámetro que separan el rodillo en 5 compartimentos, en cada uno de los cuales se puede introducir un ratón y medir la ejecución de 5 animales a la vez (**figura 6**). Este aparato tiene incorporados cinco contadores individuales de tiempo que se detienen cuando el animal cae del rodillo.



Figura 6. Prueba de coordinación motora en el rotarod.

Se realizaron 4 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 dos ensayos a velocidades de 25 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 era de 300 segundos (coincidiendo con el momento en el que se alcanzaba la velocidad máxima).

2.1.3. 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 7**).

En una única sesión de 5 minutos se midió la actividad horizontal (distancia recorrida en el centro y en la periferia del aparato) 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, Colorado, USA).

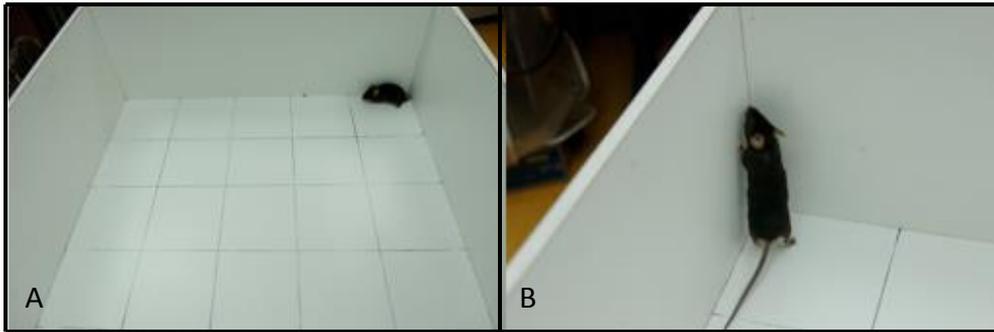


Figura 7. Prueba del campo abierto. En la imagen se observa al animal realizando actividad horizontal en la periferia (A) y actividad vertical (B).

b) Laberinto elevado en cruz

Para valorar distintos parámetros relacionados con la ansiedad se utilizó 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 transparente (5 cm de ancho x 30 cm de largo) elevados 40 cm sobre el suelo (**figura 8**).

La prueba consistió en un único ensayo de 5 minutos en el que se colocó al ratón en el centro del aparato y se contabilizó el tiempo de inmovilidad inicial, el número de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y cerrados. Como criterio de entrada en los distintos brazos se consideró que el ratón debía introducir en ellos 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 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 ANY-maze.



Figura 8. 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).

2.1.4. 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 9**). 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 recientemente explorados (índice ABA).



Figura 9. Prueba de la tabla de agujeros. En la imagen se observa un animal realizando una exploración o *head-dipping*.

2.1.5. Aprendizaje y memoria espacial: laberinto acuático de Morris

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 *et al.*, 1982).

La prueba se realizó 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 10**). Cada dos sesiones se vaciaba el tanque y se cambiaba el agua.

En este estudio el experimento consistió en doce sesiones diarias consecutivas (**figura 11**): ocho sesiones de adquisición (plataforma sumergida en una posición distinta cada día), seguidas de cuatro sesiones de aprendizaje guiado (plataforma visible en una posición distinta cada día). A continuación, se detalla el protocolo experimental.

Sesiones de adquisición

En las sesiones de adquisición (sesiones 1 a 8) la plataforma permaneció sumergida 2 cm por debajo del nivel del agua (**Figura 10**). Durante estas sesiones, la posición de la plataforma varió cada día entre cuatro posiciones posibles: este, suroeste, centro y noroeste (E, SO, centro y NO) (**Figura 10**). 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 o 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 la plataforma 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. Todos los ensayos fueron grabados con una cámara ubicada 2 m por encima del nivel del agua. Se utilizó el sistema de seguimiento computarizado ANY-maze para analizar las trayectorias de los ratones, medir sus latencias de escape, distancias recorridas y la velocidad de natación para cada animal en cada ensayo.

Con este experimento se evaluó el aprendizaje espacial a largo plazo o de referencia examinando la latencia de escape del animal a lo largo de las sesiones.

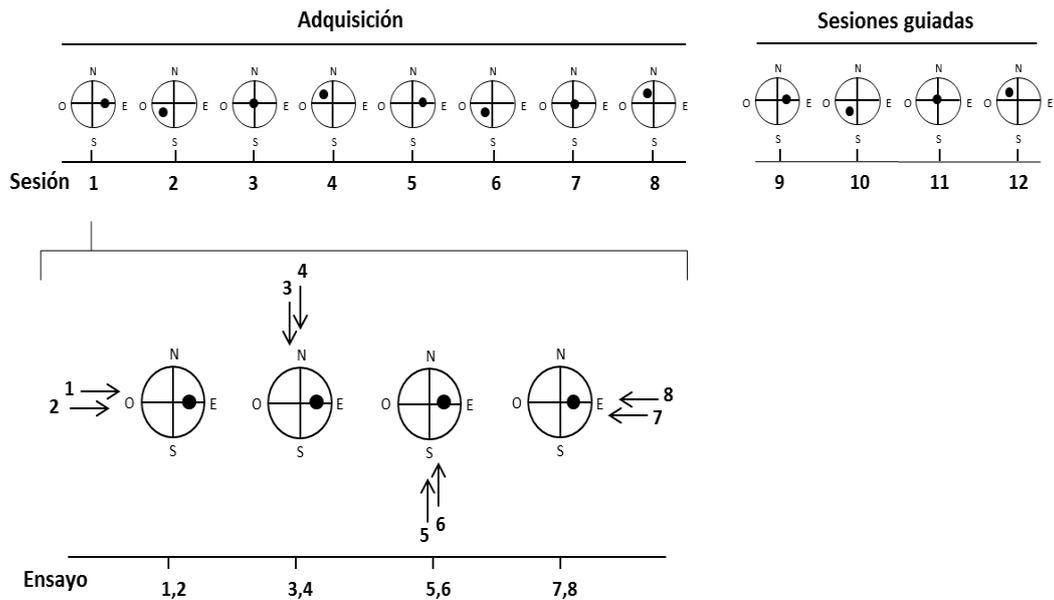


Figura 10. Esquema del protocolo utilizado en laberinto acuático de Morris en el Estudio I.

Sesiones de aprendizaje guiado

Para descartar la influencia de factores motivacionales o sensorimotore 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 (Figura 11). 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 de 4 pares de ensayos cada una. El procedimiento experimental fue idéntico al empleado en las sesiones de adquisición.

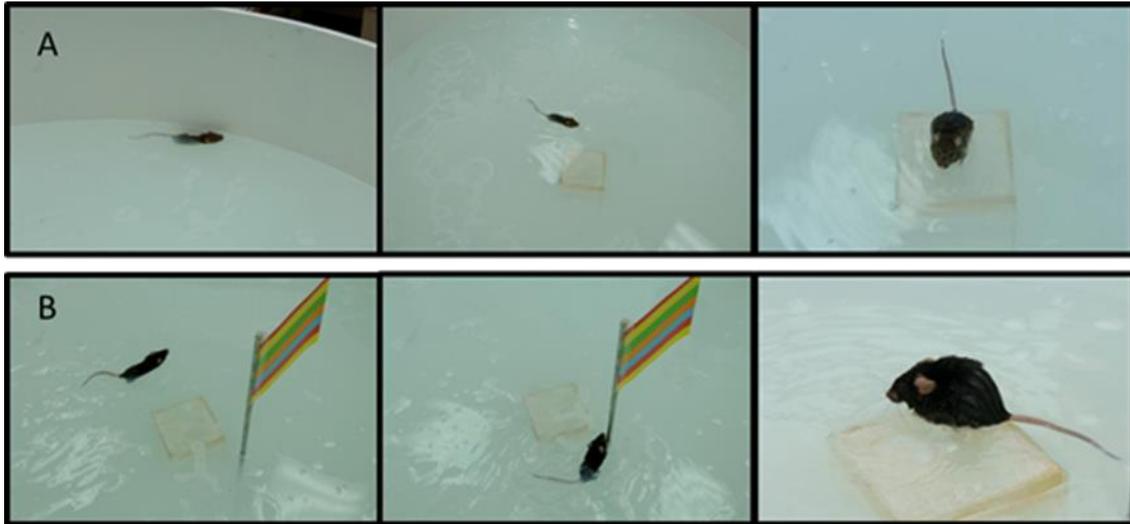


Figura 11. Prueba del laberinto acuático de Morris. Secuencia de una sesión de adquisición en la que el animal nada hasta encontrar la plataforma situada 2 cm por debajo del nivel del agua (A). Secuencia en una sesión de aprendizaje guiado en la que la plataforma se encuentra por encima del nivel del agua y está señalizada con una bandera (B).

2.2. Estudio II: Estudio del efecto de la administración subcrónica de un modulador alostérico negativo para la subunidad $\alpha 5$ del receptor $GABA_A$ sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información en el ratón Ts65Dn

2.2.1. Aprendizaje y memoria espacial: laberinto acuático de Morris

Al igual que en el apartado anterior para la valoración del aprendizaje y la memoria espacial se utilizó una versión modificada del laberinto acuático de Morris (Morris *et al.*, 1982). El protocolo del experimento era igual que el descrito en el apartado anterior con algunas variaciones que se describirán a continuación.

En este caso el experimento consistió en dieciséis sesiones diarias consecutivas (**figura 12**): 8 sesiones de adquisición (plataforma sumergida en una posición distinta cada día), seguidas de 4 sesiones extra de adquisición utilizando el protocolo estándar (plataforma sumergida en la misma posición los 4 días), de un ensayo de retirada de la plataforma y de 4 sesiones de aprendizaje guiado (plataforma visible en una posición distinta cada día).

El protocolo seguido en las primeras 8 sesiones de adquisición y en las sesiones de aprendizaje guiado fue el mismo que el descrito en el Estudio I. A continuación, se explicará el protocolo en las sesiones extra de adquisición.

Sesiones extra de adquisición

En este estudio se realizaron 4 sesiones adicionales (sesiones 9 a 12) en las que se procedió del mismo modo que en las primeras 8 sesiones de adquisición para el análisis del aprendizaje espacial excepto que, en estas sesiones, la posición de la plataforma permaneció constante (noroeste). Tras la última sesión de adquisición se realizó un único ensayo de 60 s en el que la plataforma era retirada (**figura 12**) para evaluar si los ratones recordaban la posición de la plataforma (memoria espacial). Para ello se analizaron el número de cruces sobre la posición donde se encontraba la plataforma en las últimas 4 sesiones y el porcentaje de tiempo que permanecía en cada cuadrante.

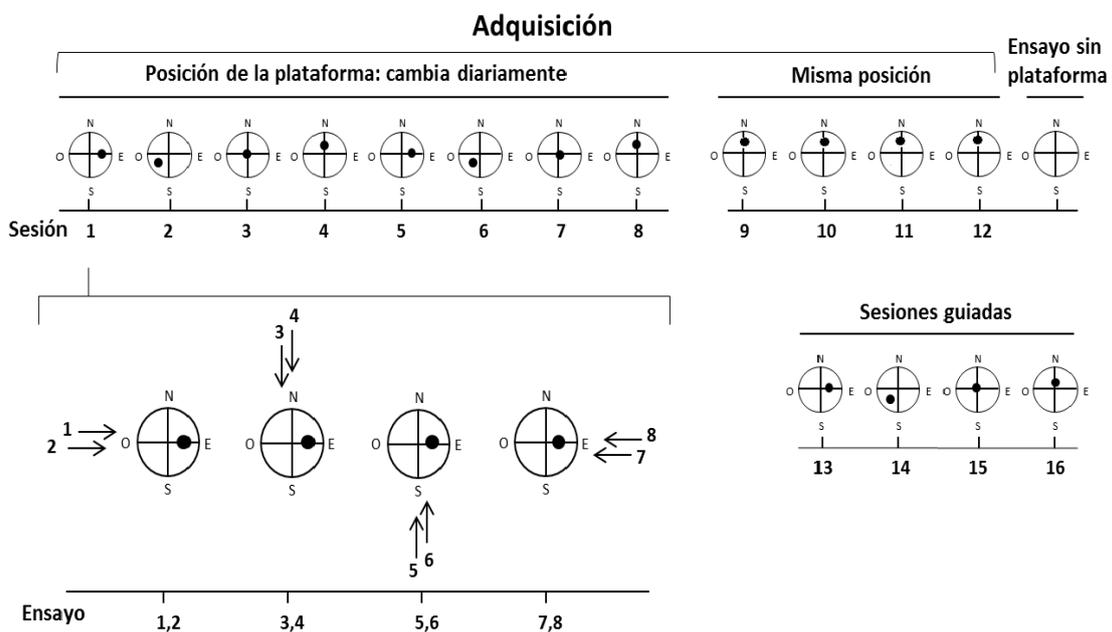


Figura 12. Esquema del protocolo utilizado en el Estudio II para la realización del MWM.

Este protocolo experimental 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, el **aprendizaje procedimental**, analizando la tigmotaxis, y la **memoria espacial**, analizando los patrones de búsqueda de la plataforma en el ensayo sin plataforma.

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 codificada 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.

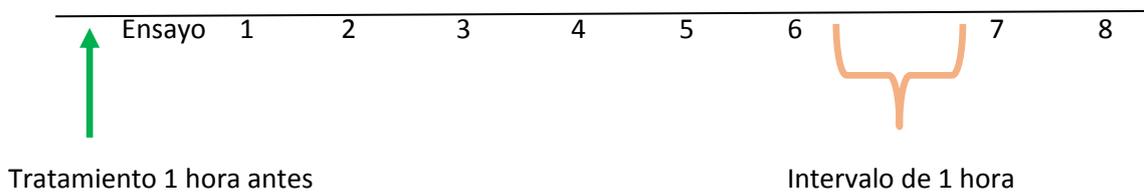
Por último, a lo largo de las sesiones el animal debe aprender a inhibir conductas inadecuadas, como nadar cerca de las paredes del tanque (tigmotaxis) o en círculos concéntricos a cierta distancia de la pared hasta hallar la plataforma (Maei *et al.*, 2009); esto constituiría el **aprendizaje de procedimiento**.

Protocolo de administración del fármaco

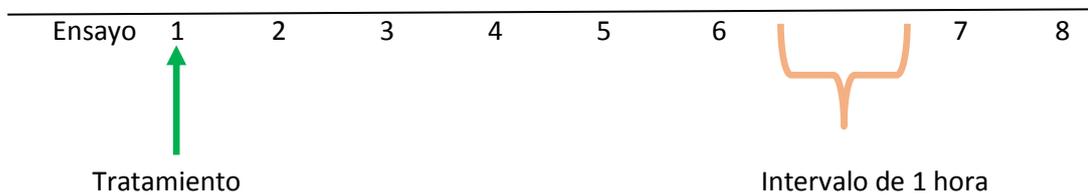
Como se mencionó en el apartado 1.4.2 los animales fueron tratados durante los 16 días que duró el experimento. El momento en que se administraba el fármaco o el vehículo dependía del grupo al que pertenecieran los ratones (ver **figura 13**).

Dado que el efecto máximo de RO4938581 se observa a la hora de la administración, se trató a los ratones TS y CO del grupo de *codificación* con el fármaco o el vehículo una hora antes de comenzar la prueba de aprendizaje, para que estos animales codificaran la información de la situación de la plataforma realizando los ensayos de entrenamiento durante este pico máximo (**figura 13A**).

A. Grupo de codificación



B. Grupo de consolidación



C. Grupo de recuperación

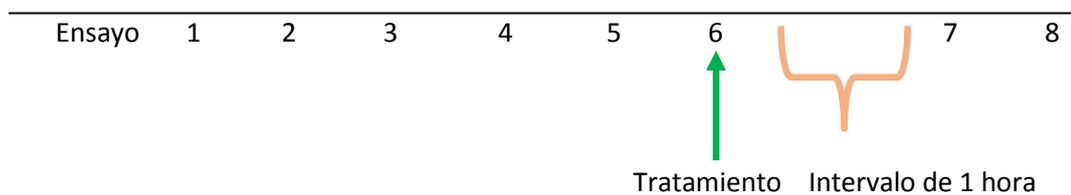


Figura 13. Tiempos de administración del tratamiento en los distintos grupos experimentales (A: codificación, B: consolidación y C: recuperación) en cada sesión del laberinto acuático de Morris.

A los ratones del grupo de *consolidación* se les administró el fármaco o el vehículo inmediatamente antes de comenzar la prueba para que el efecto máximo de RO4938581 coincidiera con el momento en que los ratones están consolidando la información de la posición de la plataforma (**figura 13B**). Por último, el grupo de *recuperación* recibió el fármaco o el vehículo una hora antes de realizar los dos ensayos finales, ya que se estableció un intervalo de descanso de 1 hora entre el ensayo 6 y los dos últimos ensayos con el fin de determinar si el fármaco ejercía algún efecto sobre la recuperación de la información cuando era administrado justo después del ensayo 6 cuando la información estaba codificada y almacenada (**figura 13C**).

3. Análisis estadístico de los resultados

Todos los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 21 (Armonk, New York, USA).

Para la caracterización cognitivo conductual se utilizó el programa ANY-maze 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 de Medidas Repetidas ('sesión' x 'cariotipo' x 'tratamiento') para el Estudio I y MANOVA de Medidas Repetidas ('sesión' x 'cariotipo' x 'tratamiento' x 'proceso') para el Estudio II. Los datos del resto de estudios conductuales del Estudio I se analizaron mediante MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') 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.

Resultados

1. Estudio I: Efecto de la administración crónica, durante etapas tempranas, de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA_Aα5 sobre los déficits cognitivos y conductuales del ratón TS65Dn

1.1. Actividad espontánea, reflejos sensorimotores y coordinación motora

Para evaluar si la administración de los distintos NAMs modificaba el estado físico de los animales de manera que pudiera interferir en su ejecución en las pruebas cognitivas, se realizó un estudio de la actividad espontánea, una batería de pruebas sensorimotoras y una valoración de la función motora de los animales.

1.1.1. Actimetría

La **figura 14** muestra la actividad espontánea de los ratones TS y CO bajo las distintas condiciones de tratamiento durante un ciclo completo de luz-oscuridad de 24 horas. A pesar de que la **figura 14B** muestra una tendencia de los ratones TS y CO a presentar menor actividad durante la fase de actividad tras el tratamiento con los distintos NAMs, esta tendencia no alcanzó la significación estadística ($p=0.075$, ver **tabla 5**). Por tanto, el genotipo o los distintos tratamientos no modificaron significativamente la actividad realizada por los ratones en su jaula habitual durante la fase de oscuridad o la de luz (**figuras 14A y 14B y tabla 5**).

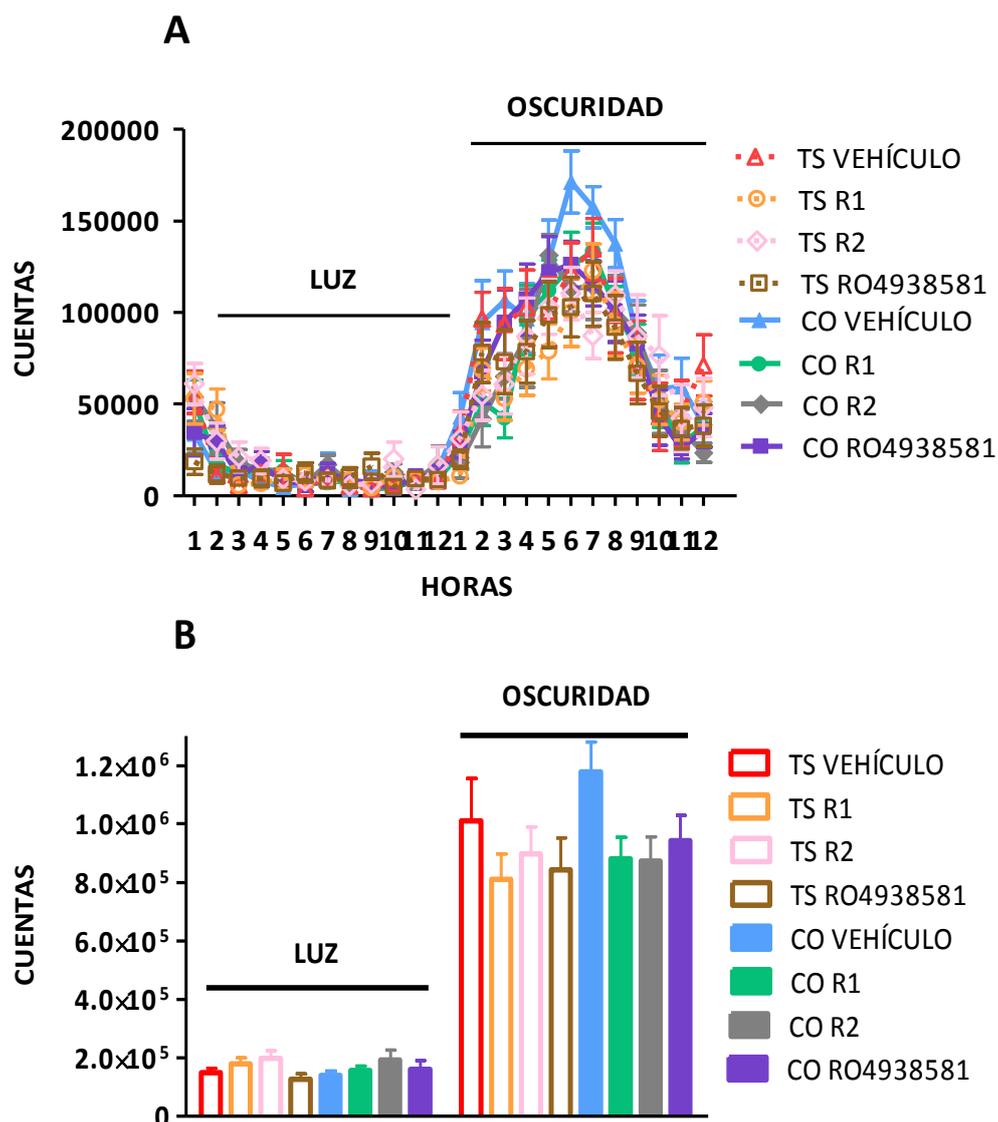


Figura 14. El tratamiento con R1, R2 o RO4938581 no modificó la actividad espontánea de los grupos TS o CO durante la fase de oscuridad ni durante la fase de luz en la prueba de la actimetría. Medias \pm E.E.M. del número de cuentas realizadas por cada grupo de animales a lo largo de las 24 horas de registro (A) y del número medio de cuentas realizadas por cada grupo en los periodos de luz y de oscuridad (B).

Tabla 5. Prueba de actimetría. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de cada variable analizada en la prueba de la actimetría

	MANOVAs 'Cariotipo x Tratamiento'		
	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento'
	F (1,98)	F (3,98)	F (7,98)
Oscuridad	0.01, p=0.92	2.37, p=0.075	0.66, p=0.57
Luz	1.70, p=0.19	2.57, p=0.059	0.15, p=0.92

1.1.2. Batería de pruebas sensoriales y motoras

La **tabla 6** muestra las puntuaciones obtenidas por los ratones TS y CO tratados con vehículo, R1, R2 o RO4938581 en las diferentes pruebas sensorimotoras.

Aunque en la mayoría de pruebas no se encontraron diferencias entre los distintos grupos, los ratones TS bajo todos los tratamientos presentaron una mayor respuesta de sobresalto, un menor equilibrio en la barra de madera y una alteración del reflejo prensil, lo que indica una mayor respuesta a estímulos auditivos y una peor coordinación motora en estos ratones (**tabla 6**).

La administración crónica de los tres NAMs no afectó a las habilidades sensorimotoras o a la coordinación motora de los ratones ratones TS o CO (**tabla 6**).

Resultados

Tabla 6. Batería de pruebas sensorimotoras. Media \pm E.E.M. de las puntuaciones obtenidas por los distintos grupos experimentales y valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de cada variable analizada en la batería de pruebas reflejas y motoras.

	TS				CO				MANOVAs 'Cariotipo x tratamiento'		
	Vehículo	R1	R2	RO4938581	Vehículo	R1	R2	RO4938581	Car	Trat	'Car x trat'
									F _(1,98)	F _(3,98)	F _(7,98)
Repuesta de alcance (puntuación: 0-4)	2.06 \pm 0.18	2.53 \pm 0.16	2.50 \pm 0.23	2.4 \pm 0.13	2.53 \pm 0.18	2.50 \pm 0.13	2.83 \pm 0.16	2.61 \pm 0.14	1.60 p=0.20	0.35 p=0.78	0.40 p=0.74
Respuesta de sobresalto (puntuación: 0-3)	1.30 \pm 0.17	1.40 \pm 0.13	1.33 \pm 0.14	1.00 \pm 0.10	0.84 \pm 0.15	0.92 \pm 0.07	0.91 \pm 0.08	0.92 \pm 0.13	15.26 p<0.001	0.95 p=0.41	1.10 p=0.35
Reflejo de enderezamiento (puntuación: 0-3)	3.00 \pm 0.00	0.00 p=1.00	0.00 p=1.00	0.00 p=1.00							
Fuerza de agarre (puntuación: 0-3)	2.46 \pm 0.14	2.26 \pm 0.26	2.50 \pm 0.23	1.63 \pm 0.24	2.38 \pm 0.26	2.71 \pm 0.22	2.75 \pm 0.27	2.25 \pm 0.32	3.07 p=0.06	2.55 p=0.08	0.71 p=0.548
Equilibrio en barra de madera (puntuación: 0-6)	2.6 \pm 0.20	3.13 \pm 0.30	3.41 \pm 0.31	3.14 \pm 0.32	3.53 \pm 0.43	3.35 \pm 0.24	3.58 \pm 0.46	4.00 \pm 0.40	5.13 p=0.026	0.60 p=0.612	0.72 p=0.53
Latencia de caída de la barra de madera (s)	40.0 \pm 0.00	40.0 \pm 0.00	40.0 \pm 0.0	40.0 \pm 0.00	40.0 \pm 0.00	40.0 \pm 0.00	40.0 \pm 0.00	40.0 \pm 0.00	0.00 p=1.00	0.00 p=1.00	0.00 p=1.00
Equilibrio en barra de aluminio (puntuación: 0-6)	2.07 \pm 0.61	1.73 \pm 0.44	1.41 \pm 0.55	2.28 \pm 0.48	2.30 \pm 0.57	1.42 \pm 0.32	2.33 \pm 0.48	2.46 \pm 0.48	0.62 p=0.43	1.08 p=0.35	0.50 p=0.68
Latencia de caída de la barra de aluminio (s)	30.41 \pm 2.91	25.35 \pm 3.28	20.33 \pm 4.00	27.72 \pm 2.54	29.76 \pm 3.31	31.84 \pm 2.04	31.25 \pm 2.99	28.66 \pm 3.02	1.87 p=0.17	0.56 p=0.63	2.31 p=0.08
Reflejo prensil (puntuación: 0-3)	2.46 \pm 0.18	3.00 \pm 0.00	2.50 \pm 0.23	2.76 \pm 0.12	3.00 \pm 0.00	2.78 \pm 0.15	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00	8.1 p=0.005	1.02 p=0.38	3.73 p=0.014
Capacidad de tracción (puntuación: 0-9)	2.38 \pm 0.85	4.00 \pm 0.58	2.08 \pm 0.69	3.78 \pm 0.86	3.25 \pm 0.95	2.85 \pm 0.73	3.83 \pm 0.80	4.30 \pm 0.96	0.75 p=0.38	0.93 p=0.42	1.15 p=0.33
Latencia de caída en la percha (s)	31.15 \pm 6.85	24.53 \pm 5.32	29.58 \pm 7.76	35.28 \pm 6.60	33.38 \pm 6.48	34.50 \pm 6.40	47.00 \pm 6.24	38.07 \pm 5.51	3.34 p=0.071	0.76 p=0.51	0.53 p=0.65
Nº de cruces en la percha	3.25 \pm 0.93	2.64 \pm 0.62	3.22 \pm 1.13	3.63 \pm 0.82	3.00 \pm 0.50	5.30 \pm 1.36	6.00 \pm 0.97	3.44 \pm 0.33	3.58 p=0.06	0.89 p=0.44	1.67 p=0.18
Latencia de llegada en la percha (s)	31.07 \pm 6.45	41.6 \pm 5.61	37.00 \pm 7.29	37.14 \pm 6.12	29.76 \pm 6.37	36.42 \pm 6.00	30.50 \pm 6.01	31.15 \pm 2.13	0.97 p=0.32	0.57 p=0.63	0.12 p=0.94

1.1.3. Rotarod

De manera consistente con los resultados obtenidos en la prueba de equilibrio y en la barra de madera en la batería de pruebas sensorimotoras, los ratones TS tratados con vehículo o con los distintos NAMs mostraron una peor coordinación motora en la prueba del rotarod a la velocidad constante más alta, ya que tuvieron unas latencias de caída menores que las de los grupos CO ($p < 0.001$, **tabla 7**, **figura 15A**). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la ejecución de los animales de ambos genotipos a velocidades más bajas (**figura 15A**) o durante el ciclo de aceleración (**figura 15B**). El tratamiento con los tres NAMs no afectó a la coordinación motora de los animales TS o CO en los cuatro ensayos realizados en el rotarod (**figura 15**, **tabla 7**).

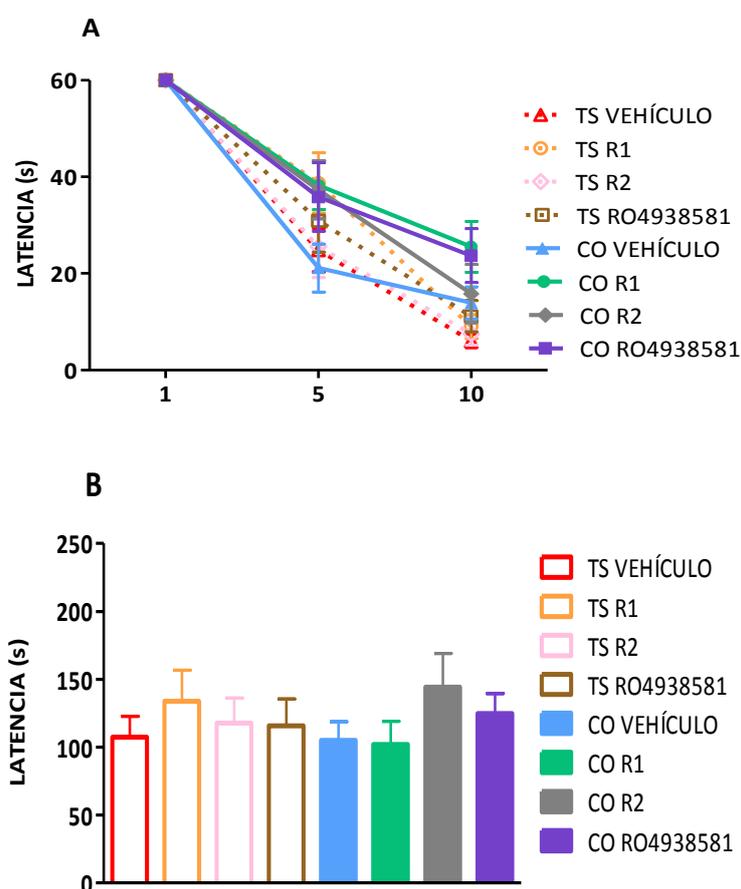


Figura 15. El tratamiento con R1, R2, o RO4938581 no afectó a la coordinación motora de los ratones TS o CO a distintas velocidades constantes o durante el ciclo de aceleración en la prueba de rotarod. Media \pm E.E.M. de la latencia de caída a diferentes velocidades constantes (A) o durante el ciclo de aceleración (B).

Tabla 7. Prueba del rotarod. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de las latencias de caída a las distintas velocidades y durante el ciclo de aceleración en la prueba del rotarod.

	MANOVAs 'Cariotipo x Tratamiento'		
	'Cariotipo' F _(1,98)	'Tratamiento' F _(3,98)	'Cariotipo x Tratamiento' F _(1,98)
25 r.p.m.	0.56, p=0.45	2.42, p=0.70	0.62, p=0.60
50 r.p.m.	16.01, p<0.001	1.83, p=0.14	0.53, p=0.66
Ciclo de aceleración	0.00, p=0.98	0.56, p=0.64	0.87, p=0.45

1.2. Actividad general y ansiedad

Para descartar que factores emocionales, que influyen directamente sobre el comportamiento exploratorio y la actividad locomotora de los ratones, pudieran estar implicados en los cambios de ejecución de otras pruebas que valoran procesos cognitivos se evaluó el efecto de los diferentes fármacos sobre la ansiedad. 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.

1.2.1. Campo abierto

En la prueba de campo abierto no se encontraron diferencias significativas en la actividad realizada por los diferentes grupos de ratones en el centro o en la periferia del laberinto (**figura 16A, tabla 8**) o en el porcentaje de la distancia recorrida en cada zona del campo abierto (**figura 16B, tabla 8**). Los ratones TS tratados con vehículo tendían a ser hiperactivos con respecto al resto de los grupos, ya que recorrían una mayor distancia en el centro y periferia del aparato, pero este efecto no alcanzó significación estadística (**tabla 8**). Al valorar el porcentaje de la distancia que los animales recorren por el centro del aparato no se observaron diferencias significativas entre los 8 grupos de ratones (**figura 16B**), lo que indica que el cariotipo o el

tratamiento administrado no modificó la ansiedad de los animales en el campo abierto.

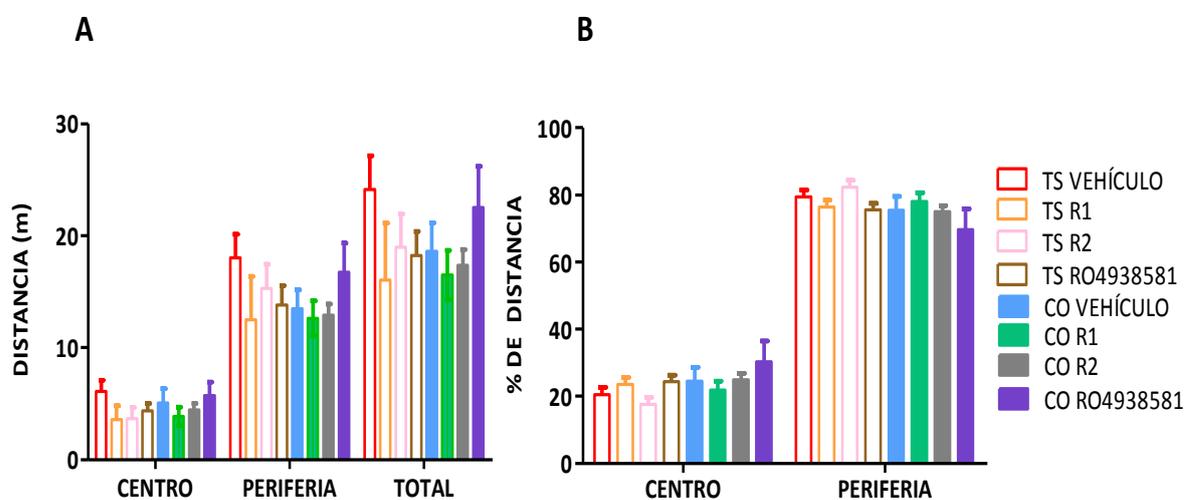


Figura 16. El tratamiento con R1, R2 o RO4938581 no afectó a la actividad general ni a la ansiedad de ratones TS o CO en el campo abierto. Media \pm E.E.M. de la distancia recorrida (A) y del porcentaje de la distancia recorrida en el centro o la periferia del campo abierto (B) por los ratones TS y CO tratados con R1, R2, RO4938581 o vehículo.

Tabla 8. Prueba del campo abierto. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de cada variable analizada en el campo abierto.

	MANOVAs 'Cariotipo x Tratamiento'		
	'Cariotipo' F _(1,98)	'Tratamiento' F _(1,98)	'Cariotipo x Tratamiento' F _(1,98)
Distancia periferia	0.40, p=0.52	0.53, p=0.66	1.63, p=0.18
Distancia centro	0.26, p=0.61	0.50, p=0.67	1.76, p=0.16
Distancia total	0.08, p=0.77	0.52, p=0.66	1.77, p=0.15
Porcentaje de distancia periferia	2.99, p=0.087	1.43, p=0.23	0.67, p=0.57
Porcentaje de distancia centro	2.99, p=0.087	1.43, p=0.23	0.67, p=0.57

1.2.2. Laberinto elevado en cruz

En la prueba del laberinto elevado en cruz se valoró nuevamente la actividad y los niveles de ansiedad de los distintos grupos experimentales al ser expuestos a un ambiente nuevo con dos zonas diferenciadas, una potencialmente aversiva (los brazos abiertos) y otra segura (los brazos cerrados).

Al valorar la actividad general en esta prueba no se encontraron diferencias significativas en el número de entradas que los ratones de ambos cariotipos bajo los diferentes tratamientos realizaron en los brazos abiertos o cerrados (**figura 17A, tabla 9**).

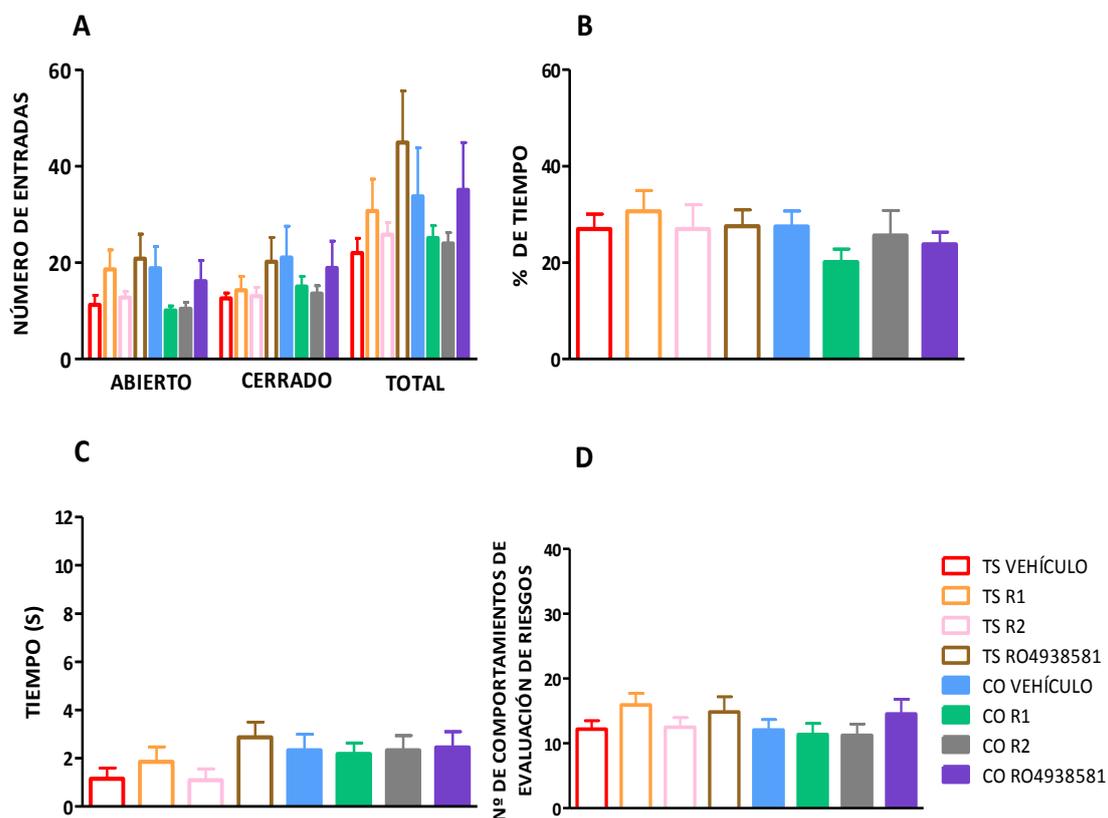


Figura 17. La administración crónica de R1, R2 o RO4938581 no afectó a la actividad general ni a la ansiedad de los ratones TS o CO en el laberinto elevado en cruz. Media \pm E.E.M. del número de entradas en los brazos abiertos y cerrados y del número total de entradas (A), del porcentaje de tiempo que pasaron en los brazos abiertos (B), del tiempo de congelación en el inicio del ensayo (C) y del número de comportamientos de evaluación de riesgo (D) realizados en el laberinto elevado en cruz por los 8 grupos de animales.

Tampoco se apreciaron alteraciones en la ansiedad en ninguno de los grupos experimentales ya que los ratones TS y CO bajo los distintos tratamientos no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de distancia recorrida en los brazos abiertos (**figura 17B, tabla 9**), en el tiempo inicial de congelación (**figura 17C, tabla 9**) o en el número de comportamientos de evaluación de riesgo (**figura 17D, tabla 9**).

Tabla 9. Prueba del laberinto en cruz. Valores F y p del MANOVA ('cariotipo x tratamiento') de cada variable analizada en el laberinto elevado en cruz.

	MANOVAs 'Cariotipo x Tratamiento'		
	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento'
	F(1,98)	F(2,98)	F(2,98)
N° de entradas en los brazos abiertos	0.52, p=0.47	0.30, p=0.82	2.70, p=0.051
N° de entradas en los brazos cerrados	2.08, p=0.15	0.06, p=0.97	0.33, p=0.79
N° total de entradas	0.21, p=0.64	0.13, p=0.92	0.96, p=0.41
Porcentaje de distancia en los brazos abiertos	1.40, p=0.24	0.06, p=0.97	0.86, p=0.46
Tiempo de inmovilidad inicial	1.34, p=0.25	1.28, p=0.28	1.30, p=0.28
N° total de conductas de evaluación de riesgo	0.65, p=0.42	1.30, p=0.28	0.85, p=0.46

1.3. Capacidad de atención y la actividad exploratoria

1.3.1. Tabla de agujeros

Para valorar la capacidad de atención y la conducta exploratoria de los animales se utilizó la prueba de la tabla de agujeros. La **tabla 10** muestra las puntuaciones obtenidas por los ratones TS y CO tratados con vehículo, R1, R2 o RO4938581 durante

Resultados

esta prueba. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los ratones de ambos cariotipos en la distancia recorrida o en el tiempo dedicado a la exploración de los agujeros, los ratones TS mostraron una atención deficiente, ya que realizaron un mayor número de exploraciones y repitieron un mayor número de veces la exploración de los agujeros recientemente explorados (índice ABA e índice ABA/número de exploraciones, **tabla 10**).

Sin embargo, la administración crónica de los distintos NAMs no fue capaz de recuperar las alteraciones de atención de los ratones TS. Estos tratamientos tampoco modificaron la actividad exploratoria de los animales TS o CO (**tabla 10**).

Tabla 10. Prueba de la tabla de agujeros. Media \pm E.E.M. y valores F y p de los MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') para cada variable independiente analizada en la prueba de la tabla de agujeros.

	TS				CO				MANOVAs 'Cariotipo x Tratamiento'		
	Vehículo	R1	R2	RO4938581	Vehículo	R1	R2	RO4938581	Car F _(1,98)	Trat F _(3,98)	'Car x trat' F _(7,98)
Distancia (m)	6.34 \pm 0.5	8.53 \pm 1.35	6.78 \pm 0.85	7.15 \pm 1.08	6.42 \pm 0.67	6.65 \pm 0.87	5.82 \pm 0.89	6.85 \pm 0.57	1.90, p=0.17	0.99, p=0.39	0.40, p=0.74
N° de exploraciones	21.15 \pm 2.19	26.06 \pm 3.15	21.58 \pm 1.92	22.64 \pm 2.35	18.00 \pm 2.31	14.64 \pm 1.99	15.45 \pm 2.38	18.61 \pm 2.15	12.44, p=0.001	0.23, p=0.87	1.41, p=0.24
Tiempo explorando los agujeros (s)	21.31 \pm 4.94	27.49 \pm 4.56	27.33 \pm 5.46	36.02 \pm 5.64	22.32 \pm 4.22	18.33 \pm 4.44	15.40 \pm 3.75	26.91 \pm 5.57	3.38, p=0.069	1.37, p=0.25	0.54, p=0.65
Índice ABA	5.15 \pm 0.89	5.80 \pm 0.98	5.08 \pm 0.85	4.50 \pm 0.84	2.53 \pm 0.36	2.71 \pm 0.64	3.63 \pm 0.75	3.38 \pm 0.47	13.56, p<0.001	0.23, p=0.86	0.86, p=0.46
ABA/N° exploraciones	0.23 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.16 \pm 0.33	0.21 \pm 0.04	0.18 \pm 0.01	4.37, p=0.039	0.58, p=0.62	0.69, p=0.56

1.4. Cognición

1.4.1. Laberinto acuático de Morris

Para evaluar el efecto del tratamiento crónico con los tres NAMs sobre el aprendizaje espacial y la **memoria de referencia** de los ratones TS y CO se utilizó el laberinto acuático de Morris.

La **tabla 11** muestra los resultados del análisis estadístico de todas las variables evaluadas en esta prueba.

Aunque todos los grupos de ratones aprendieron la posición de la plataforma durante las sesiones de adquisición, ya que redujeron progresivamente la latencia para alcanzar la plataforma (**figura 18, tabla 11**), los ratones TS mostraron un pronunciado déficit de aprendizaje. Estos animales presentaron mayores latencias de escape durante las sesiones de adquisición en comparación con los ratones CO (**figura 18A, $p < 0.001$**). Sin embargo, la administración de R1, R2 o RO4938581 mejoró el aprendizaje y memoria espacial en los ratones TS ($p = 0.005$, **tabla 11**). Esta mejoría fue más notable en las cuatro primeras sesiones (**figuras 18C, 18D, 18E y 18F, tabla 11**).

En las sesiones de aprendizaje guiado el tratamiento con R1, R2 y con RO4938581 mejoró ligeramente el rendimiento de los ratones TS y CO, aunque este efecto no alcanzó la significación estadística (**tabla 11, figura 18B**).

Resultados

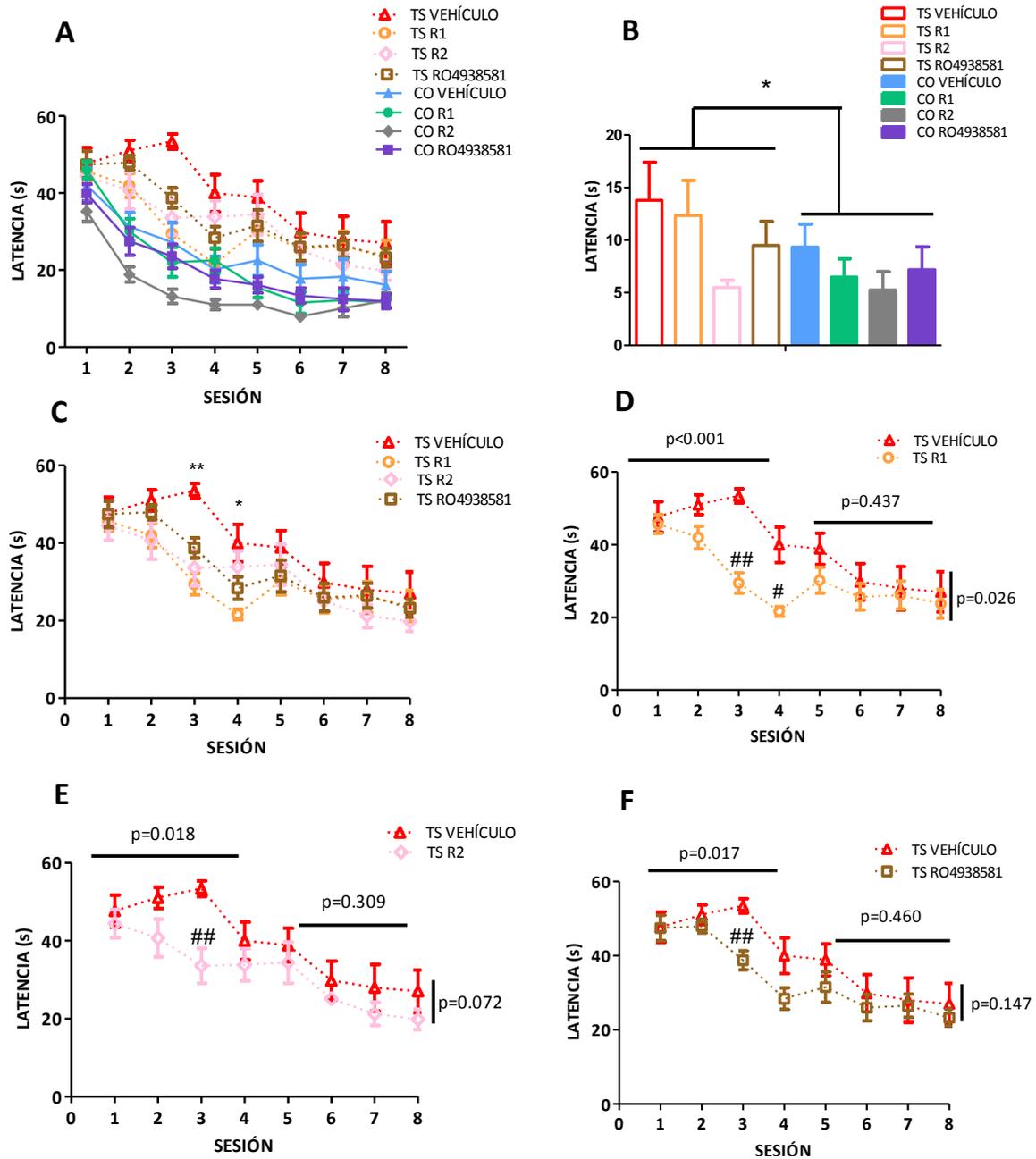


Figura 18. La administración crónica de R1, R2 o RO4938581 mejoró el aprendizaje espacial del ratón TS. Media \pm E.E.M. de la latencia para encontrar la plataforma durante las 8 sesiones de adquisición (A) y durante el aprendizaje guiado (B) de los ocho grupos de ratones, durante las sesiones de adquisición de los ratones TS tratados con los tres NAMs (C), de los TS tratados con R1 y vehículo (D), de los TS tratados con R2 y vehículo (E) y de los TS tratados con RO4938581 y vehículo (F) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, TS vs. CO; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, TS vehículo vs. TS tratado. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos. En la parte derecha de las figuras D-F se muestra el resultado del análisis *post hoc* (ANOVA de medidas repetidas) entre cada par de curvas de aprendizaje y en la parte superior se muestra el mismo análisis realizado teniendo en cuenta las cuatro primeras o últimas sesiones.

La administración crónica de R2 produjo una mejoría significativa en la ejecución de los ratones CO respecto a los tratados con vehículo (**figura 19C, tabla 11**). Aunque el tratamiento con R1 o con RO4938581 produjo una tendencia a reducir la latencia de llegada a la plataforma de los ratones CO (**figuras 19B y 19D**), este efecto no alcanzó la significación estadística (**tabla 11**).

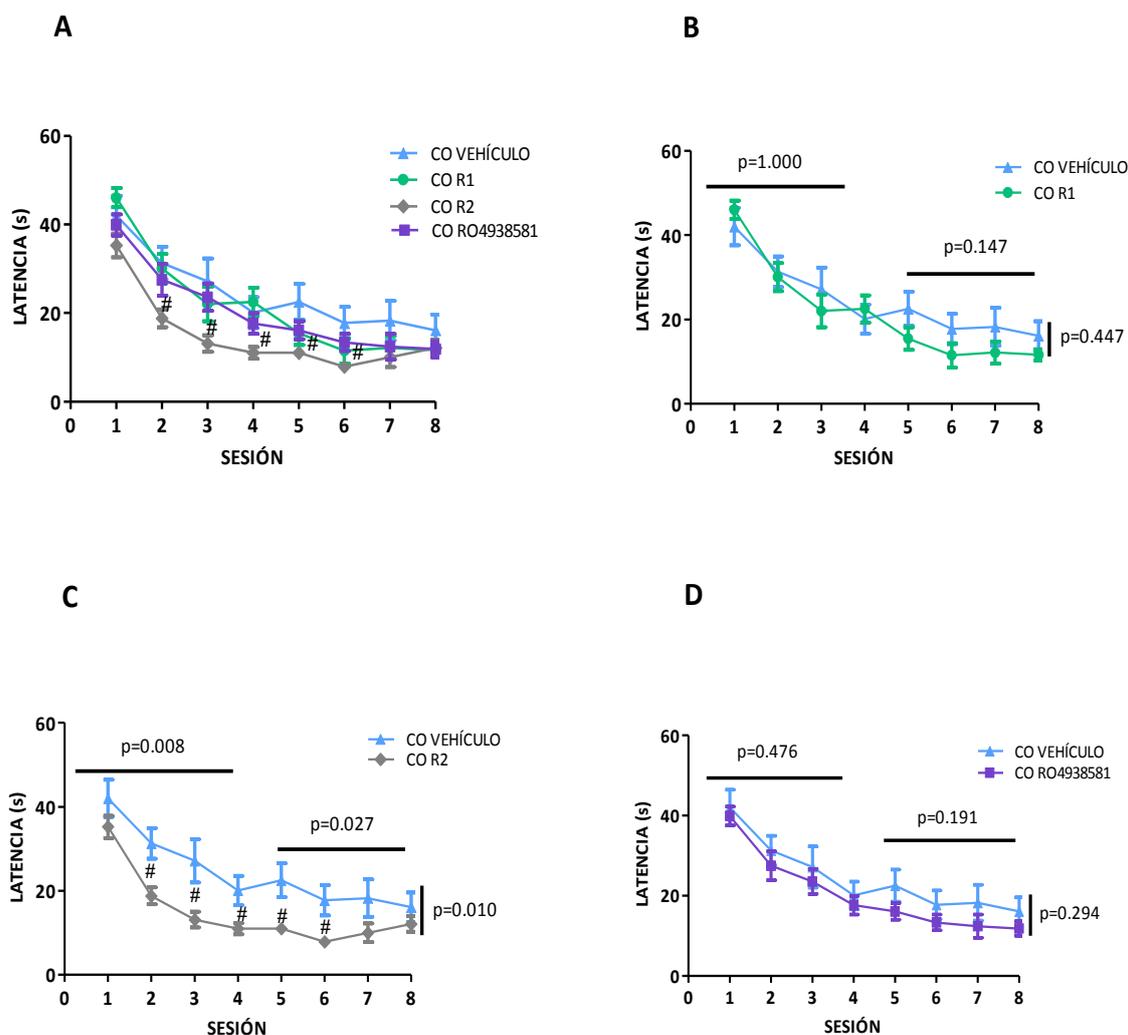


Figura 19. La administración crónica de R2, pero no de R1 o RO4938581 mejoró el aprendizaje espacial del ratón CO. Media \pm E.E.M. de la latencia para encontrar la plataforma durante las 8 sesiones de adquisición de todos los grupos de ratones CO (A), de los CO tratados con vehículo o con R1 (B), de los tratados con vehículo o con R2 (C) y de los tratados con vehículo o con RO4938581 (D). #: $p < 0.05$, CO R2 vs. CO vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativas. En la parte derecha de las figuras B-D se muestra el resultado del análisis *post hoc* (ANOVA de medidas repetidas) entre cada par de curvas de aprendizaje y en la parte superior se muestra el mismo análisis realizado teniendo en cuenta las cuatro primeras o últimas sesiones.

Resultados

Tabla 11. Prueba del laberinto acuático de Morris. Media ± E.E.M. y valores F y p de los MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') para cada variable independiente analizada en la prueba del laberinto acuático de Morris.

Memoria de referencia (S1-S8)	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento'		'Sesión'	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento'
			F_(7,98)=51.32, p<0.001	F_(1,98)=65.97, p<0.001	F_(3,98)=4.58, p=0.005	F_(3,98)=0.97, p=0.40
Comparaciones post hoc entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts Vehículo vs. Ts R1				F_(1,24)= 5.66, p=0.026	
	Ts Vehículo vs. Ts R2				F _(1,21) = 3.61, p=0.072	
	Ts Vehículo vs. Ts RO4938581				F _(1,23) = 2.26, p=0.147	
	Co Vehículo vs. Co R1				F _(1,25) = 0.59, p=0.447	
	Co Vehículo vs. Co R2				F_(1,24)= 7.71, p=0.010	
	Co Vehículo vs. Co RO4938581				F _(1,24) = 1.153, p=0.294	
	Ts Vehículo vs. Co Vehículo			F_(1,24)= 10.69, p=0.003		
Memoria de referencia (S1-S4)	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento'		F_(3,98)=64.29, p<0.001	F_(1,98)= 66.06, p<0.001	F_(3,98)=6.267, p=0.001	F_(3,98)=3.875, p=0.012
Comparaciones post hoc entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts Vehículo vs. Ts R1				F_(1, 24)= 26.06, p<0.001	
	Ts Vehículo vs. Ts R2				F_(1,21)=6.684, p=0.018	
	Ts Vehículo vs. Ts RO4938581				F_(1,23)= 6.719, p=0.017	
	Co Vehículo vs. Co R1				F _(1,25) =0.000, p=1.000	
	Co Vehículo vs. Co R2				F_(1,24)=8.234, p=0.008	
	Co Vehículo vs. Co RO4938581				F _(1, 24) =0.525, p=0.476	
	Ts Vehículo vs. Co Vehículo			F_(1, 24)= 45.44, p<0.001		

Tabla 11 (Continuación)

Memoria de referencia (S5-S8)	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento'		$F_{(3,98)}= 12.534,$ $p<0.001$	$F_{(1,98)}=45.464,$ $p<0.001$	$F_{(3,98)}= 2.216,$ $p=0.92$	$F_{(3,98)}=0.070,$ $p=0.976$
Comparaciones post hoc entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts Vehículo vs. Ts R1				$F_{(1,24)}=0.626,$ $p=0.437$	
	Ts Vehículo vs. Ts R2				$F_{(1,21)}=1.089,$ $p=0.309$	
	Ts Vehículo vs. Ts RO4938581				$F_{(1,23)}=0.565,$ $p=0.460$	
	Co Vehículo vs. Co R1				$F_{(1,25)}=2.244,$ $p=0.147$	
	Co Vehículo vs. Co R2				$F_{(1,24)}=5.537,$ $p=0.027$	
	Co Vehículo vs. Co RO4938581				$F_{(1,24)}=1.81,$ $p=0.191$	
	Ts Vehículo vs. Co Vehículo			$F_{(1,24)}=4.396,$ $p=0.047$		
	Sesiones de aprendizaje guiado	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento'			$F_{(1,98)}= 5.09,$ $p=0.026$	$F_{(3,98)}=0.69,$ $p=0.56$

2. Estudio II: estudio del efecto de la administración subcrónica de un modulador alostérico negativo para la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información en el ratón Ts65Dn.

2.1. Efecto de RO4938581 sobre la cognición

Para valorar si el **efecto procognitivo de RO4938581** en los ratones TS era debido a cambios en los procesos de codificación, consolidación y/o recuperación de la información se utilizó otra versión de la prueba del laberinto acuático de Morris.

Como se explicó anteriormente, el protocolo utilizado permite evaluar la memoria de referencia (aprendizaje a lo largo de las sesiones S1-S8), la memoria de trabajo (el aprendizaje a lo largo de los ensayos E1-E8), el aprendizaje espacial (aprendizaje a lo largo de las sesiones S9-S12, independiente del ensayo) y la memoria espacial (ensayo de retirada de la plataforma). La **tabla 12** muestra los resultados del análisis estadístico de cada variable analizada.

2.1.1. Laberinto acuático de Morris

2.1.1.1. Aprendizaje y memoria de referencia

Al igual que en el Estudio I, para valorar la **memoria de referencia** se registró la latencia de escape de los animales a lo largo de las doce sesiones de adquisición.

Como se ha demostrado en numerosos estudios, los ratones TS mostraron un pronunciado déficit de aprendizaje en la prueba del laberinto acuático de Morris, tanto en las sesiones de adquisición en las que la plataforma se encontraba cada día en una posición diferente, como en las que la posición de la plataforma se mantuvo constante (**figura 20A, tabla 12**).

El tratamiento con RO4938581 mejoró significativamente la ejecución de todos los grupos de ratones TS durante las sesiones de adquisición (**figura 20A, tabla 12**). De

hecho, los ratones TS que recibieron este fármaco tuvieron menos dificultades para aprender la localización de la plataforma, ya que mostraron una menor latencia de escape que los tratados con vehículo (**figura 20A, tabla 12**). Este efecto se observó tanto durante las sesiones en las que la plataforma cambiaba de posición diariamente como en las cuatro últimas sesiones en las que su posición fue constante. Esto indica que el tratamiento con RO4938581 consiguió mejorar tanto la memoria de referencia como el aprendizaje espacial, independiente del ensayo, en los ratones TS.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la ejecución de los ratones CO tratados con RO4938581 y los tratados con vehículo, ya que ambos grupos mostraron unas latencias similares de llegada a la plataforma (**figura 20A, tabla 12**).

Durante las sesiones de aprendizaje guiado, cuando la plataforma era visible (**figura 20B, tabla 12**), no se encontraron diferencias significativas entre las latencias de llegada a la plataforma de los ratones TS y las de los CO bajo ambos tratamientos (MANOVA 'cariotipo x tratamiento' $F_{(1,115)}=1.514$, $p=0.221$). Este resultado, y el hecho de que no se encontraran diferencias significativas en la velocidad de natación de los animales (MANOVA 'cariotipo x tratamiento' $F_{(1,115)}=0.668$, $p=0.415$) (**figura 20C, tabla 12**), descarta que las diferencias encontradas durante las sesiones de adquisición fueran debidas a déficits motores o sensoriales.

Resultados

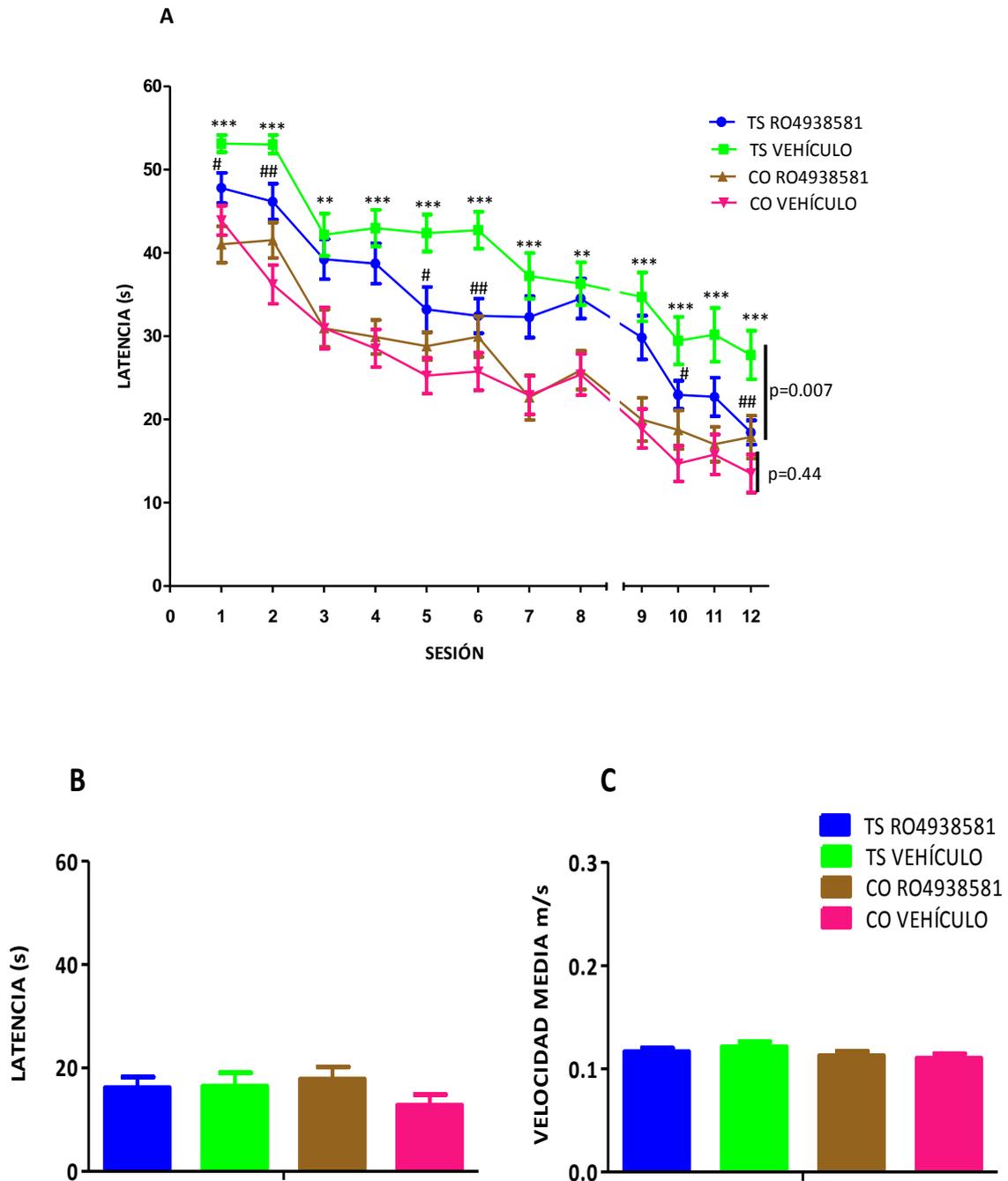


Figura 20. El tratamiento con RO4938581 mejoró la memoria de referencia y el aprendizaje espacial del ratón TS. Media \pm E.E.M. de la latencia para encontrar la plataforma durante las 12 sesiones de adquisición (A), durante las sesiones de aprendizaje guiado (B) y la velocidad media (C) de todos los grupos de ratones en la prueba del laberinto acuático de Morris. ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$ TS vs. CO; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ RO4938581 vs. Vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos. En la parte derecha de la figura (A) se muestra el resultado del análisis *post hoc* (ANOVA de medidas repetidas) entre las dos curvas de aprendizaje de los grupos TS y CO.

2.1.1.1.1. Efecto del tratamiento sobre los distintos procesos cognitivos

En lo que se refiere al **efecto que el fármaco ha tenido sobre los *procesos cognitivos*** (figura 21), a pesar de que cuando se tuvieron en cuenta todos los grupos experimentales el MANOVA reveló que no hubo diferencias significativas entre los distintos grupos ('proceso', tabla 12), este resultado fue debido a que el efecto sólo se produjo en algunos de estos grupos.

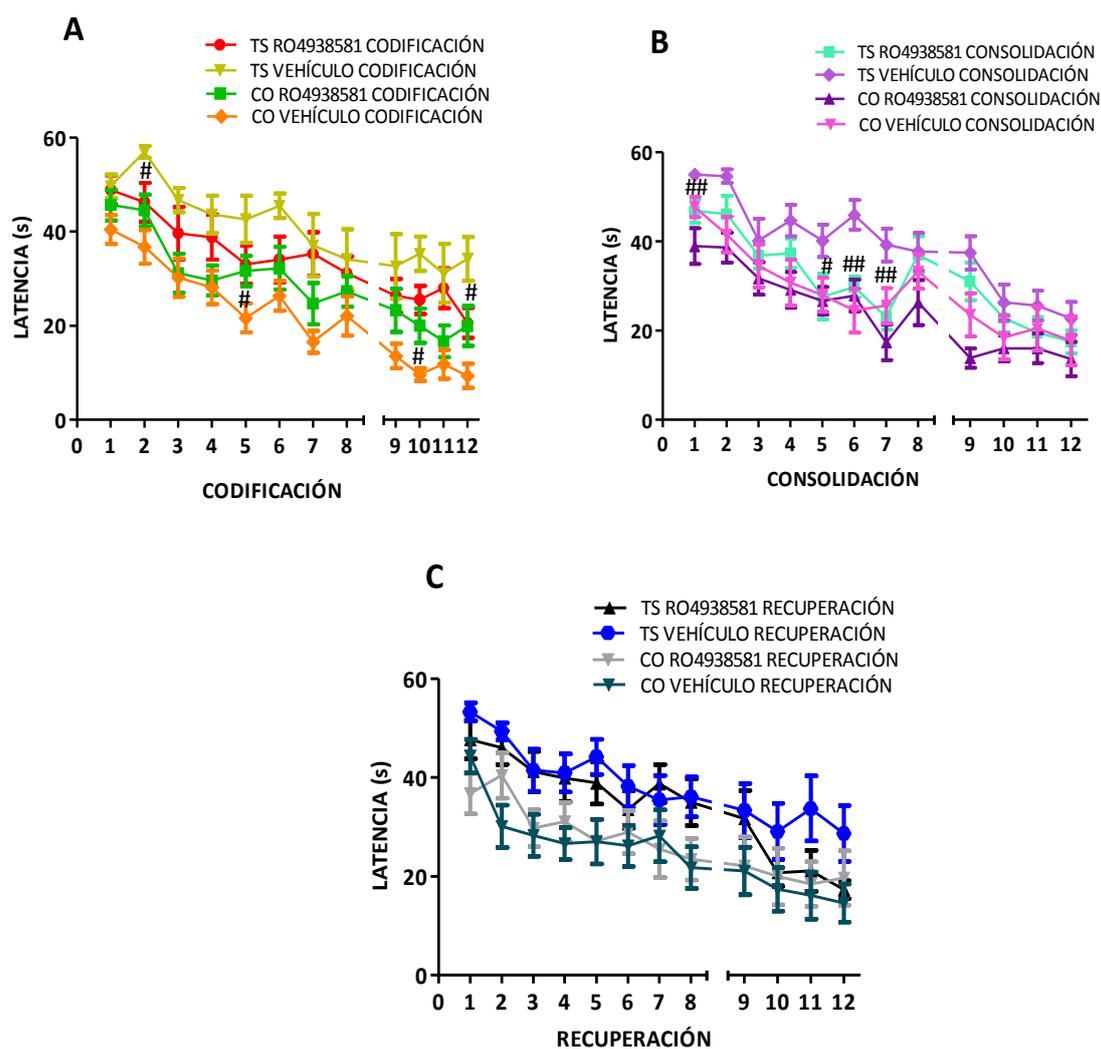


Figura 21. El tratamiento con RO4938581 mejoró los procesos cognitivos de codificación y consolidación de la información de la memoria de referencia en el ratón TS. Media \pm E.E.M. de la latencia para encontrar la plataforma durante las 12 sesiones de adquisición en la prueba del laberinto acuático de Morris de los ratones TS y CO tratados con RO4938581 y con vehículo antes de la codificación (A), durante la consolidación (B) y antes de la recuperación de la información (C). #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ RO4938581 vs. Vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos.

La **figura 21** muestra que el tratamiento con este fármaco mejoró la ejecución del grupo TS cuando fue administrado una hora antes de la *codificación* de la información (**figura 21A**), produjo una marcada mejoría en los animales trisómicos cuando se administró durante la *consolidación* (**figura 21B**) y no tuvo ningún efecto sobre la *recuperación* de la información (**figura 21C**).

Cuando se analizó por separado cada par de curvas de aprendizaje (**figura 22**) se observó que mientras que los ratones TS del grupo de *codificación* tratados con RO4938581 mostraron una tendencia a realizar una mejor ejecución que los tratados con vehículo (**figura 22A**), esta tendencia no alcanzó la significación estadística (**tabla 12**). Sin embargo, los ratones CO que recibieron RO4938581 una hora antes del comienzo del entrenamiento presentaron una mayor latencia de escape del tanque que los tratados con vehículo (**figura 22B**). Estos resultados sugieren que este NAM empeoró la *codificación* de la información en los ratones CO pero no en los TS.

En cuanto al efecto de RO4938581 sobre la *consolidación* de la información, los ratones TS que recibieron este fármaco al empezar el entrenamiento presentaron una mejor ejecución que aquellos que recibieron vehículo (**figura 22C**). Este efecto no fue evidente en el caso de los ratones CO (**figura 22D**).

Por último, no se encontraron diferencias significativas entre la ejecución de los animales TS y la de los CO que recibieron RO4938581 o vehículo una hora antes de *recuperar* la información consolidada (**figuras 22E y 22F**).

Por lo tanto, estos datos sugieren que el efecto procognitivo de RO4938581 en la memoria de referencia de los ratones TS es principalmente debido a una mejoría en el proceso de *consolidación* de la información. Esta mejoría fue evidente tanto en las sesiones en las que se cambiaba la posición de la plataforma (aprendizaje de referencia) como en aquellas en las que permanecía en una posición constante (aprendizaje espacial independiente del ensayo).

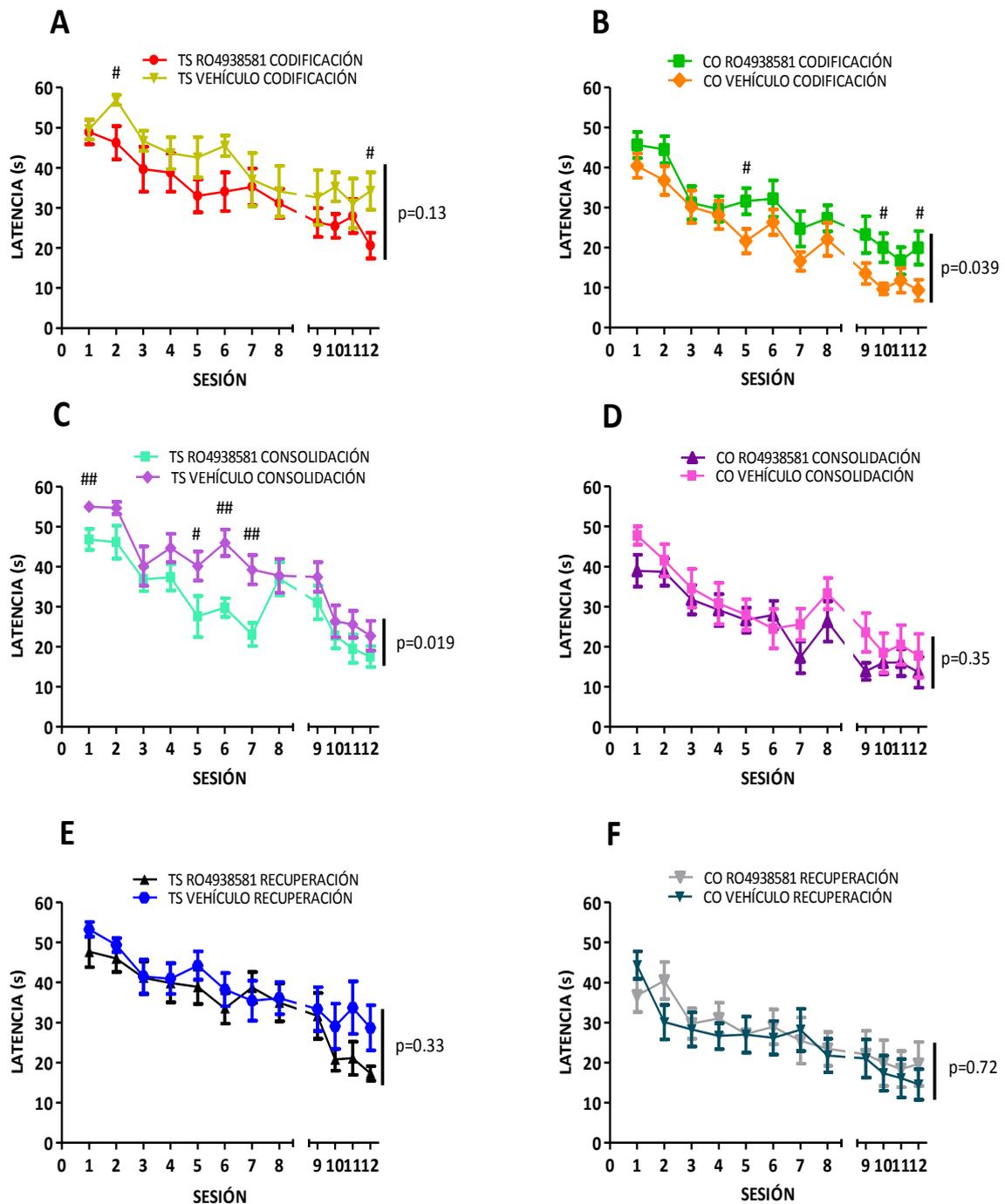


Figura 22. El tratamiento con RO4938581 produjo una mejoría en el proceso de consolidación de la memoria de referencia en el ratón TS. Media \pm E.E.M. de la latencia para encontrar la plataforma durante las 12 sesiones de adquisición en la prueba del laberinto acuático de Morris de los ratones TS (A) y CO (B) tratados con RO4938581 y con vehículo del grupo de codificación, de los ratones TS (C) y CO (D) tratados con RO4938581 y con vehículo del grupo de consolidación y de los ratones TS (E) y CO (D) tratados con RO4938581 y con vehículo del grupo de recuperación. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ RO4938581 vs. Vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos. En la parte derecha de las figuras se muestra el resultado del análisis *post hoc* (ANOVA de medidas repetidas) entre cada par de curvas de aprendizaje.

Resultados

Tabla 12. Prueba del laberinto acuático de Morris. Memoria de referencia. Media ± E.E.M. y valores F y p de los MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') para cada variable independiente analizada en la prueba del laberinto acuático de Morris.

		'Sesión'	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Proceso'	'Cariotipo x Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento x Proceso'
Memoria de referencia (S1-S12)	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento x Proceso'	$F_{(11,115)}=44.13$, $p<0.001$	$F_{(1,115)}=34.69$, $p<0.001$	$F_{(1,115)}=1.98$, $p=0.161$	$F_{(2,115)}=0.23$, $p=0.977$	$F_{(1,115)}=4.99$, $p=0.02$	$F_{(1,115)}=0.70$, $p=0.49$
	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento'	$F_{(11,115)}=45.50$, $p<0.001$	$F_{(1,115)}=36.07$, $p<0.001$	$F_{(1,115)}=1.59$, $p=0.209$		$F_{(1,115)}=5.60$, $p=0.01$	
Memoria de referencia (S1-S12)	MANOVA MR 'cariotipo x Tratamiento x Proceso'						
Comparaciones post hoc entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts Vehículo Codificación vs. Ts RO4938581 Codificación			$F_{(1,13)}=2.620$, $p=0.130$			
	Ts Vehículo Consolidación vs. Ts RO4938581 Consolidación			$F_{(1,18)}=6.651$, $p=0.019$			
	Ts Vehículo Recuperación vs. Ts RO4938581 Recuperación			$F_{(1,17)}=0.981$, $p=0.334$			
	Co Vehículo Codificación vs. Co RO4938581 Codificación			$F_{(1,26)}=4.37$, $p=0.039$			
	Co Vehículo Consolidación vs. Co RO4938581 Consolidación			$F_{(1,20)}=0.905$, $p=0.353$			
	Co Vehículo Recuperación vs. Co RO4938581 Recuperación			$F_{(1,19)}=0.131$, $p=0.722$			

Tabla 12 (Continuación)

Memoria de referencia (S1-S8)	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento x Proceso'		$F_{(7,115)} = 35.61,$ $p < 0.001$	$F_{(1,115)} = 41.36,$ $p < 0.001$	$F_{(1,115)} = 2.18,$ $p = 0.14$	$F_{(2,115)} = 0.34,$ $p = 0.96$	$F_{(1,115)} = 4.57,$ $p = 0.03$	$F_{(1,115)} = 0.56,$ $p = 0.56$
Comparaciones post hoc entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts Vehículo Codificación	vs.			$F_{(1,13)} = 1.99,$ $p = 0.18$			
	Ts RO4938581 Codificación							
	Ts Vehículo Consolidación	vs.			$F_{(1,18)} = 10.22,$ $p = 0.005$			
	Ts RO4938581 Consolidación							
	Ts Vehículo Recuperación	vs.			$F_{(1,17)} = 0.35,$ $p = 0.56$			
	Ts RO4938581 Recuperación							
	Co Vehículo Codificación	vs.			$F_{(1,26)} = 2.37,$ $p = 0.13$			
	Co RO4938581 Codificación							
	Co Vehículo Consolidación	vs.			$F_{(1,20)} = 0.789,$ $p = 0.38$			
	Co RO4938581 Consolidación							
Co Vehículo Recuperación	vs.			$F_{(1,19)} = 0.09,$ $p = 0.76$				
Co RO4938581 Recuperación								
Ts Vehículo codificación	vs.		$F_{(1,18)} = 16.82,$ $p = 0.001$					
Co Vehículo codificación								
Ts Vehículo consolidación	vs.		$F_{(1,19)} = 9.61,$ $p = 0.006$					
Co Vehículo consolidación								
Ts Vehículo recuperación	vs.		$F_{(1,20)} = 10.27,$ $p = 0.004$					
Co Vehículo recuperación								

Tabla 12 (Continuación)

Memoria de referencia (S9-S12)	MANOVA MR 'cariotipo x tratamiento x proceso'		'Sesión'	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Proceso'	'Cariotipo x Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento x Proceso'
Comparaciones post hoc entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts Vehículo Codificación							
	vs.							
	Ts RO4938581 Codificación				$F_{(1,13)}=2.17$ $p=0.164$			
	Ts Vehículo Consolidación							
	vs.							
	Ts RO4938581 Consolidación				$F_{(1,18)}=1.64$ $p=0.21$			
	Ts Vehículo Recuperación							
vs.								
Ts RO4938581 Recuperación					$F_{(1,19)}=1.68$ $p=0.21$			
Co Vehículo Codificación								
vs.								
Co RO4938581 Codificación					$F_{(1,26)}=4.28$ $p=0.04$			
Co Vehículo Consolidación								
vs.								
Co RO4938581 Consolidación					$F_{(1,20)}=0.84$ $p=0.36$			
Co Vehículo Recuperación								
vs.								
Co RO4938581 Recuperación					$F_{(1,19)}=0.16$ $p=0.68$			

2.1.1.2. Velocidad

No se encontraron diferencias en la **velocidad media** de natación de los distintos grupos de animales en esta prueba (ANOVA 'cariotipo' $F_{(1,115)}= 2,778$, $p=0.098$; 'tratamiento' $F_{(1,115)}=0.051$, $p=0.822$; 'proceso' $F_{(1,115)}=0.557$, $p=0.574$; 'cariotipo x tratamiento x proceso' $F_{(1,115)}=0.292$, $p=0.747$; **figura 23**). Estos resultados sugieren que las diferencias encontradas en las latencias de llegada a la plataforma de los distintos grupos de ratones durante las sesiones de adquisición no fueron debidas a alteraciones motoras o sensoriales.

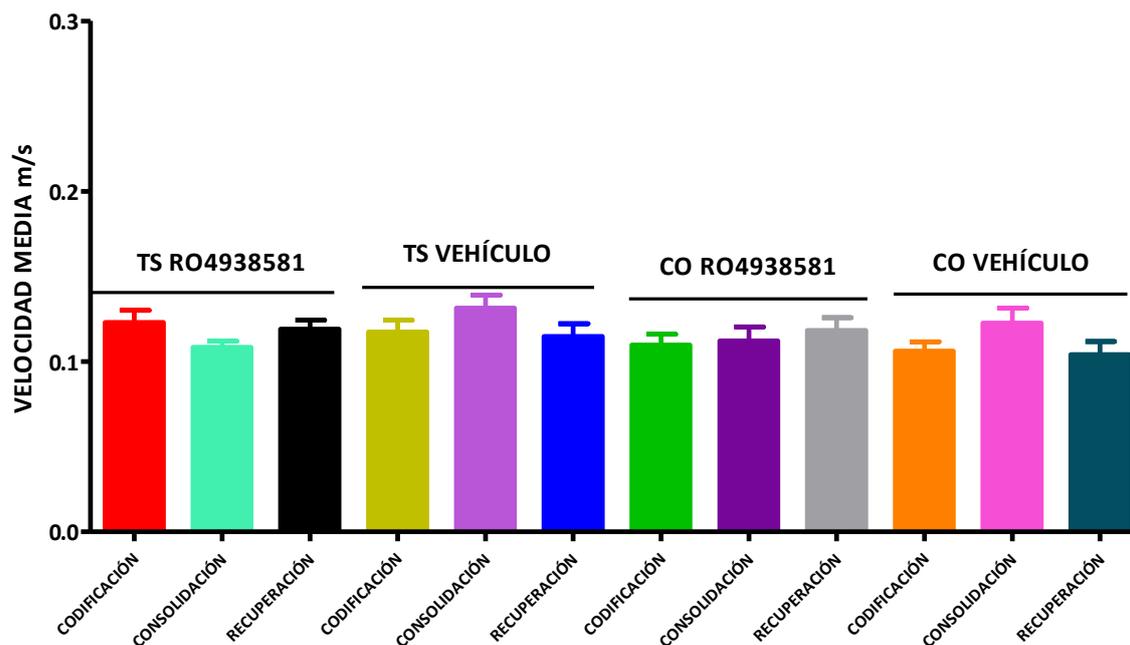


Figura 23. Ninguna de las pautas de administración de RO4938581 modificó la velocidad media de natación de los ratones TS y CO en el laberinto acuático de Morris. Media \pm E.E.M. de la velocidad media de natación.

2.1.1.3. Memoria de trabajo

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 primeras sesiones.

De manera consistente con los resultados obtenidos al evaluar la memoria de referencia, los ratones TS mostraron un pronunciado déficit de aprendizaje en la prueba del laberinto acuático de Morris, durante los ocho ensayos de cada sesión (**figura 24, tabla 13**).

El tratamiento con RO4938581 mejoró significativamente la ejecución los ratones TS durante los ocho ensayos (**figura 24, tabla 13**). De hecho, estos ratones tuvieron menos dificultades para aprender la localización de la plataforma, que los tratados con

Resultados

vehículo (**figura 24, tabla 13**), lo que indica que este tratamiento consiguió normalizar la memoria de trabajo en los ratones TS.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la ejecución de los ratones CO tratados con RO4938581 y los tratados con vehículo, ya que ambos grupos mostraron unas latencias similares de llegada a la plataforma (**figura 24, tabla 13**).

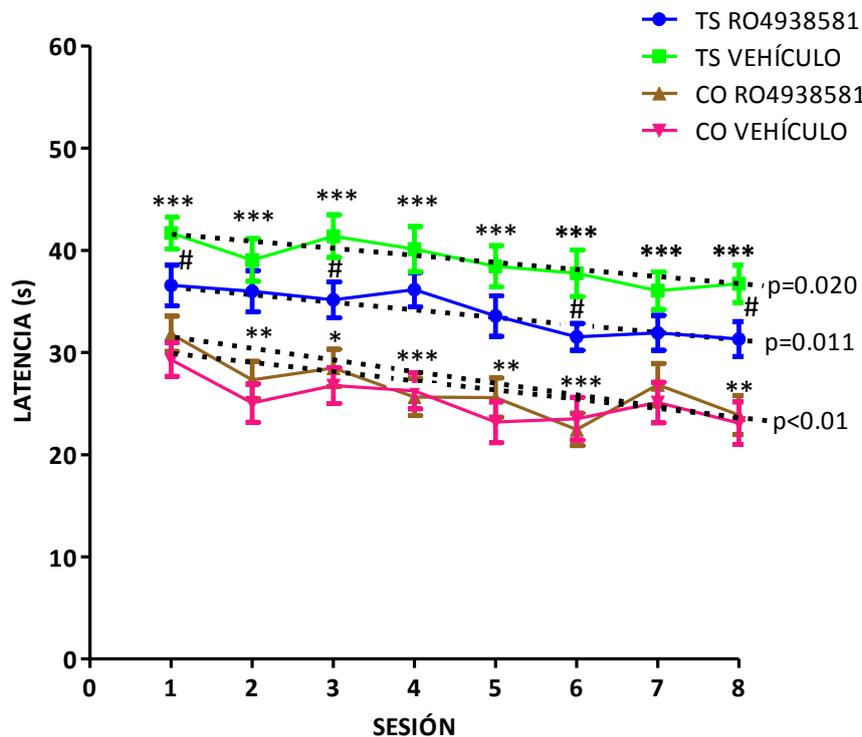


Figura 24. El tratamiento con RO4938581 mejoró la memoria de trabajo del ratón TS. Media \pm E.E.M. de la latencia para encontrar la plataforma durante los ocho ensayos de adquisición de todos los grupos de ratones en la prueba del laberinto acuático de Morris. *: $p < 0.005$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ TS vs. CO; #: $p < 0.05$ RO4938581 vs. Vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativas. En la parte derecha de la figura se muestra el resultado del análisis *post hoc* (ANOVA de medidas repetidas) de cada curva de aprendizaje, es decir, la disminución de la latencia de llegada a lo largo de los ensayos.

Una vez más, cuando se analizaron conjuntamente todos los grupos, el MANOVA reveló que no hubo diferencias significativas en el efecto del 'tratamiento' o del 'proceso' sobre la memoria de trabajo (**tabla 13**). Sin embargo, este hecho se debió a que estos factores solo afectaron a alguno de los grupos.

De manera consistente con lo observado en la memoria de referencia, el tratamiento con RO4938581 antes de la *codificación* de la información no mejoró significativamente la memoria de trabajo de los ratones TS (**figura 25A, tabla 13**). En los ratones CO, cuando el tratamiento o el vehículo se administraron antes de la *codificación* de la información, la capacidad de recordar la posición de la plataforma dentro de cada sesión fue similar, ya que la diferencia entre ambos grupos en la disminución en la latencia de llegada a la plataforma a lo largo de los ensayos no alcanzó la significación estadística (**figura 25B**).

Sin embargo, cuando RO4938581 fue administrado durante la *consolidación* de la información los ratones TS mostraron una mejoría en la memoria de trabajo (**figura 25C**), ya que a lo largo de los ensayos escapaban antes del tanque que los tratados con vehículo. En los ratones CO del grupo *consolidación* tratados con este NAM se observó la misma tendencia que no alcanzó la significación estadística (**figura 25D**).

La administración de RO4938581 una hora antes de la *recuperación* de la información no tuvo ningún efecto sobre la memoria de trabajo de los ratones TS (**figura 25E**) o CO (**figura 25F**).

Por tanto, una vez más, parece que el tratamiento con RO4938581 produce su principal efecto procognitivo en el ratón TS mejorando la *consolidación* de la información.

Resultados

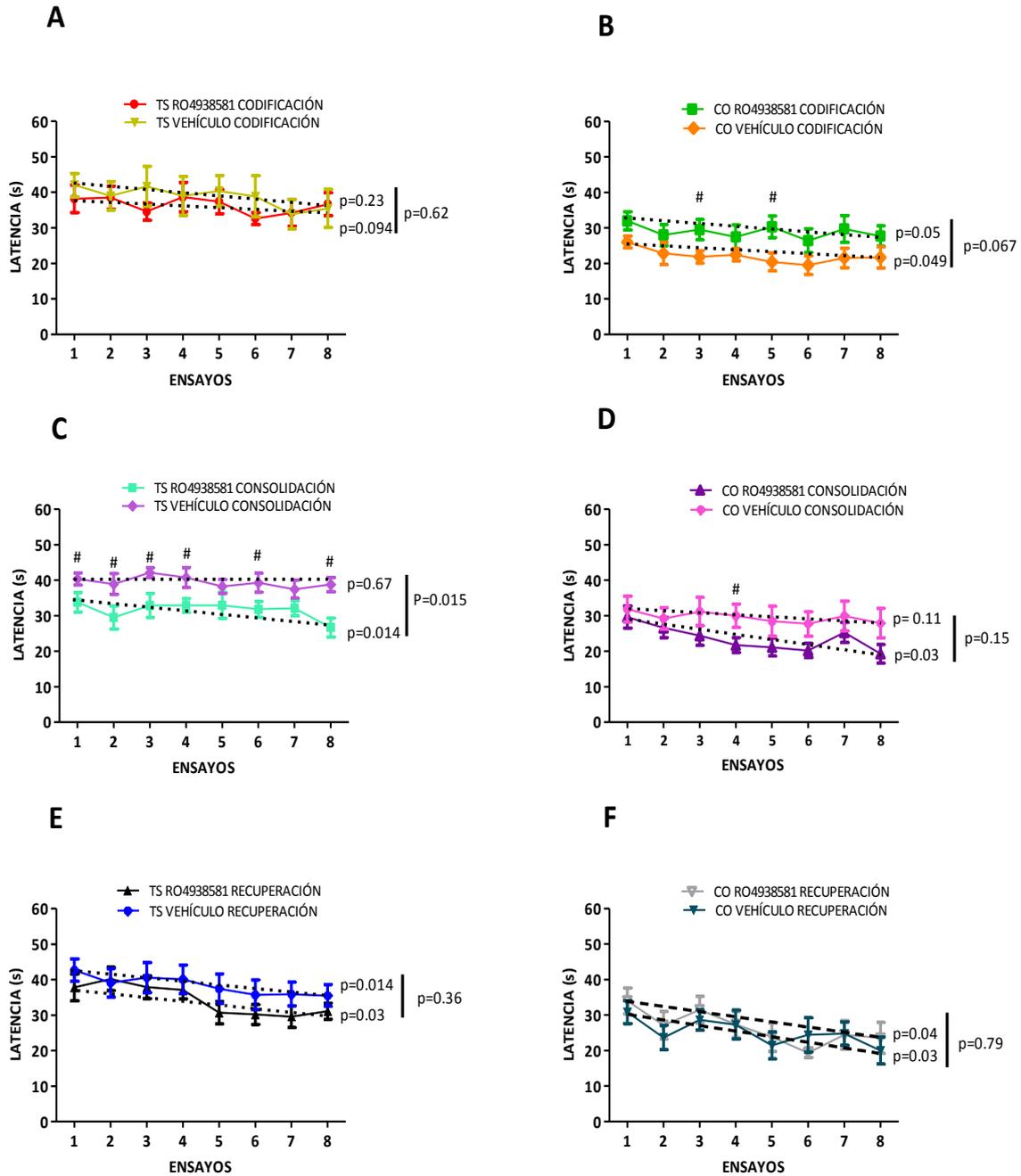


Figura 25. El tratamiento con RO4938581 produjo una mejoría en el proceso de consolidación de la memoria de trabajo en el ratón TS. Media \pm E.E.M. de la latencia de llegada a la plataforma en cada uno de los 8 ensayos de las sesiones en la prueba del laberinto acuático de Morris de los ratones TS (A) y CO (B) tratados con RO4938581 y con vehículo del grupo de codificación, de los ratones TS (C) y CO (D) tratados con RO4938581 y con vehículo del grupo de consolidación y de los ratones TS (E) y CO (F) tratados con RO4938581 y con vehículo del grupo de recuperación. #: $p < 0.05$ RO4938581 vs. Vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativas. En la parte derecha de la figura se muestra el resultado del análisis *post hoc* (ANOVA de medidas repetidas) de cada curva de aprendizaje, es decir, la disminución de la latencia de llegada a lo largo de los ensayos, así como la comparación entre cada par de curvas.

Tabla 13. Prueba del laberinto acuático de Morris. Memoria de trabajo. Media \pm E.E.M. y valores F y p de los MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') para cada variable independiente analizada en la prueba del laberinto acuático de Morris.

Memoria de trabajo (S1-S8)	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento'	'Sesión'	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Proceso'	'Cariotipo x Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento x Proceso'
		$F_{(7,115)}=18.97,$ $p < 0.001$	$F_{(1,115)}=38.00,$ $p < 0.001$	$F_{(1,115)}=1.42,$ $p=0.23$	$F_{(2,115)}=0.33,$ $p=0.96$	$F_{(1,115)}=2.57,$ $p=0.11$	$F_{(1,115)} 0.37,$ $p=0.68$
Comparaciones <i>post hoc</i> entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts RO4938581 vs. Ts Vehículo			$F_{(1,54)}=4.09,$ $p=0.048$			
	Co RO4938581 vs. Co Vehículo			$F_{(1,69)}=0.08,$ $p=0.76$			
	Ts Vehículo Codificación vs. Ts RO4938581 Codificación			$F_{(1,13)}=0.25,$ $p=0.62$			
	Ts Vehículo Consolidación vs. Ts RO4938581 Consolidación			$F_{(1,18)}=7.18,$ $p=0.01$			
	Ts Vehículo Recuperación vs. Ts RO4938581 Recuperación			$F_{(1,19)}=0.85,$ $p=0.36$			
	Co Vehículo Codificación vs. Co RO4938581 Codificación			$F_{(1,26)}=3.65,$ $p=0.06$			
	Co Vehículo Consolidación vs. Co RO4938581 Consolidación			$F_{(1,20)}=2.17,$ $p=0.15$			
	Co Vehículo Recuperación vs. Co RO4938581 Recuperación			$F_{(1,19)}=0.06,$ $p=0.79$			
	Ts Vehículo Codificación vs. Co Vehículo Codificación		$F_{(1,18)}=15.69,$ $p < 0.001$				
	Ts Vehículo Consolidación vs. Co Vehículo Consolidación		$F_{(1,19)}=6.00,$ $p=0.024$				
	Ts Vehículo Recuperación vs. Co Vehículo Recuperación		$F_{(1,20)}=7.10,$ $p=0.01$				

2.1.1.4. Aprendizaje y memoria procedimental

Para analizar el **aprendizaje de procedimiento** se valoró la capacidad del animal de elegir la estrategia adecuada de búsqueda de la plataforma, es decir, el tiempo que pasaban buscándola por el centro del aparato donde siempre estaba situada.

Para ello se cuantificó el comportamiento tigmotáctico, tendencia a nadar por la periferia del aparato, de todos los grupos y se observó que durante las doce sesiones de adquisición todos ellos mejoraron su estrategia de búsqueda de la plataforma (**figura 26, tabla 14**).

2.1.1.4.1. Efecto del tratamiento sobre los distintos procesos cognitivos

Como se observa en la **figura 26**, todos los grupos de ratones TS mostraron un mayor comportamiento tigmotáctico, ya que nadaron durante un porcentaje mayor de tiempo en la periferia del aparato durante las 12 sesiones de adquisición.

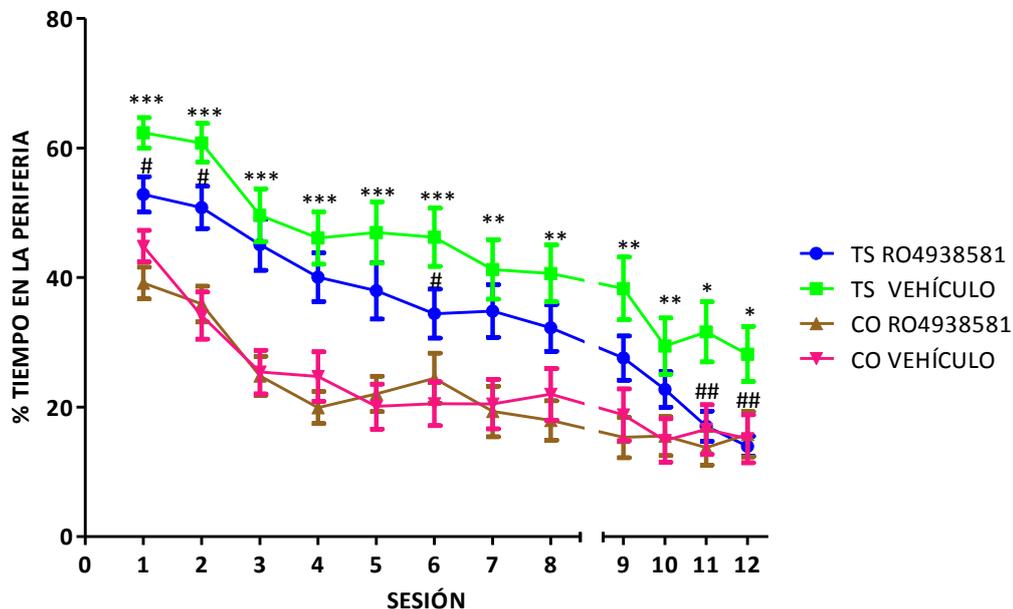


Figura 26. El tratamiento con RO4938581 produjo una reducción del comportamiento tigmotáctico del ratón TS. Media \pm E.E.M. del porcentaje de tiempo que pasaron en la periferia del laberinto acuático a lo largo de las 12 sesiones de adquisición todos los grupos de ratones. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ TS vs. CO. #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$; RO4938581 vs. vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos.

La administración de RO4938581 mejoró el aprendizaje procedimental de los ratones TS, ya que pasaron un porcentaje menor de tiempo en la periferia del aparato que los tratados con vehículo (**figura 26, tabla 14**). Este tratamiento no tuvo ningún efecto en el comportamiento tigmotáctico de los ratones CO.

Cuando se analizó el efecto que produce este NAM en cada uno de los procesos cognitivos de *codificación*, *consolidación* y *recuperación* de la información (**figuras 27 y 28**), se observó que la administración de RO4938581 antes o durante los tres procesos redujo el comportamiento tigmotáctico de los ratones TS (**figura 27A**) en comparación con los animales TS tratados con vehículo (**figura 27B**). Una vez más, la administración de RO4938581 durante la *consolidación* de la información tuvo un efecto beneficioso sobre la tigmotaxis de los ratones TS (**figuras 27A y 28C**). El tratamiento con este fármaco antes de la *codificación* (**figuras 27A y 28A**) de la información también produjo una tendencia a mejorar en los ratones TS, aunque en ninguno de los dos procesos las diferencias alcanzaron la significación estadística (**tabla 14**).

Los ratones CO tratados con RO4938581 también experimentaron cierta mejoría en su comportamiento tigmotáctico cuando era administrado antes de la *codificación* o durante la *consolidación* de la información (**figuras 27C, 28B y 28D**), aunque nuevamente estas diferencias no alcanzaron la significación estadística.

La administración de RO4938581 antes de la *recuperación* de la información no modificó la conducta tigmotáctica de los ratones TS o CO (**figuras 27C, 27D, 28E y 28F**).

El hecho de que estos resultados sean más notables, aunque no significativos, cuando el fármaco era administrado antes de la *codificación* o durante la *consolidación* de la información sugiere que el tratamiento con RO4938581 produce su efecto procognitivo en el ratón TS reduciendo su comportamiento tigmotáctico al mejorar ligeramente estos dos procesos.

Resultados

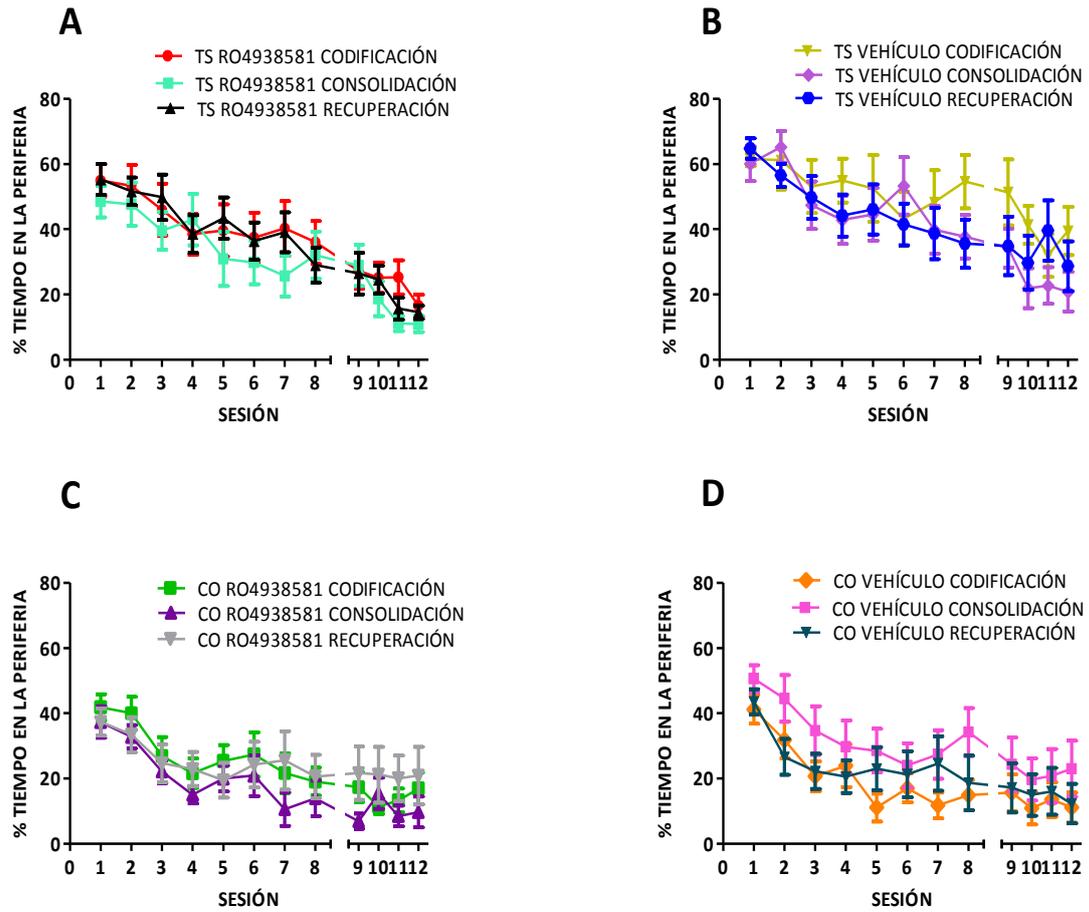


Figura 27. El tratamiento con RO4938581 produjo una mejoría en el comportamiento tigmotáctico de los ratones TS. Media \pm E.E.M. del porcentaje de tiempo que pasaron en la periferia del laberinto acuático de Morris a lo largo de las 12 sesiones de adquisición todos los grupos de ratones.

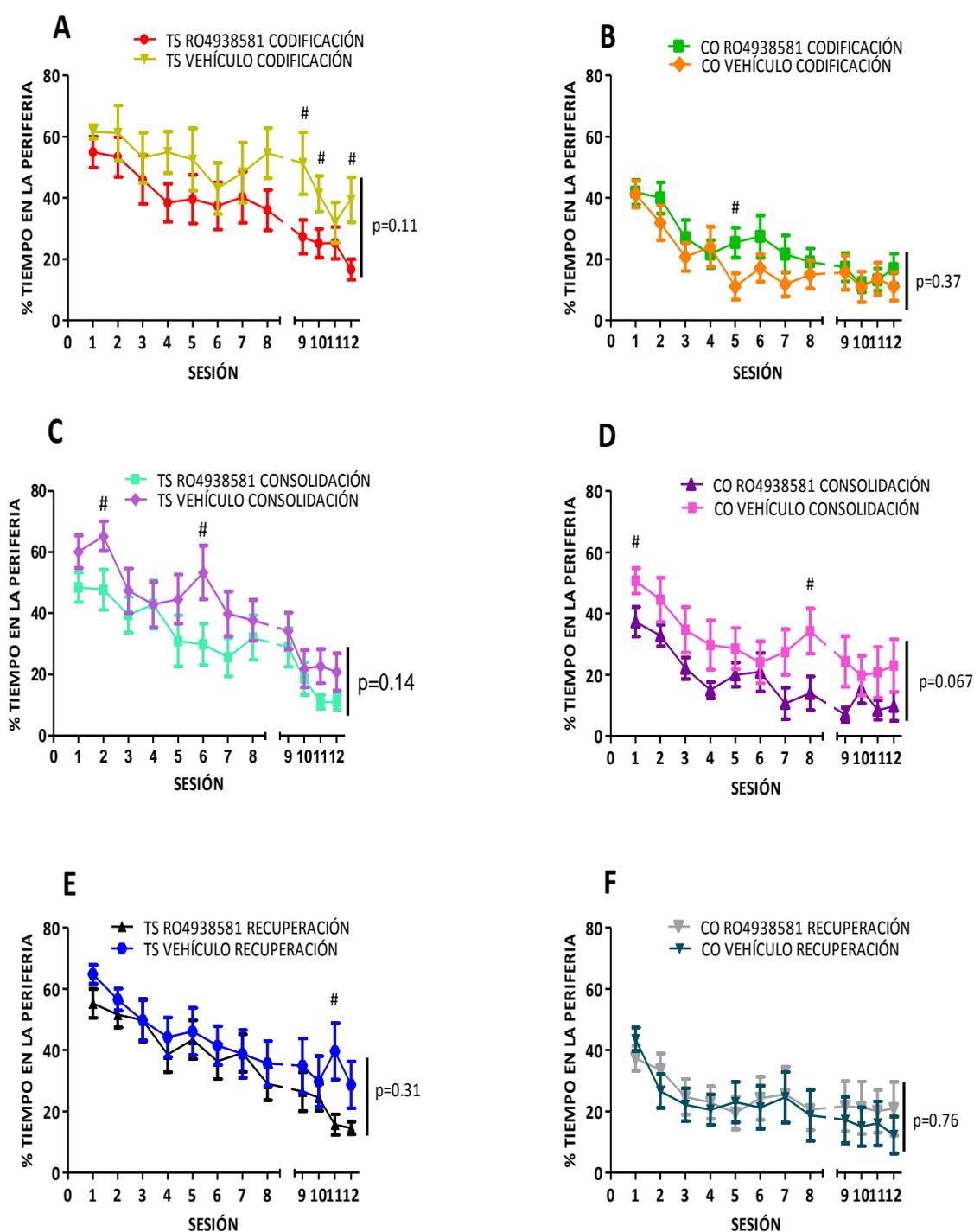


Figura 28. El tratamiento con RO4938581 antes de la codificación o de la consolidación de la información produjo una mejoría en el comportamiento tigmotáctico del ratón TS. Media \pm E.E.M. del porcentaje de tiempo que pasaron en la periferia del laberinto acuático de Morris a lo largo de las 12 sesiones de adquisición todos los grupos de ratones. #: $p < 0.05$; RO4938581 vs. Vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos. En la parte derecha de la figura se muestra el resultado de la comparación *post hoc* (ANOVA de medidas repetidas) entre cada par de curvas de aprendizaje.

Resultados

Tabla 14. Prueba del laberinto acuático de Morris. Tigmotaxis. Media ± E.E.M. y valores F y p de los MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') para cada variable independiente analizada en la prueba del laberinto acuático de Morris.

		'Sesión'	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Proceso'	'Cariotipo x Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento x Proceso'
Tigmotaxis (S1-S12)	MANOVA MR 'Cariotipo x Tratamiento'	F_(11,115)=28.41, p<0.001	F_(1,115)33.482, p<0.001	F_(1,115)=4.192, p=0.043	F _(2,115) =0.205, p=0.815	F _(1,115) =2.201, p=0.141	F _(1,115) =1,000, p=3.71
Comparaciones post hoc entre cada par de curvas de aprendizaje	Ts RO4938581 vs. Ts Vehículo			F_(1,54)=5.995, p=0.018			
	Co RO4938581 vs. Co Vehículo			F _(1,69) =0.172, p=0.680			
	Ts Vehículo Codificación vs. Ts RO4938581 Codificación			F _(1,13) =2.951, P=0.110			
	Ts Vehículo Consolidación vs. Ts RO4938581 Consolidación			F _(1,18) = 2.315, P=0.146			
	Ts Vehículo Recuperación vs. Ts RO4938581 Recuperación			F _(1,19) =1.085, p=0.311			
	Co Vehículo Codificación vs. Co RO4938581 Codificación			F _(1,26) =0.809, p=0.377			
	Co Vehículo Consolidación vs. Co RO4938581 Consolidación			F _(1,20) =3.749, P=0.067			
	Co Vehículo Recuperación vs. Co RO4938581 Recuperación			F _(1,19) =0.094, p=0.763			
	Ts Vehículo Codificación vs. Co Vehículo Codificación		F_(1,18)=20.737, p<0.001				
	Ts Vehículo Consolidación vs. Co Vehículo Consolidación		F_(1,19)=1.978, p=0.176				
	Ts Vehículo Recuperación vs. Co Vehículo Recuperación		F_(1,20)=6.244, p=0.021				

2.1.1.5. Memoria espacial

Después de las 4 últimas sesiones de adquisición, en las que la plataforma permaneció en la misma posición, se realizó una prueba de retirada de la plataforma para valorar la memoria de los ratones de esta posición, es decir, por dónde la buscaban. Para ello se cuantificó el tiempo que pasaban en el cuadrante donde había estado situada en las cuatro últimas sesiones y en el resto de los cuadrantes, así como el número de veces que cruzaban por encima del lugar exacto donde había estado la plataforma.

Cuando se valoró el tiempo que pasaban los animales TS y CO bajo los dos tratamientos, independientemente del proceso que se estuviera evaluando, en el cuadrante entrenado, se observó que todos los grupos de animales, excepto el de TS tratados con vehículo, pasaban significativamente más tiempo en el cuadrante entrenado que en el resto de los cuadrantes (**figura 29, tabla 15**). Estos resultados indican que tanto los ratones CO como los TS tratados con RO4938581 recordaban mejor la posición de la plataforma que los TS que recibieron vehículo. Por lo tanto, el tratamiento con este NAM recuperó el déficit en memoria espacial del ratón TS.

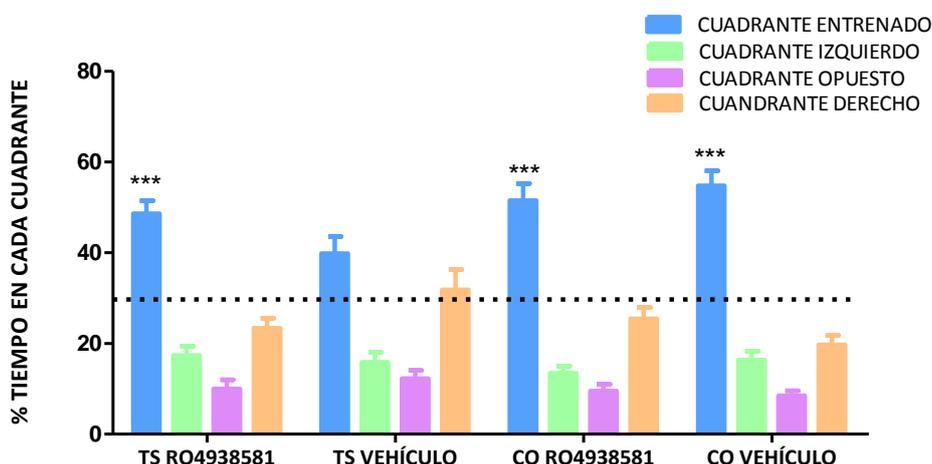


Figura 29. El tratamiento con RO4938581 produjo una mejoría en la memoria espacial del ratón TS. Media \pm E.E.M. del tiempo que pasaron en cada cuadrante durante la sesión de retirada de la plataforma los ratones CO y TS tratados con vehículo y con RO4938581. ***: $p < 0.001$ cuadrante entrenado vs. resto de cuadrantes. ANOVA 'cuadrante'. La línea punteada representa el porcentaje de tiempo debido a la casualidad (25 %).

Cuando se evaluó por separado el efecto del tratamiento con RO4938581 antes de cada uno de los procesos se observó que el efecto beneficioso de este fármaco era debido a la mejoría de los tres procesos. Todos los animales que recibieron este NAM, bien antes de la *codificación*, durante la *consolidación* o antes de la *recuperación* de la información, mostraron una mejor memoria de la posición de la plataforma (**figura 30, tabla 15**).

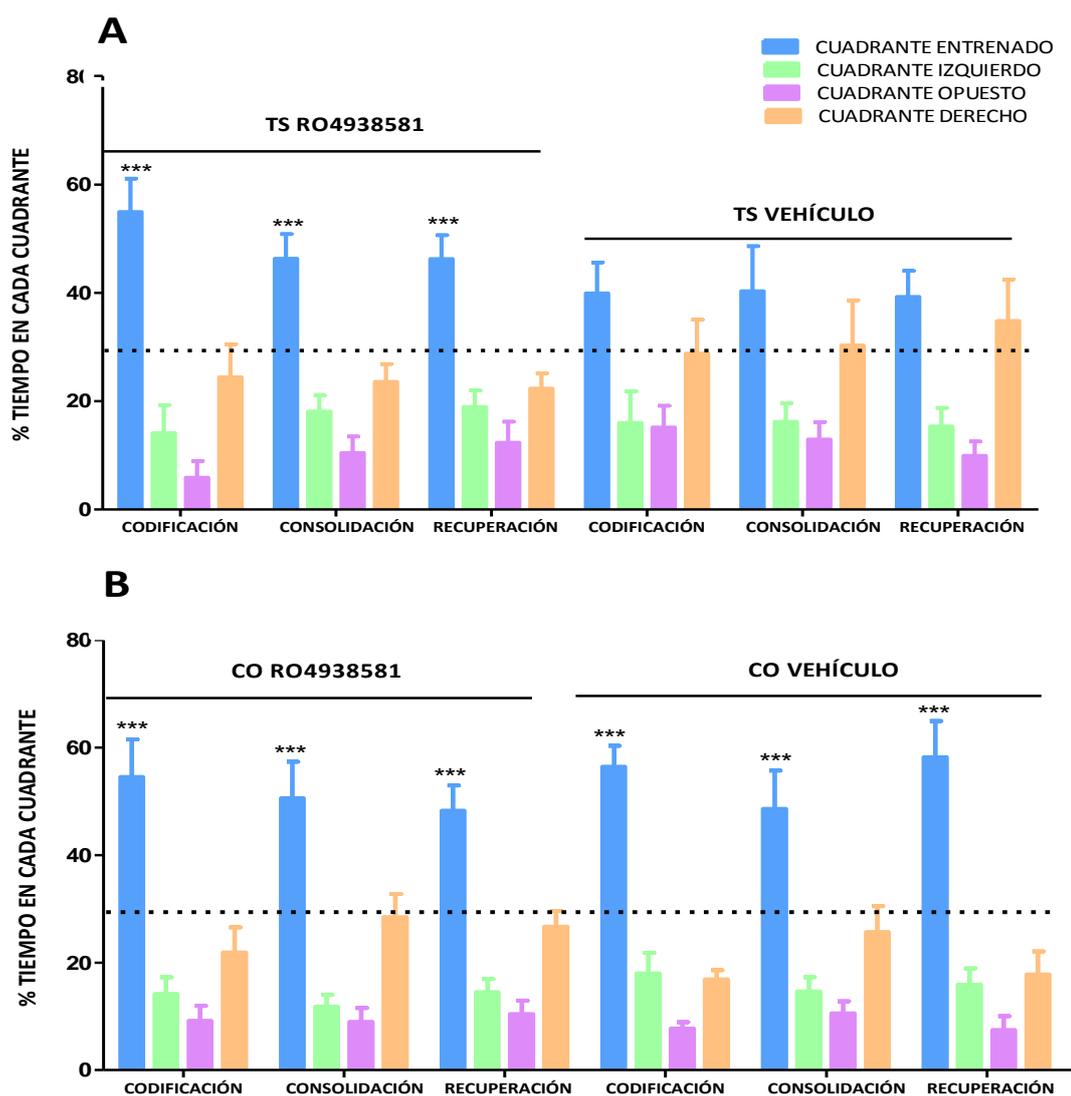


Figura 30. El tratamiento con RO4938581 produjo una mejoría en la memoria espacial del ratón TS. Media \pm E.E.M. del porcentaje de tiempo que pasaron en cada cuadrante durante la sesión de retirada de la plataforma de los ratones TS (A) y CO (B) tratados con vehículo y con RO4938581. ***: $p < 0.001$ cuadrante entrenado vs. resto de cuadrantes. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos. La línea punteada representa el porcentaje de tiempo debido a la casualidad (25 %).

En el caso de los ratones CO, todos ellos mostraron una buena memoria de la posición de la plataforma y la administración de RO4938581 en los distintos momentos de los procesos de aprendizaje no produjo ningún beneficio adicional (**figura 30B, tabla 15**).

Respecto al número de cruces sobre la posición en la que había estado la plataforma en las cuatro últimas sesiones de adquisición, los resultados indican que los ratones TS tratados con RO4938581 realizaron más cruces por encima de la posición de la plataforma que los ratones TS tratados con vehículo ($p < 0.05$, **figura 31A**). Este tratamiento también incrementó el número de entradas que realizaron los ratones TS en el cuadrante entrenado ($p = 0.03$; **figura 31B**).

Estos resultados aportan más evidencias de que RO4938581 mejora la memoria espacial de los ratones TS, ya que su administración palió los déficits en este proceso cognitivo que presentan los ratones TS tratados con vehículo.

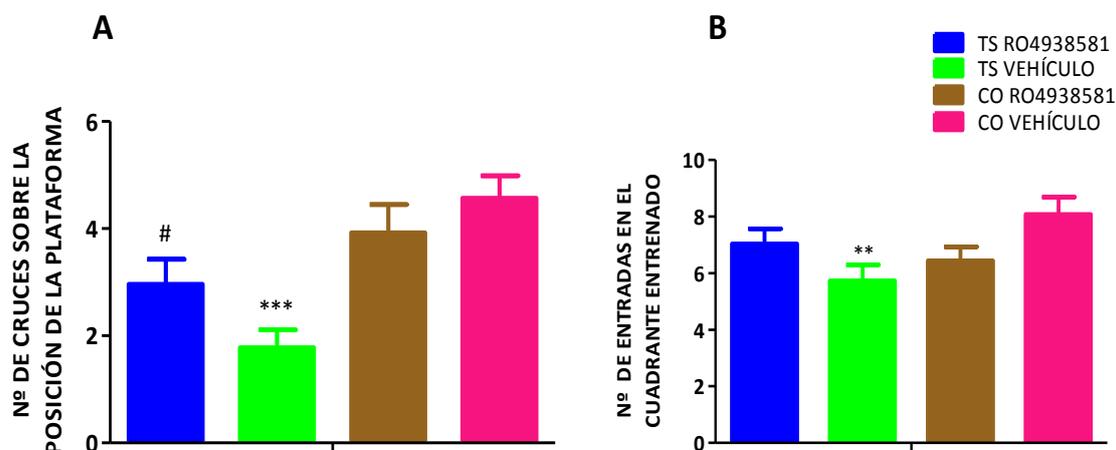


Figura 31. El tratamiento con RO4938581 produjo una mejoría en la memoria espacial del ratón TS. Media \pm E.E.M. del número de cruces sobre la posición de la plataforma (A) y del número de entradas en el cuadrante entrenado durante la sesión de retirada de la plataforma (B) de todos los grupos de ratones. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ TS vs. CO; #: $p < 0.05$ RO4938581 vs. Vehículo. Pruebas Bonferroni tras ANOVAs significativos.

Además, el tratamiento con RO4938581 incrementó el número de cruces sobre el lugar donde estaba situada la plataforma en los grupos TS de *codificación*,

consolidación y recuperación de la información (**figura 32A**). Sin embargo, no produjo ningún efecto en el número de entradas en el cuadrante entrenado (**figura 32B**).

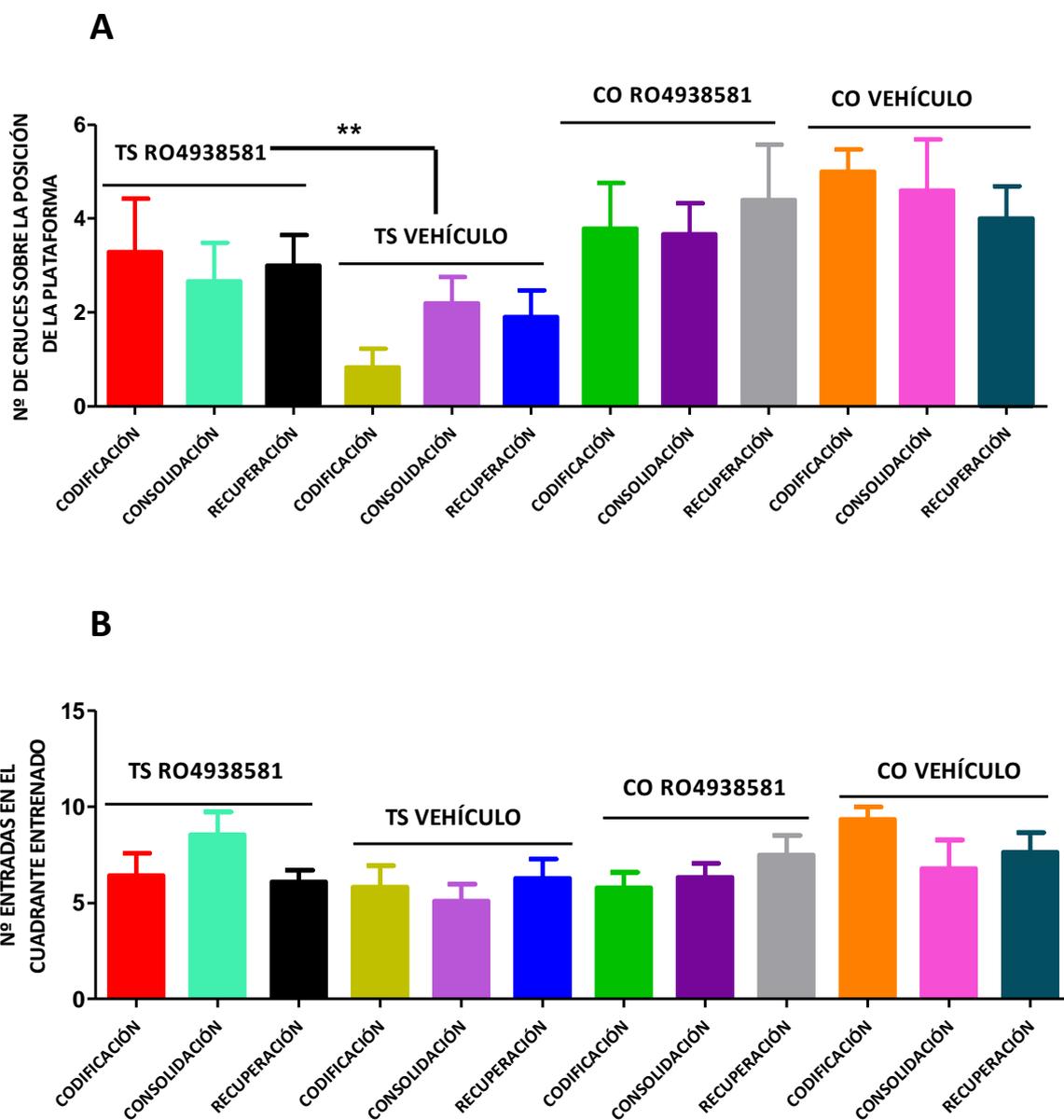


Figura 32. El tratamiento con RO4938581 palió los déficits en memoria espacial del ratón TS mejorando los tres procesos cognitivos. Media \pm E.E.M. del número de cruces sobre la posición de la plataforma (A) y del número de entradas en el cuadrante entrenado durante la sesión de retirada de la plataforma (B) de todos los grupos de ratones. **: $p < 0.01$ ANOVA 'cariotipo'.

En resumen, el tratamiento con RO4938581 parece producir sus efectos procognitivos mejorando la *consolidación* de la información en el aprendizaje y memoria de

referencia y de trabajo y la *codificación, consolidación y recuperación* de la información en la memoria espacial.

Tabla 15. Prueba del laberinto acuático de Morris. Ensayo de retirada de la plataforma. Media \pm E.E.M. y valores F y p de los MANOVAs ('cariotipo x tratamiento') para cada variable independiente analizada en el ensayo de retirada de la plataforma del laberinto acuático de Morris.

	MANOVA 'Cariotipo x Tratamiento'	'Sesión'	'Cariotipo'	'Tratamiento'	'Proceso'	'Cariotipo x Tratamiento'	'Cariotipo x Tratamiento x Proceso'
Ensayo de retirada de la plataforma	Porcentaje de tiempo en el cuadrante entrenado		F_(1,115)=5.230, p= 0.024	F _(1,115) =0.227, p=0.634	F _(1,115) =0.626, p=0.537	F_(1,115)=4.381, p=0.039	F _(1,115) =0.057, p=0.944
	Nº de cruces sobre la plataforma		F_(1,115)=15.783, p<0.001	F _(1,115) =1.089, p=0.299	F _(1,115) =0.015 p=0.985	F _(1,115) = 3.005, p= 0.086	F _(1,115) = 1.02, p=0.363
	Nº de entradas en el cuadrante entrenado		F _(1,115) =2.184, p=0.142	F _(1,115) =0.010, p=0.919	F _(1,115) =0.045 p=0.956	F_(1,115)= 4.639, p=0.033	F _(1,115) = 1.26, p=0.286

Discusión

1 Estudio I: Efecto de la administración crónica, durante etapas tempranas, de moduladores alostéricos negativos selectivos para la subunidad GABA_Aα5 sobre los déficits cognitivos y conductuales del ratón Ts65Dn

En el SD tienen lugar diversas anomalías estructurales y funcionales en el SNC (Bartesaghi *et al.*, 2011; Rueda *et al.*, 2012). Estas anomalías dan lugar a alteraciones neurológicas, cognitivas y conductuales, aunque con una variada incidencia e intensidad (Flórez *et al.*, 2015). Entre ellas la más destacable es la discapacidad intelectual que se caracteriza por alteraciones en el aprendizaje, problemas de memoria y lenguaje (Sella *et al.*, 2013; Belacchi *et al.*, 2014; Yoder *et al.*, 2014), defectos cognitivos en el procesamiento auditivo-verbal, problemas de atención y problemas adaptativos a la vida cotidiana (Lott y Dierssen, 2010).

Entre las posibles causas de estas alteraciones cognitivas se ha propuesto que una de las más relevantes podría ser la sobreinhibición mediada por el receptor GABA_A. Numerosos estudios han demostrado el importante papel de esta sobreinhibición en las alteraciones del aprendizaje y la memoria del ratón TS (Fernández *et al.*, 2007; Kleschevnikov *et al.*, 2012).

Los avances en los métodos de enseñanza y la incorporación de la educación han demostrado ser beneficiosos para las personas con síndrome de Down, pero claramente no son suficientes para contrarrestar los déficits cognitivos (Wishart *et al.*, 2007). Por tanto, es necesaria la búsqueda de otras estrategias terapéuticas para intentar paliar estos déficits.

La demostración del papel de la inhibición mediada por GABA en el ratón TS llevó a evaluar la eficacia de diferentes fármacos antagonistas del receptor GABA_A. Estos tratamientos atenuaban los déficits cognitivos de estos animales pero provocaban importantes efectos secundarios, como convulsiones o un incremento de la ansiedad (Martínez-Cué *et al.*, 2014). Estudios en los que se manipuló genéticamente a ratones normales demostraron que la subunidad α5 del receptor GABA_A está implicada en la

regulación de los procesos cognitivos, pero no en los efectos ansiogénicos o proconvulsivantes producidos por la activación de otras subunidades de este receptor (Collinson *et al.*, 2002; Crestani *et al.*, 2002). Tras estos trabajos se propuso que los NAMs selectivos para los receptores GABA_Aα5 podrían mejorar la cognición en las personas con SD sin producir efectos secundarios.

Por lo tanto, en este primer estudio se valoró la capacidad de tres NAMs selectivos para la subunidad α5 del receptor GABA_A, RO4938581, R1 y R2, para paliar los déficits cognitivos de los ratones TS durante etapas tempranas.

1.1. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 sobre el aprendizaje espacial y la memoria de referencia

Para evaluar el efecto del tratamiento crónico de los tres NAMs sobre el **aprendizaje espacial** y la **memoria de referencia** de los ratones TS y CO se utilizó el laberinto acuático de Morris.

Aunque todos los grupos de ratones bajo los distintos tratamientos aprendieron la posición de la plataforma durante las **sesiones de adquisición**, ya que redujeron progresivamente la latencia para alcanzar la plataforma, los ratones TS de todas las condiciones experimentales mostraron un pronunciado déficit de aprendizaje. Estos animales presentaron mayores latencias de escape durante las sesiones de adquisición en comparación con los ratones CO. Estos resultados son consistentes con los encontrados en estudios previos que indican que el ratón TS muestra un marcado déficit de aprendizaje en las sesiones de adquisición en las que la plataforma permanece oculta en la prueba del laberinto acuático de Morris (Escorihuela *et al.*, 1995; Holtzman *et al.*, 1996; Rueda *et al.*, 2008). Sin embargo, tras la administración de RO4938581, R1 o R2 mejoró el aprendizaje y la memoria espacial de los ratones TS. Esta mejoría fue más evidente durante las cuatro primeras sesiones, que presentan una mayor dificultad para los animales y permiten observar mayores diferencias intergrupales durante la ejecución de la tarea.

El tratamiento crónico con los tres fármacos, especialmente con R1, mejoró de forma significativa el aprendizaje de referencia espacial en los ratones TS. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en un estudio previo realizado en este laboratorio en el que se observó una mejoría en la ejecución de los ratones TS adultos tras la administración de RO4938581 (Martínez-Cué *et al.*, 2013) y con otros estudios en los que se administró $\alpha 5$ IA, otro NAM selectivo para la subunidad $\alpha 5$ (Braudeau *et al.*, 2011b).

En el caso del grupo CO, la administración crónica de R2 produjo una mejoría significativa en la ejecución de estos ratones en las sesiones de adquisición respecto a los que fueron tratados con vehículo. Esta mejoría en ratones sin déficits cognitivos también se observó en otro estudio similar en el que el bloqueo del receptor GABA α 5 se realizó genéticamente (Collinson *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque el tratamiento con R1 o con RO4938581 produjo una tendencia a reducir la latencia de llegada a la plataforma de los ratones CO, mejorando su aprendizaje espacial, este efecto no alcanzó la significación estadística. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en estudios anteriores en los que tampoco se observó un efecto de otros NAMs sobre el aprendizaje del grupo CO (Braudeau *et al.*, 2011b; Martínez-cué *et al.*, 2013).

Durante las sesiones de **aprendizaje guiado** el tratamiento con RO4938581, R1 o R2 también mejoró ligeramente la ejecución de los ratones TS y CO. Aunque la administración de cada uno de los NAMs produjo diferentes efectos en el rendimiento de los ratones TS. Mientras R1 apenas modificó la ejecución de estos ratones en comparación con el grupo TS tratado con vehículo, RO4938581 y especialmente R2 redujeron las latencias de escape de estos animales. Diferentes estudios han mostrado que los ratones TS presentan una ejecución deficiente (Reeves *et al.*, 1995; Holtzman *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2012) o no presentan diferencias (Escorihuela *et al.*, 1995; Sago *et al.*, 2000; Martínez-Cué *et al.*, 2002; Corrales *et al.*, 2013) en las sesiones de aprendizaje guiado. Estas diferencias encontradas en la ejecución de los ratones TS durante las sesiones de aprendizaje guiado en los distintos estudios pueden deberse a la gran variabilidad intragrupal que muestran estos ratones. Es posible que esta alteración alcance en algunos casos la significación estadística y en otros no,

dependiendo de pequeñas variaciones en las características de distintas cohortes de animales.

Los resultados observados en este estudio sugieren que la administración crónica de los tres NAMs mejoró moderadamente el aprendizaje espacial y la memoria de referencia del grupo TS. Estudios farmacológicos, consistentes con este trabajo, han demostrado que la administración de diferentes NAMs selectivos para la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A mejora la cognición en ratas (Chambers *et al.*, 2004; Sternfeld *et al.*, 2004; Atack *et al.*, 2006; Collinson *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2006) y en el ratón TS (Braudeau *et al.*, 2011b; Martínez-Cué *et al.*, 2013). De igual manera se ha demostrado que la administración de RO4938581 a ratas, a las que se había inducido farmacológicamente un déficit cognitivo, mejoró su cognición (Ballard *et al.*, 2009).

Por lo tanto, parece que la reducción de la inhibición mediada por el receptor GABA_A $\alpha 5$, tanto farmacológica como genéticamente, produce en roedores una mejoría del aprendizaje y memoria (Collinson *et al.*, 2002; Potier *et al.*, 2014).

Debido al papel que tiene el sistema GABAérgico en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Tozuka *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006; Earnheart *et al.*, 2007), es posible que la reducción de la inhibición mediada por GABA_A tras la administración de los tres NAMs haya podido paliar estos fenotipos alterados en el ratón TS. Dado que la neurogénesis hipocampal adulta tiene un papel fundamental en el aprendizaje y memoria espacial (Malberg *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2002; Bianchi *et al.*, 2010a), su mejoría en el ratón TS podría ser uno de los mecanismos implicados en los efectos procognitivos de estos NAMs. Por otro lado, la reducción de la inhibición mediada por el receptor GABA_A, normaliza la LTP, base fisiológica del aprendizaje en el ratón TS.

Anteriores trabajos de este laboratorio han demostrado que en ratones adultos la administración de RO4938581 normaliza la LTP y la neurogénesis hipocampal adulta en el ratón TS (Martínez-Cué *et al.*, 2013). Futuros estudios deberían evaluar si estos mecanismos están también implicados en los efectos procognitivos que se observan tras el tratamiento con estos tres NAMs en ratones jóvenes en este estudio.

1.2. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 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**.

Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los ratones de ambos cariotipos en la distancia recorrida o en el tiempo dedicado a la exploración de los agujeros, los ratones TS mostraron una atención deficiente, ya que repitieron un mayor número de veces la exploración de los agujeros recientemente explorados (índice ABA e índice ABA/número de exploraciones). Estos resultados son consistentes con los encontrados en otros estudios en los que también se demostraron déficits de atención en ratones TS (Driscoll *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2010). Se ha sugerido que estas alteraciones en la atención podrían ser una de las causas de los déficits de aprendizaje encontrados en estos animales. Sin embargo, en el presente trabajo, la administración crónica de los NAMs, que había producido efectos procognitivos, no palió la menor atención de los ratones TS ni modificó su actividad exploratoria.

Está bien establecido que la capacidad de atención está mediada por la adecuada modulación serotoninérgica en la corteza frontal y la colinérgica del prosencéfalo basal (Carter *et al.*, 2005; Knudsen, 2007; Krinsky-McHale *et al.*, 2008; Enge *et al.*, 2012). La morfología y función de ambas estructuras está alterada en el ratón TS (Hunter *et al.*, 2004; Stagni *et al.*, 2015). Por lo tanto, el hecho de que los NAMs no mejoren la atención y la actividad exploratoria de los animales TS podría deberse a que los receptores GABA_Aα5 están localizados preferentemente en el hipocampo (Möhler *et al.*, 1996; Rudolph y Möhler, 2006), por lo que su modulación alostérica no modificaría la actividad de los sistemas serotoninérgicos y colinérgicos implicados en los procesos atencionales.

1.3. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 sobre la actividad general y la ansiedad

Para evaluar el efecto de la administración de los tres NAMs sobre la **actividad general y la ansiedad** en los animales TS y CO se realizaron dos pruebas: **campo abierto** y **laberinto elevado en cruz**.

En la prueba del **campo abierto** se observó que los ratones TS tratados con vehículo tendían a ser hiperactivos, de manera consistente con lo encontrado en estudios previos que demostraron que el ratón TS era hiperactivo en distintas condiciones experimentales (Escorihuela *et al.* 1995; Coussons-Read y Crnic, 1996) debido a una reducción de la atención hacia estímulos potencialmente peligrosos (Crnic y Pennington, 2000). Aunque los ratones TS tratados con vehículo tendían a ser hiperactivos, ya que recorrían una mayor distancia en el centro y periferia del aparato, este efecto no alcanzó la significación estadística. Por otro lado, la administración de los distintos NAMs no modificó la ansiedad de los animales durante esta prueba, ya que no se encontraron diferencias en el porcentaje de tiempo que pasaron los distintos grupos de animales en el centro del aparato, que constituye un índice de ansiedad. Resultados consistentes con los encontrados tras la administración de RO4938581 (Martínez-Cué *et al.*, 2013) o $\alpha 5IA$ (Braudeau *et al.*, 2011b) en la misma prueba.

En la prueba del **laberinto elevado en cruz** tampoco se encontraron diferencias significativas entre los ratones de ambos cariotipos, bajo los diferentes tratamientos, en la actividad general o en los diferentes índices de ansiedad. Los ratones TS y CO bajo los distintos tratamientos no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de distancia recorrida en los brazos abiertos, el tiempo inicial de congelación o en el número de comportamientos de evaluación de riesgo.

Por lo tanto, ninguno de los NAMs administrados en este estudio afectó a la actividad general de los animales ni produjo efectos ansiogénicos, al igual que en otros estudios donde se observó que el bloqueo, tanto farmacológico como genético, del receptor

GABA_Aα5 no modificó la ansiedad de los animales (Collinson *et al.*, 2002; Crestani *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2004; Braudeau *et al.*, 2011b; Martínez-Cué *et al.*, 2013).

El hecho de que no se observen modificaciones en la ansiedad de los animales tras la administración de los NAMs es debido a que estos moduladores actúan selectivamente sobre la subunidad α5 del receptor GABA_A y no modifican la actividad de la subunidad α2, que participa activamente en la regulación de la ansiedad (Rudolph *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2012; Engin *et al.*, 2016).

1.4. Efecto de la administración de RO4938581, R1 y R2 sobre la actividad espontánea, los reflejos sensoriales y la coordinación motora

En la prueba de **actimetría** en la que se valora la **actividad espontánea** de los animales, a pesar de que se observó una tendencia de los ratones TS y CO a presentar menor actividad durante la fase de oscuridad tras el tratamiento con los distintos NAMs, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. Por tanto, los distintos tratamientos no modificaron la actividad realizada por los ratones en su jaula habitual durante las fases de luz o de oscuridad. Estos resultados son consistentes con los encontrados en un estudio que demostró que la administración de RO4938581 no modifica la actividad espontánea de los ratones TS o CO (Martínez-Cué *et al.*, 2013).

En las **pruebas sensoriales y motoras** se observó que todos los ratones TS, tratados con vehículo o con cada uno de los NAMs, presentaron una mayor respuesta de sobresalto, un menor equilibrio en la barra de madera y una alteración del reflejo prensil, lo que indica una mayor respuesta a estímulos auditivos y una peor coordinación motora en estos ratones. Costa *et al.*, (1999, 2010) también encontraron déficits en la coordinación motora del ratón TS.

Esta falta de efecto de los diferentes NAMs sobre las capacidades motoras de los ratones también se observó en la prueba de rotarod ya que ninguno de los tratamientos modificó la latencia de caída de los animales en las distintas condiciones experimentales. La administración de otro NAM selectivo para GABA_Aα5, α51A,

tampoco afectó a la coordinación motora de ratones CO en la misma prueba (Dawson *et al.*, 2006).

Por lo tanto, de estos resultados se deduce que la administración crónica de RO4938581, R1 o R2 no modificó la actividad espontánea de los ratones en sus jaulas habituales durante 24 horas y tampoco afectó las habilidades sensorimotoras (reflejos de agarre y enderezamiento, fuerza, equilibrio, capacidad de tracción) o la coordinación motora en la prueba del rotarod de los ratones TS o CO. Estos resultados coinciden con otros estudios en los que se observó que las capacidades sensoriales y la coordinación motora no se veía alterada por la administración de $\alpha 5IA$ y RO4938581 (Braudeau *et al.*, 2011b; Martínez-Cué *et al.*, 2013). Así mismo, Ballard *et al.* (2009) confirmaron que, a diferencia de los moduladores negativos no selectivos del receptor $GABA_A$ (Dorow *et al.*, 1983), RO4938581 no inducía efectos secundarios relevantes en el SNC. Tras la administración de RO4938581 a ratas, estos autores no observaron efectos sobre la actividad espontánea, sobre la fuerza muscular, la coordinación motora, o la probabilidad de sufrir convulsiones. Además, no observaron efectos sedantes en monos.

En conjunto, estos resultados sugieren que, de manera similar a lo que ocurría tras el tratamiento con distintos NAMs a ratones TS adultos, la administración de RO4938581, R1 o R2 a ratones TS jóvenes produce efectos procognitivos, sin recuperar sus déficits de atención y sin producir efectos adversos.

2. Estudio II: Estudio del efecto de la administración subcrónica de un modulador alostérico negativo para la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A sobre los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información del ratón Ts65Dn

Como se ha mencionado con anterioridad, la relativa contribución de los déficits en la codificación, consolidación y recuperación de la información a la disfunción de la memoria en personas con discapacidad intelectual está aún en debate (Carlesimo *et al.*, 1997). Varios estudios indican que las causas de los déficits que presentan las personas con SD en la memoria y el aprendizaje podrían deberse a alteraciones que afectan a los tres procesos cognitivos (Carlesimo *et al.*, 1997; Lott y Dierssen, 2010; Milojevich y Lukowski 2016).

Al igual que ocurre en las personas con SD (Nadel, 2003), el ratón TS muestra acusados déficits en su aprendizaje y memoria (Rueda *et al.*, 2012) aunque tampoco se conoce con exactitud en qué medida se encuentran alterados los procesos de codificación, consolidación y recuperación de la información en este modelo animal de SD.

Por otro lado, sí es conocido el efecto procognitivo de RO4938581, ya que varios estudios han demostrado que el tratamiento con este fármaco mejora el aprendizaje y memoria en monos, ratas y ratones sin provocar efectos secundarios (Ballard *et al.*, 2009), rescatando además los déficits cognitivos, electrofisiológicos y la neurogénesis de los ratones TS adultos (Martínez-Cué *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en este segundo estudio el objetivo era evaluar si el efecto procognitivo de RO4938581 en los ratones TS, observado también en el Estudio I, era debido a cambios en los procesos de codificación, consolidación y/o recuperación de la información.

2.1. Efecto de la administración subcrónica de RO4938581 sobre el aprendizaje, la memoria de referencia y la memoria de trabajo

De manera similar a lo encontrado en el Estudio I y en numerosos trabajos (Escorihuela *et al.*, 1995; Holtzman *et al.*, 1996; Rueda *et al.*, 2008; García-Cerro *et al.*, 2014), los ratones TS mostraron un pronunciado déficit de aprendizaje en la **prueba del laberinto acuático de Morris**, tanto en las sesiones de adquisición, en las que la plataforma se encontraba cada día en una posición diferente, como en las que la posición de la plataforma se mantuvo constante.

En este segundo Estudio, el tratamiento con RO4938581 mejoró significativamente la ejecución de todos los grupos de ratones TS adultos durante las sesiones de adquisición. Estos resultados son similares a los encontrados cuando el fármaco se administró de forma crónica a ratones jóvenes, en el Estudio I de este trabajo, o a ratones TS adultos (Martínez-Cué *et al.*, 2013). De hecho, los ratones TS tratados con este NAM durante los 16 días que duró este experimento tuvieron menos dificultades para aprender la localización de la plataforma, ya que mostraron una menor latencia de escape que los tratados con vehículo. Los beneficios fueron evidentes tanto cuando se analizó la memoria de referencia (ejecución de los ratones a lo largo de las sesiones) como cuando se valoró la memoria de trabajo (ejecución a lo largo de los ensayos de una misma sesión). Por lo tanto, y de manera consistente con los resultados obtenidos tras tratamientos crónicos en los que se demostró el efecto procognitivo de $\alpha 5IA$ (Braudeau *et al.*, 2011b) y de RO4938581 (Martínez-Cué *et al.*, 2013), el tratamiento con este último NAM consiguió mejorar la memoria de referencia en los ratones TS. Además, la administración de RO4938581 también mejoró la memoria de trabajo de los ratones TS tanto tras su administración subcrónica en este Estudio, como tras su administración crónica (Martínez-Cué *et al.*, 2013).

De manera similar a lo observado en el Estudio I, la administración de RO4938581 no produjo ningún beneficio sobre las memorias de referencia o de trabajo de los ratones CO, ya que tanto los ratones CO tratados con el NAM como los tratados con vehículo mostraron latencias similares de llegada a la plataforma. En esta misma prueba el

tratamiento con distintos NAMs tampoco mejoró la ejecución de los ratones CO (Braudeau *et al.*, 2011b; Martínez-Cué *et al.*, 2013). Esta circunstancia puede deberse a un “efecto techo” es decir, que la ejecución de los ratones CO tratados con vehículo fuera tan eficaz en nuestras condiciones experimentales que resultara difícil detectar una mejoría adicional en el aprendizaje y la memoria de estos ratones tras el tratamiento farmacológico.

Por otro lado, durante las sesiones de **aprendizaje guiado** no se encontraron diferencias en la ejecución de los distintos grupos experimentales. Este resultado y el hecho de que los ratones TS o CO bajo los distintos tratamientos tampoco difirieran en la velocidad de natación descartan que las diferencias encontradas durante las sesiones de adquisición fueran debidas a déficits motores o motivacionales. Esta interpretación es apoyada por los resultados obtenidos en otros estudios en los que los ratones TS tampoco mostraron alteraciones en su ejecución durante las sesiones de aprendizaje guiado o en la velocidad de natación durante las sesiones de adquisición (Escorihuela *et al.*, 1995; Sago *et al.*, 2000; Martínez-Cué *et al.*, 2002; Corrales *et al.*, 2013).

2.1.1. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en el ratón TS

Cuando se valoró el efecto procognitivo de RO4938581 sobre la memoria de referencia de los ratones TS, se observó que aquellos a los que se les administró este fármaco una hora antes de la prueba del laberinto acuático de Morris (grupo de *codificación*) mostraron una tendencia, no significativa, a aprender mejor la situación de la plataforma. Estos resultados son similares a los encontrados en otro estudio, en el que demostraron que tras administrar un NAM a ratas sin deterioro cognitivo éstas mostraban una mejoría durante el proceso de *codificación* de la información (Collinson *et al.*, 2006). Sin embargo, cuando se valoró la memoria de trabajo en el presente Estudio, se observó que la administración de RO4938581 una hora antes de comenzar el entrenamiento en el laberinto acuático de Morris no mejoró la *codificación* de la información de los animales TS.

Respecto al efecto de RO4938581 sobre la *consolidación* de la información, los ratones TS que recibieron este fármaco al comenzar la prueba mostraron un mejor desempeño de la tarea que aquellos que recibieron vehículo. Estos resultados fueron evidentes cuando se valoró tanto la memoria de referencia como la memoria de trabajo. Por lo tanto, estos datos sugieren que el efecto procognitivo de RO4938581 sobre ambos tipos de memoria en los ratones TS, es principalmente debido a una mejoría en el proceso de *consolidación* de la información. En un estudio en el que se evaluó el efecto de otro NAM sobre la expresión de genes en el hipocampo de ratones TS y euploides tras la tarea del laberinto acuático de Morris (Braudeau *et al.*, 2011a) se encontró una activación de los IEGs en los ratones TS. Entre estos genes tienen particular importancia *c-Fos* y *Arc*, cuya expresión está alterada en este modelo animal de SD (Baudreau *et al.*, 2011a; Potier *et al.*, 2014), porque juegan un papel clave en el aprendizaje y la memoria ya que parecen estar implicados en los procesos de *consolidación* de la información (Miyashita *et al.*, 2008). Por tanto, el incremento de su activación podría ser parcialmente responsable de la mejoría en la *consolidación* de la información encontrados en el ratón TS tras la administración de RO4938581.

Sin embargo, para dilucidar los mecanismos neuromorfológicos y funcionales que median la mejoría en la *consolidación* de la información inducida por este NAM, será necesario realizar estudios histológicos y electrofisiológicos. Numerosas evidencias indican que la neurogénesis hipocampal adulta está implicada en el establecimiento de la LTP, mecanismos que se encuentran alterados en el ratón TS y que juegan un papel importante en el aprendizaje y la memoria dependientes de hipocampo (Malberg *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2002; Bianchi *et al.*, 2010a). Tanto la estructura como la función del hipocampo están alteradas en el ratón TS. El hipocampo interactúa con la corteza prefrontal en la *consolidación* de la información espacial (Churchwell *et al.*, 2010). Debido a que el hipocampo está implicado en el procesamiento y transferencia de la información de la memoria de corto plazo a la memoria de largo plazo (Ward, 2009), si no se normaliza totalmente su anatomía y función el proceso de *consolidación* de la información podría verse comprometido. Como se describió anteriormente, resultados de este laboratorio han demostrado que tras la administración de RO4938581 se mejoró la función cognitiva, la LTP y la neurogénesis hipocampal de los ratones TS

adultos (Martínez-Cué *et al.*, 2013). Por lo tanto, la mejoría de los procesos de *consolidación* de la información encontrados en el presente estudio podría ser debida a que la administración de RO4938581 ha paliado las alteraciones neuromofológicas y funcionales del hipocampo de los ratones TS.

En lo que se refiere al efecto de RO4938581 sobre la *recuperación* de la información, la administración de este NAM una hora antes de recuperar la información consolidada no modificó la memoria de referencia o de trabajo de los ratones TS. En otro estudio similar realizado en ratones en la misma prueba, se evaluó la implicación de la región CA3 del hipocampo en los tres procesos cognitivos (Florian y Roullet, 2004). Estos autores demostraron que esta área juega un papel fundamental en los procesos de *codificación* y *consolidación* de la información, pero no en la *recuperación* de la información. Está bien establecido que los receptores GABA_Aα5 median la inhibición tónica en las neuronas corticales y en las células piramidales de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (Caraiscos *et al.*, 2004; Glykys y Mody, 2006; Prenosil *et al.*, 2006; Möhler, 2007; Yamada *et al.*, 2007). Por tanto, en el presente estudio RO4938581 podría estar ejerciendo su efecto procognitivo mejorando la función de la región CA3 del hipocampo y, por tanto, los procesos cognitivos de *codificación* y *consolidación* de la información, pero no la *recuperación* ya que en este proceso participa la activación de esta región.

Sin embargo, Collinson *et al.* (2006) demostraron una mejoría en la *recuperación* de la información de ratas normales tras la administración del NAM α5IAII. Las discrepancias entre este estudio y los anteriores podrían deberse a que se utilizaran diferentes modelos animales, diferentes protocolos de la prueba del laberinto acuático de Morris o a diferencias en la eficacia relativa de los distintos NAMs administrados.

Por otro lado, el hecho de que se produzcan efectos sobre la *consolidación* y no sobre la *recuperación* de la información puede deberse, según sugieren varios autores, a que los procesos moleculares de la *consolidación* y de la *recuperación* de la información pueden ser diferentes (Bourtchouladze *et al.*, 1998; Goosens *et al.*, 2000; Abel y Lattal, 2001; Lattal y Abel, 2001). Es decir, que RO4938581 podría estar favoreciendo la

síntesis de proteínas necesarias para la *consolidación* de la información, pero no las necesarias para la *recuperación* de la información.

2.1.2. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en el ratón CO

Los ratones CO del grupo de *codificación* que recibieron RO4938581 mostraron una peor ejecución en la prueba, cuando se evaluó la memoria de referencia, que los animales que fueron tratados con vehículo. Esto sugiere que este NAM empeoró la *codificación* de la información a largo plazo en los ratones CO. Sin embargo, cuando se evaluó la memoria de trabajo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo CO tratado con RO4938581 y el tratado con vehículo antes de la *codificación* de la información a corto plazo, ya que la capacidad de recordar la posición de la plataforma dentro de cada sesión fue similar en ambos grupos.

En el presente estudio, el tratamiento con RO4938581 no tuvo efecto en la *consolidación* o la *recuperación* de la información de los ratones CO cuando se valoró la memoria de referencia o de trabajo.

Estudios en animales controles a los que se les bloqueó farmacológica o genéticamente el receptor GABA α 5 han arrojado resultados contradictorios. Tras el tratamiento con distintos NAMs se han descrito efectos procognitivos (Collinson *et al.*, 2002; Bradeau *et al.*, 2011a) o falta de efectos (Braudeau *et al.*, 2011b; Martínez-Cué *et al.*, 2013), mientras que el bloqueo genético da lugar a un empeoramiento del rendimiento de los animales sin déficits cognitivos (Crestani *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2004). En cuanto a los efectos de los NAMs sobre los distintos tipos de memoria, la administración de α 5IA mejora la memoria a corto plazo pero no la de referencia espacial en ratones euploides (Bradeau *et al.* 2011a).

En el presente estudio, la falta de efectos procognitivos de RO4938581 en ratones CO, a diferencia de lo que ocurre en ratones TS, podrían deberse a que en estos últimos el NAM está disminuyendo la sobree inhibición que presentan mientras que en los

ratones CO, que no presentan dicha inhibición, la acción del NAM podría ser menos eficaz o incluso compensada por otros mecanismos.

2.2. Efecto de la administración de RO4938581 sobre el aprendizaje y memoria procedimental

De manera consistente a lo descrito en numerosos trabajos (Escorihuela *et al.*, 1995; Martínez-Cué *et al.*, 2002; Braudeau *et al.*, 2011b), el ratón TS mostró una mayor tendencia a nadar por la periferia del tanque (tigmotaxis). Dado que la plataforma de escape estuvo situada durante toda la prueba en la zona central del tanque, nadar por la periferia del aparato es una estrategia inadecuada de búsqueda de la plataforma. A lo largo de las sesiones los ratones deberían inhibir su tendencia a nadar por la periferia y pasar cada vez mayor tiempo buscando la plataforma por la zona central. El hecho de que los ratones TS persistan en su comportamiento tigmotáctico indica un déficit en el aprendizaje de procedimientos.

En el presente estudio la administración de RO4938581 durante 16 días redujo el comportamiento tigmotáctico de los ratones TS. Estos resultados son consistentes con otros estudios en los que se observó una reducción del comportamiento tigmotáctico en los animales TS tratados con RO4938581 (Martínez-Cué *et al.*, 2013) y con α 5IA (Braudeau *et al.*, 2011b).

Este tratamiento no tuvo ningún efecto sobre la memoria de procedimiento de los ratones CO, a diferencia del estudio de Braudeau *et al.* (2011b) en el que los ratones CO tratados con α 5IA sí que redujeron su comportamiento tigmotáctico. Como se indicó anteriormente, es posible que, a diferencia del α 5IA, RO4938581 pudiera tener un efecto selectivo sobre la memoria únicamente cuando existe un exceso de inhibición, como en el caso de los ratones TS.

2.2.1. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en los ratones TS y CO

Cuando se evaluó el efecto del tratamiento con este NAM sobre los procesos de *codificación*, *consolidación* y *recuperación* de la información se observó que la administración de RO4938581 antes o durante los tres procesos tendió a reducir el comportamiento tigmotáctico de los ratones TS. De manera consistente con los beneficios ejercidos en la memoria de referencia y de trabajo, RO4938581 produjo una tendencia a reducir el comportamiento tigmotáctico de los ratones TS cuando se administró antes de la *codificación* o durante la *consolidación* de la información. Sin embargo, sus efectos fueron menos evidentes cuando se administró este NAM una hora antes de la *recuperación* de la información, ya que en este caso la mejoría únicamente se observó en las últimas sesiones. Sin embargo, ninguna de estas diferencias alcanzó la significación estadística.

Respecto a los ratones CO tratados con RO4938581 éstos también experimentaron cierta mejoría en su memoria de procedimiento cuando el NAM era administrado antes de la *codificación* o durante la *consolidación* de la información, aunque nuevamente estas diferencias no alcanzaron la significación estadística. Sin embargo, la administración de RO4938581 antes de la *recuperación* de la información no redujo el tiempo que pasaron los animales CO en la periferia del aparato.

Por lo tanto, el hecho de que el NAM haya mejorado la memoria de procedimiento de los ratones TS, aunque de manera no significativa, sobre todo durante los procesos de *codificación* y *consolidación* y éstos sean coherentes con los resultados obtenidos en los mismos procesos durante la valoración de la memoria de referencia, sugiere que esta mejoría en la estrategia de búsqueda de la plataforma podría haber jugado un papel en la mejor ejecución que se observa durante las sesiones de adquisición.

2.3. Efecto de la administración de RO4938581 sobre el aprendizaje y la memoria espacial

En la prueba de la retirada de la plataforma, la administración de RO4938581 mejoró la memoria espacial de los ratones TS. Los animales trisómicos tratados con este NAM, así como todos los grupos de ratones CO, recordaban mejor la posición donde se encontraba la plataforma en las cuatro sesiones anteriores, ya que pasaron un mayor porcentaje de tiempo en el cuadrante entrenado y realizaron un mayor número de cruces sobre el lugar donde había estado la plataforma. Sin embargo, los ratones TS que recibieron vehículo pasaron un tiempo similar en los cuatro cuadrantes. Por tanto, el tratamiento con este NAM recuperó el déficit en la memoria espacial del ratón TS. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otro estudio en el que se demostró que la administración crónica de RO4938581 mejoró la memoria espacial de los ratones TS (Martínez-Cué *et al.*, 2013).

2.3.1. Efecto de la administración de RO4938581 sobre los distintos procesos cognitivos en los ratones TS y CO

Por otro lado, cuando se evaluó el efecto del tratamiento con RO4938581 en cada uno de los procesos se observó que todos los animales TS que recibieron este NAM, bien antes de la *codificación*, durante la *consolidación* o antes de la *recuperación* de la información, mostraron una mejor memoria de la posición de la plataforma ya que todos ellos pasaron más tiempo en el cuadrante entrenado y realizaron un mayor número de cruces sobre la posición donde estaba la plataforma en las sesiones anteriores. Estos resultados sugieren que el efecto beneficioso de la administración de este fármaco sobre la memoria espacial es debido a la mejoría de los tres procesos. Otros estudios han demostrado que distintos NAMs selectivos para los receptores GABA_Aα5 mejoran tanto la *codificación* como la *recuperación* de la información en la memoria espacial de animales normales (Atack *et al.*, 2006; Collinson *et al.*, 2006). Además, en un estudio en el que se analizaron los procesos de *codificación*, *consolidación* y *recuperación* de la información sobre la memoria espacial tras la inactivación farmacológica del hipocampo en ratas se demostró el importante papel

que desempeña ésta estructura en cada uno de estos procesos (Riedel *et al.*, 1999). Por lo tanto, los efectos beneficiosos de la administración de RO4938581 sobre los tres procesos en la memoria espacial son probablemente debidos a la normalización de la estructura o función del hipocampo que, como se ha dicho anteriormente, están alteradas en el ratón TS.

En resumen, la modulación negativa del receptor GABA_A α 5 mediante el tratamiento con RO4938581 parece producir sus efectos procognitivos mejorando la *consolidación* de la información en el aprendizaje y memoria de referencia y de trabajo y la *codificación, consolidación y recuperación* de la información en la memoria espacial.

Conclusiones

1. La reducción de la inhibición mediada por el receptor GABA_Aα5 a través de la administración crónica de RO4938581, R1 o R2

1.1 En los animales TS:

1.1.1 Mejoró el aprendizaje espacial de referencia y la memoria espacial.

1.1.2 Este efecto fue más marcado tras la administración de R1.

1.1.3 No recuperó el déficit de atención y no modificó la conducta exploratoria.

1.1.4 No afectó a la actividad general ni produjo efectos ansiogénicos.

1.1.5 No modificó la actividad espontánea ni alteró las capacidades sensoriales o motoras.

1.2 En los animales CO:

1.2.1 La administración crónica de R2, pero no de R1 o RO4938581 mejoró el aprendizaje espacial.

1.2.2 No modificó la capacidad de atención ni la actividad exploratoria.

1.2.3 No afectó a la actividad general ni a la ansiedad.

1.2.4 No modificó la actividad espontánea ni afectó a las habilidades sensorimotoras o a la coordinación motora.

2. La reducción de la inhibición mediada por el receptor GABA_Aα5 a través de la administración subcrónica de RO4938581

2.1 En los animales TS:

Conclusiones

- 2.1.1** Mejoró la memoria de referencia, de trabajo, el aprendizaje y memoria espacial y procedimental.
- 2.1.2** Mejoró los procesos de *codificación* y *consolidación* de la información de la memoria de referencia.
- 2.1.3** Produjo una mejoría en el proceso de *consolidación* de la memoria de trabajo.
- 2.1.4** Produjo una mejoría en los procesos de *codificación* y *consolidación* de la información durante el aprendizaje procedimental.
- 2.1.5** Palió los déficits en la memoria espacial mejorando la *codificación*, *consolidación* y *recuperación* de la información.

Bibliografía

- Abel T., Lattal K.M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval: *Current Opinion in Neurobiology Journal*, v.11, p.180-7.
- Acuña, M., Pérez-Nuñez, R., Noriega, J., Cárdenas, A.M., Bacigalupo, J., Delgado, R., Arriagada, C., Segura-Aguilar, J., Caviedes, R., Caviedes, P. (2012). Altered voltage dependent calcium currents in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 fetal mouse, an animal model of Down syndrome: *Neurotoxicity Research*, v.22, p.59-68.
- Aït Yahya-Graison E., Aubert J., Dauphinot L., Rivals I., Prieur M., Golfier G., Rossier J., Personnaz L., Creau N., Bléhaut H., Robin S., Delabar J.M., Potier M.C. (2007). Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes: *American Journal of Human Genetics*, v.81, p.475-91.
- Aldridge K., Reeves R.H., Olson L.E., Richtsmeier J.T. (2007). Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models: *American Journal of Medical Genetics*, v.143, p.1060-70.
- Altafaj X., Dierssen M., Baamonde C., Martí E., Visa J., Guimerà J., Oset M., González J.R., Flórez J., Fillat C., Estivill X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome: *Human Molecular Genetics*, v.10, p.1915-23.
- Anderson J.R. (1990). *Cognitive Psychology and its implications*. New York: W.H. Freeman and Co.
- Arumugam A., Raja K., Venugopalan M., Chandrasekaran B., Kovanur Sampath K., Muthusamy H., Shanmugam N. (2016). Down syndrome-A narrative review with a focus on anatomical features: *Clinical Anatomy*, v.29, p.568-77.
- Ashworth A., Hill C.M., Karmiloff-Smith A., Dimitriou D. (2017). A cross-syndrome study of the differential effects of sleep on declarative memory consolidation in children with neurodevelopmental disorders: *Developmental Science*, v.20 e12383 DOI: 10.1111/desc.12383.

Bibliografia

- Atack J.R. (2011). GABA_A receptor subtype-selective modulators. II. α 5-selective inverse agonists for cognition enhancement: *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.11, p.1203-14.
- Atack J.R., Bayley P.J., Seabrook G.R., Wafford, K.A., McKernan R.M., Dawson G.R. (2006). L-655,708 enhances cognition in rats but is not proconvulsant at a dose selective for alpha5-containing GABA_A receptors: *Neuropharmacology*, v.51, p.1023-29.
- Atack J.R. (2010). Preclinical and clinical pharmacology of the GABA_A receptor α 5 subtype-selective inverse agonist α 5IA. *Pharmacology Therapeutics Journal*, v.125, p. 11-26.
- Atkinson R.C., Shiffrin R.M., (1968). Human memory. A proposed system and its control processes. En Spence K.W. y Spence J.T. (Eds). *The Psychology of learning and Motivation*, Academic Press, New York, 1968, v.2, p. 89-195.
- Aylward E.H., Habbak R., Warren A.C., Pulsifer M.B., Barta P.E., Jerram M., Pearlson G.D. (1997a). Cerebellar volume in adults with Down syndrome: *Archives of Neurology*, v.54, p.209-212.
- Bahn S., Mimmack M., Ryan M., Caldwell M.A., Jauniaux E., Starkey M., Svendsen C.N., Emson, P. (2002). Neuronal target genes of the neuron-restrictive silencer factor in neurospheres derived from fetuses with Down's syndrome: a gene expression study: *The Lancet* v.359, p.310-15.
- Ballard T.M., Knoflach F., Prinssen E., Borroni E., Vivian J.A., Basile J., Gasser R., Moreau J.L., Wettstein J.G., Buettelmann B., Knust H, Thomas A.W., Trube G., Hernandez M.C. (2009). RO4938581, a novel cognitive enhancer acting at GABA_A alpha5 subunit-containing receptors: *Psychopharmacology (Berl)*, v.202, p.207-23.
- Bambrick L.L., Fiskum G. (2008). Mitochondrial dysfunction in mouse trisomy 16 brain: *Brain Research*, v.1188, p.9-16.
- Banks M.I., Pearce R.A. (2000). Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in CA1 pyramidal cells: *Journal of Neuroscience*, v.20, p.937-48.

- Bar-Peled O., Gross-Isseroff R., Ben-Hur H., Hoskins I., Groner Y., Biegon A. (1991). Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT_{1A} receptors: *Neuroscience Letters*, v.127, p.173-76.
- Bartesaghi R, Guidi S, Ciani E. (2011). Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome?: *Reviews in Neuroscience*, 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: *Experimental Neurology*, v.163, p.495-529.
- Bauer P. J. (2004). Getting explicit memory off the ground: steps toward construction of a neuro-developmental account of changes in the first two years of life: *Developmental Review*, v.24, p.347–73.
- Bauer P. J. (2006). Constructing a past in infancy: a neuro-developmental account: *Trends in Cognitive Science*, v.10, p.175–81.
- Baxter L.L., Moran T.H., Richtsmeier J.T., Troncoso J., Reeves R.H. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse: *Human Molecular Genetics*, v.9, p.195-202.
- Baxter M.G., Chiba, A.A. (1999). Cognitive functions of the basal forebrain: *Current Opinion in Neurobiology*, v.9, p.178-183.
- Becker L., Mito T., Takashima S., Onodera K. (1991). Growth and development of the brain in Down syndrome: *Progress in Clinical and Biological Research*, v.373, p.133-52.
- Belacchi C., Passolunghi M.C., Brentan E., Dante A., Persi L., Cornoldi C. (2014). Approximate additions and working memory in individuals with Down syndrome: *Research in Developmental Disabilities*, v.35, p.1027-35.
- Belichenko P.V., Kleschevnikov A.M., Salehi A., Epstein C.J., Mobley W.C. (2007). Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships: *Journal of Comparative Neurology*, v.504, p.329-45.

Bibliografia

- Ben-Ari Y., Khalilov I., Kahle K.T., Cherubini E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders: *The Neuroscientist*, v.18, p.467-86.
- Bianchi P., Ciani E., Guidi S., Trazzi S., Felice D., Grossi G., Fernandez M., Giuliani A., Calzà L., Bartesaghi R. (2010b). Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome: *Journal of Neuroscience*, v.30, p.8769-79.
- Bianchi P., Ciani E., Contestabile A., Guidi S., Bartesaghi R. (2010a). Lithium restores neurogenesis in the subventricular zone of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: *Brain Pathology*, v.20, p.106-18.
- Bittles AH, Bower C, Hussain R, Glasson EJ. (2007). The four ages of Down syndrome: *European Journal of Public Health*, v.17, p.221–25.
- Blazek J.D., Gaddy A., Meyer R., Roper R.J., Li J. (2011). Disruption of bone development and homeostasis by trisomy in Ts65Dn Down syndrome mice: *Bone*, v.48, p.275-80.
- Bourin M., Petit-Demoulière B., Dhonnchadha B.N., Hascöet M. (2007). Animal models of anxiety in mice: *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.21, p.567-74.
- Bourtchouladze R, Abel T., Berman N., Gordon R., Lapidus K., Kandel E.R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA: *Learning Memory*, v.5, p.365–74.
- Braudeau J., Dauphinot L., Duchon A., Loistron A., Dodd R.H., Héroult Y., Delatour B., Potier M.C. (2011a). Chronic Treatment with a Promnesiant GABA_A α 5-Selective Inverse Agonist Increases Immediate Early Genes Expression during Memory Processing in Mice and Rectifies Their Expression Levels in a Down Syndrome Mouse Model: *Advances in Pharmacological Sciences*, doi: 10.1155/2011/153218
- Braudeau J., Delatour B., Duchon A., Pereira P.L., Dauphinot L., de Chaumont F., Olivio-Marin J.C., Dodd R.H., Héroult Y., Potier M.C. (2011b). Specific targeting of the GABA-A receptor α 5 subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice: *Journal of Psychopharmacology*, v.25, p.1030-42.

- Brickley S.G., Mody I. (2012). Extrasynaptic GABA_A receptors: their function in the CNS and implications for disease: *Neuron*, v.73, p.23-34.
- Bussy G., Charrin E., Brun A., Curie A., Des Portes, V. (2011). Implicit procedural learning in fragile X and Down syndrome: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.55, p.521-28.
- Butterfield D.A., Pocernich C.B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications: *CNS Drugs*, v.17, p.641-52.
- Campbell C., Landry O., Russo N., Flores H., Jacques S., Burack J. A. (2013). Cognitive flexibility among individuals with Down syndrome: assessing the influence of verbal and nonverbal abilities: *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, v. 118, p.193-200.
- Capone G., Kim P., Jovanovich S., Payne L., Freund L., Welch K., Miller E., Trush M. (2002). Evidence for increased mitochondrial superoxide production in Down syndrome: *Life Sciences*, v.70, p.2885-95.
- Capone G.T., Grados M.A., Kaufmann W.E., Bernad-Ripoll S., Jewell A. (2005). Down syndrome and comorbid autism-spectrum disorder: characterization using the aberrant behavior checklist: *American Journal of Medical Genetics*, v. 134, p.373-80.
- Caraiscos V.B., Elliott E.M., You-Ten K.E., Cheng V.Y., Belelli D., Newell J.G., Jackson M.F., Lambert J.J., Rosahl T.W., Wafford K.A., MacDonald J.F., Orser B.A. (2004). Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, p.3662-67.
- Carlesimo G.A., Marotta L., Vicari S. (1997). Long-term memory in mental retardation: evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome: *Neuropsychología*, v.35, p.71-79.
- Carter O.L, Burr D.C., Pettigrew J.D., Wallis G.M., Hasler F., Vollenweider F.X. (2005). Using psilocybin to investigate the relationship between attention, working memory, and

Bibliografia

- the serotonin 1A and 2A receptors: *Journal of Cognitive Neuroscience*, v.17, p.1497-1508.
- Chakrabarti L., Best T.K., Cramer N.P., Carney R.S., Isaac J.T., Galdzicki Z., and Haydar T.F. (2010). Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome: *Nature Neuroscience*, v.13, p.927-34.
- Chakrabarti L., Galdzicki Z., Haydar T.F. (2007). Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Journal of Neuroscience*, v.27, p.11483-95.
- Chambers M.S., Atack J.R., Carling R.W., Collinson N., Cook S.M., Dawson G.R., Ferris P., Hobbs S.C., O'connor D., Marshall G., Rycroft W., Macleod A.M. (2004). An orally bioavailable, functionally selective inverse agonist at the benzodiazepine site of GABA_A alpha5 receptors with cognition enhancing properties: *Journal of Medicinal Chemistry*, v.47, p.5829-32.
- Chapman R.S., Hesketh L.J. (2000). Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome: *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v.6, p.84-95.
- Churchwell J.C., Morris A.M., Musso N.D., Kesner R.P. (2010). Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory: *Neurobiology of Learning and Memory*, v.93, p.415-21.
- Clark D., Wilson GN. (2003). Behavioral assessment of children with Down syndrome using the Reiss psychopathology scale: *American Journal of Medical Genetics*, v.118A, p.210–16
- Colas D., Chuluun B., Warriar D., Blank M., Wetmore D.Z., Buckmaster P., Garner C.C., Heller H.C. (2013). Short-term treatment with the GABA_A receptor antagonist pentylentetrazole produces a sustained pro-cognitive benefit in a mouse model of Down's syndrome: *British Journal of Pharmacology*, v.169, p.963-73.
- Cole S.O. (1986). Effects of benzodiazepines on acquisition and performance: a critical assessment: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.10, p.265-72.

- Collinson N., Atack J.R., Laughton P., Dawson G.R., Stephens D.N. (2006). An inverse agonist selective for alpha5 subunit-containing GABA_A receptors improves encoding and recall but not consolidation in the Morris water maze: *Psychopharmacology*, v.188, p.619-28.
- Collinson N., Kuenzi F.M., Jarolimek W., Maubach K.A., Cothliff R., Sur C., Smith A., Otu F.M., Howell O., Atack J.R., McKernan R.M., Seabrook G.R., Dawson G.R., Whiting P.J., Rosahl T.W. (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABA_A receptor: *Journal of Neuroscience*, v.22, p.5572-80.
- Contestabile A., Benfenati F., Gasparini L. (2010). Communication breaks-Down: from neurodevelopment defects to cognitive disabilities in Down syndrome: *Progress in Neurobiology*, v.91, p.1-22.
- Contestabile A., Fila T., Bartesaghi R., Ciani E. (2009a). Cell cycle elongation impairs proliferation of cerebellar granule cell precursors in the Ts65Dn mouse, an animal model for Down síndrome: *Brain Pathology*, v.19, p.224-37.
- Contestabile A., Fila T., Ceccarelli C., Bonasoni P., Bonapace L., Santini D., Bartesaghi R., Ciani E. (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.
- Cooper J.D., Salehi A., Delcroix J.D., Howe C.L., Belichenko P.V., Chua-Couzens J., Kilbridge J.F., Carlson E.J., Epstein C.J., Mobley W.C. (2001). Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusión: *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, v.98, p.10439-44.
- Cornish K., Wilding J. (2010). *Attention, Genes, and Developmental Disorders* (Oxford: Oxford University Press).
- Corrales A., Martínez P., García S., Vidal V., García E., Flórez J., Sanchez-Barceló E.J., Martínez-Cué C., Rueda N. (2013). Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic

Bibliografia

- degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: *Journal of Pineal Research*, v.54, p.346-58.
- Costa A.C., Stasko M.R., Schmidt C., Davisson M.T. (2010). Behavioral validation of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome of a genetic background free of the retinal degeneration mutation *Pde6b(rd1)*: *Behavioural Brain Research*, v.206, p.52-62.
- Costa A.C., Walsh K., Davisson M.T. (1999). Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome: *Physiology and Behavior*, v.68, p.211-20.
- Costanzo F., Varuzza C., Menghini D., Addona F., Gianesini T., Vicari S. (2013). Executive functions in intellectual disabilities: a comparison between Williams syndrome and Down syndrome: *Research in Developmental Disabilities*, v.34, p.1770-80.
- Coussons-Read M. E., Crnic L.S. (1996). Behavioral assessment of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome: altered behavior in the elevated plus maze and open field: *Behavior Genetic*, v. 26, p.7-13.
- Coyle J.T., Oster-Granite M.L., and Gearhart J.D. (1986). The neurobiologic consequences of Down syndrome: *Brain Research Bulletin*, v.16, p.773-87.
- Crawley J.N. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors: *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, v.10, p.248-58.
- Crestani F., Keist R., Fritschy J.M., Benke D., Vogt K., PrutL., Blüthmann H., Möhler H., Rudolph U. (2002). Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.99, p.8980-85.
- Crnic L.S., Pennington B.F. (2000). Down syndrome: neurophychology and animals models: *In Progress in Infancy Research*, p.69-111.
- Dauphinot L., Lyle R., Rivals I., Dang M.T., Moldrich R.X., Golfier G., Ettwiller L., Toyama K., Rossier J., Personnaz L., Antonarakis S.E, Epstein C.J, Sinet P.M, Potier M.C (2005). The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a

- segmental trisomy model for Down syndrome. *Human Molecular Genetics*, v.14, p.373-84.
- Davisson M.T., Schmidt C., and Akeson E.C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Progress in Clinical and Biological Research*, v.360, p.263-80.
- Davisson M.T., Schmidt C., Reeves R.H., Irving N.G., Akeson E.C., Harris B.S., Bronson R.T. (1993). Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome: *Progress in Clinical and Biological Research*, v.384, p.117-33.
- Dawson G.R., Maubach K.A., Collinson N., Cobain M., Everitt B.J., MacLeod A.M., Choudhury H.I., McDonald L.M., Pillai G., Rycroft W., Smith A.J., Sternfeld F., Tattersall F.D., Wafford K.A., Reynolds D.S., Seabrook G.R., Atack J.R. (2006). An inverse agonist selective for $\alpha 5$ subunit-containing GABA_A receptors enhances cognition: *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.316, p.1335-45.
- De la Torre R., De Sola S., Pons M., Duchon A., de Lagran M.M., Farré M., Fitó M., Benejam B., Langohr K., Rodriguez J., Pujadas M., Bizot J.C., Cuenca A., Janel N., Catuara S., Covas M.I., Blehaut H., Herault Y., Delabar J.M., Dierssen M. (2014). Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans: *Molecular Nutrition and Food Research*, v.58, p.278-88.
- Deidda G., Bozarth I.F., Cancedda L. (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives: *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v.8, a.119.
- Delabar J.M., Aflalo-Rattenbac R., Créau N. (2006). Developmental defects in trisomy 21 and mouse models: *The Scientific World Journal*, v.6, p.1945-64.
- Delabar J.M., Theophile D., Rahmani Z., Chettouh Z., Blouin J.L., Prieur M., Noel B., Sinet P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21: *European Journal of Human Genetics*, v.1, p.114-24.

Bibliografía

- Dickson P. E., Rogers T.D., Del Mar N., Martin L.A., Heck D., Blaha C.D., Goldowitz D., Mittleman G. (2010). Behavioral flexibility in a mouse model of developmental cerebellar Purkinje cell loss: *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 94, p.220-28.
- Dierssen M. (2012). Down syndrome: the brain in trisomic mode: *Nature Reviews Neuroscience*, v.13, p.844-58.
- Dierssen M., Benavides-Piccione R., Martínez-Cué C., Estivill X., Flórez J., Elston G.N., DeFelipe J. (2003). Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment: *Cerebral Cortex*, v.13, p.758-64.
- Dierssen M., Hérault Y., and Estivill X. (2009). Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome: *Physiological Reviews*, v.89, p.887-20.
- Dorow R., Horowski R., Paschelke G., Amin M. (1983). Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors: *The Lancet*, V.2, v.98-99.
- Driscoll L. L., Carroll J. C., Moon J., Crnic L. S., Levitsky D. A., Strupp B. J. (2004). Impaired sustained attention and error-induced stereotypy in the aged Ts65Dn mouse: a mouse model of Down syndrome and Alzheimer's disease: *Behavioral Neuroscience*, v. 118, p. 1196-205.
- Duchon A., Pothion S., Brault V., Sharp A.J., Tybulewicz V.L., Fisher E.M., Hérault Y. (2010). The telomeric part of the human chromosome 21 from Cstb to Prmt2 is not necessary for the locomotor and short-term memory deficits observed in the Tc1 mouse model of Down syndrome: *Behavioural Brain Research*, v.217, p. 271-81.
- Duchon A., Raveau M., Chevalier C., Nalesso V., Sharp A.J., Hérault Y. (2011). Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome: *Mammalian Genome*, v.22, p.674-84.
- Duman R.S., Nakagawa S., Malberg J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment: *Neuropsychopharmacology*, v.25, p.836-44.

- Earnheart J.C., Schweizer C., Crestani F., Iwasato T., Itohara S., Möhler H., and Lüscher B. (2007). GABAergic control of adult hippocampal neurogenesis in relation to behavior indicative of trait anxiety and depression states: *The Journal of Neuroscience*, v.27, p.3845-54.
- Edgin J. O., Mason G. M., Allman M. J., Capone G. T., Deleon I., Maslen C., Reeves R. H., Sherman S. L., Nadel L. (2010). Development and validation of the Arizona Cognitive Test Battery for Down syndrome. *Journal Neurodevelopmental Disorder*, v.2, p.149-64.
- Eichenbaum H. (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory: *Behavioural Brain Research*, v.103, p.123-33.
- Eichenbaum H. (2001). The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes: *Behavioural Brain Research*, v.127, p.199-207.
- Ekstein S., Glick B., Weill M., Kay B., Berger I. (2011). Down syndrome and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): *Journal of Child Neurology*, v.26, p.1290-95.
- Enge S., Fleischhauer M., Lesch K.P., Reif A., Strobel A. (2012). Variation in key genes of serotonin and norepinephrine function predicts gamma-band activity during goal-directed attention: *Cerebral Cortex*, v.24, p.1195-1205.
- Engidawork E., Lubec G. (2003). Molecular changes in fetal Down syndrome brain: *Journal of Neurochemistry*, v.84, p.895-904.
- Engin E., Smith K., Gao Y., Nagy D., Foster R.A., Tsvetkov E., Keist R., Crestani F., Fritschy J.M., Bolshakov V.Y., Hajos M., Heldt S.A., Rudolph U. (2016). Modulation of anxiety and fear via distinct intrahippocampal circuits: *Elife*, v. 5, e14120.
- Englund A., Jonsson B., Zander C.S., Gustafsson J., Anneren G. (2013). Changes in mortality and causes of death in the Swedish Down syndrome population: *American Journal of Medical Genetics*, v.161, p.642-49.
- Enna S.J., Möhler, H. (2007). *The GABA receptors*, 3rd edn (Totowa, NJ: Human Press).
- Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A., Vallina I.F., Baamonde C., Lumbreras M.A., Dierssen M., Tobena A., Flórez J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model: *Neuroscience Letters*, v.199, p.143-46.

Bibliografía

- Escorihuela R. M., Vallina I. F., Martínez-Cué C., Baamonde C., Dierssen M., Tobeña A., Flórez J., Fernández-Teruel A. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: *Neuroscience Letters*, v. 247, p.171-74.
- Espósito G., Imitola J., Lu J., De Filippis D., Scuderi C., Ganesh V.S., Folkerth R., Hecht J., Shin S., Iuvone T., Chesnut J., Steardo L., Sheen V. (2008). Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury: *Human Molecular Genetics*, v.17, p.440-57.
- Fernández F., Morishita W., Zuniga E., Nguyen J., Blank M., Malenka R.C., Garner C.C. (2007). Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome: *Nature Neuroscience*, v.10, p.411-13.
- Ferrer I., Gullotta F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus: *Acta Neuropathology*, v. 79, p.680-85.
- Flórez J. (1999). Bases neurológicas del aprendizaje: *Revista Siglo Cero*, v.30, p.9-27.
- Flórez J. (1999). Patología cerebral y sus repercusiones cognitivas en el síndrome de Down. *Revista Siglo Cero*: v.30, p.29-45.
- Florian C., Roullet P. (2004). Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice: *Behavioural Brain Research*, v.154, p.365-74.
- Fritschy J.M., Möhler H. (1995). GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits: *Journal of Comparative Neurology*, v.359, p.154-94.
- Gandhi C. C., Kelly R. M., Wiley R. G., Walsh T. J., (2000). Impaired acquisition of a Morris water maze task following selective destruction of cerebellar purkinje cells with OX7-saporin: *Behavioural Brain Research*, v. 109, p.37-47.
- García-Cerro S., Martínez P., Vidal V., Corrales A., Flórez J., Vidal R., Rueda N., Arbonés ML., Martínez-Cué C. (2014). Overexpression of Dyrk1A is implicated in several cognitive, electrophysiological and neuromorphological alterations found in a mouse model of Down syndrome: *PloS one*, v.9, e106572.

- Gardiner K. (2004). Gene-dosage effects in Down syndrome and trisomic mouse models: *Genome Biology*, v.5, p.244.
- Garner C.C., Wetmore D.Z. (2012). Synaptic pathology of Down syndrome: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 970, p.451-68.
- Ge S., Goh, E.L., Sailor K.A., Kitabatake Y., Ming G.L., Song H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain: *Nature*, v.439, p.589-93.
- Ghoneim M.M., Mewaldt S.P. (1990). Benzodiazepines and human memory: a review: *Anesthesiology*, v.72, p.926-38.
- Glasson E.J., Dye D.E., Bittles A.H. (2014). The triple challenges associated with age-related comorbidities in Down syndrome: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.58, p.393-98.
- Glykys J., Mann E.O., Mody I. (2008). Which GABA_A receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus?: *Journal of Neuroscience*, v.28, p.1421-26.
- Glykys J., Mody I. (2006). Hippocampal network hyperactivity after selective reduction of tonic inhibition in GABA A receptor alpha5 subunit-deficient mice: *Journal of Neurophysiology*, v.95, p.2796-2807.
- Godridge H., Reynolds G.P., Czudek C., Calcutt N.A., Benton M. (1987). Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue: *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v.50, p.775-78.
- Golden J.A., Hyman B.T. (1994). Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21: *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*, v.53, p.513-20.
- Goosens K.A., Holt W., Maren S. (2000). A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats: *Behavioural Brain Research*, v.114, p.145-52.

Bibliografia

- Granholm A.C., Sanders L.A., Crnic L.S. (2000). Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome: *Experimental Neurology*, v.161, p.647-63.
- Grieco J., Pulsifer M., Seligsohn K., Skotko B., Schwartz A. (2015). Down syndrome: Cognitive and behavioral functioning across the lifespan: *American Journal of Medical Genetics*, v.169, p.135-49.
- Gropp A., Kolbus U., Giers D. (1975). Systematic approach to the study of trisomy in the mouse. II: *Cytogenetics and Cell Genetics*, v.14, p.42-62.
- Guidi S., Bonasoni P., Ceccarelli C., Santini D., Gualtieri F., Ciani E., Bartesaghi R. (2008). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome: *Brain Pathology*, v.18, p.180-97.
- Guidi S., Ciani E., Bonasoni P., Santini D., Bartesaghi R. (2011). Widespread proliferation impairment and hypocellularity in the cerebellum of fetuses with down syndrome: *Brain Pathology*, v.21, p.361-73.
- Guilhard-Costa A.M., Khung S., Delbecque K., Ménez F., Delezoide A.L. (2006). Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21: *Pediatric Research*, v.59, p.33-38.
- Haas M.A., Bell D., Slender A., Lana-Elola E., Watson-Scales S., Fisher E.M., Tybulewicz V.L., Guillemot F. (2013). Alterations to dendritic spine morphology, but not dendrite patterning, of cortical projection neurons in Tc1 and Ts1Rhr mouse models of Down syndrome: *PLoS One*, v.8, e.78561.
- Hanslmayr S., Matuschek J., Fellner M.C. (2014). Entrainment of prefrontal beta oscillations induces an endogenous echo and impairs memory formation: *Current Biology*, v.24, p.904-09.
- Harkany T., Abrahám I., Timmerman W., Laskay G., Tóth B., Sasvári M., Kónya C., Sebens J.B., Korf J., Nyakas C., Zarándi M., Soós K., Penke B., Luiten P.G. (2000). Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis: *The European Journal of Neuroscience*, v.12, p.2735-45.

- Hattori M., Fujiyama A., Taylor T.D., Watanabe H., Yada T., Park H.S., Toyoda A., Ishii K., Totoki Y., Choi D.K., Groner Y., Soeda E., Ohki M., Takagi T., Sakaki Y., Taudien S., Blechschmidt K., Polley A., Menzel U., Delabar J., Kumpf K., Lehmann R., Patterson D., Reichwald K., Rump A., Schillhabel M., Schudy A., Zimmermann W., Rosenthal A., Kudoh J., Schibuya K., Kawasaki K., Asakawa S., Shintani A., Sasaki T., Nagamine K., Mitsuyama S., Antonarakis S.E., Minoshima S., Shimizu N., Nordsiek G., Hornischer K., Brant P., Scharfe M., Schon O., Desario A., Reichelt J., Kauer G., Blocker H., Ramser J., Beck A., Klages S., Hennig S., Riesselmann L., Dagand E., Haaf T., Wehrmeyer S., Borzym K., Gardiner K., Nizetic D., Francis F., Lehrach H., Reinhardt R., Yaspo M.L.(2000). Chromosome 21 mapping and sequencing consortium, The DNA sequence of human chromosome 21: Nature, v.405, p.311-19.
- Holt W., Maren S. (1999). Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory: The Journal of Neuroscience, v.19, p.9054-62.
- Holtzman D.M., Santucci D., Kilbridge J., Chua-Couzens J., Fontana D.J., Daniels S.E., Johnson R.M., Chen K., Sun Y., Carlson E. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome: Proceedings of the National Academy of Sciences U S A v.93, p.13333-38.
- Howells G. (1989). Down's syndrome and the general practitioner: Journal of the Royal College of General Practitioners, v.39, p.470-75.
- Howes C. (1990). Can the age on entry into child care and the quality of child care predict adjustment in kindergarten?: Developmental Psychology, v.26, p.292-303.
- Hunter C.L., Bachman D., Granholm A.C. (2004). Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's síndrome: Annals of Neurology, v.56, p.675-88.
- Hunter C.L., Bimonte H.A., Granholm, A.C. (2003). Behavioral comparison of 4 and 6 month-old Ts65Dn mice: age-related impairments in working and reference memory: Behavioural Brain Research, v.138, p.121-31.

Bibliografía

- Insausti A.M., Megías M., Crespo D., Cruz-Orive L.M., Dierssen M., Vallina I.F., Insausti R., Flórez J., Vallina T.F. (1998). Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of Down syndrome: *Neuroscience Letters*, v.253, p.175-78.
- Isacson O., Seo H., Ling L., Albeck D., Granholm A.C. (2002). Alzheimer's disease and Down's syndrome: roles of APP, trophic factors and ACh: *Trends in Neuroscience*, v.25, p.79-84.
- J. Flórez, B. Garvía, R. Fernández-Olaria. Síndrome de Down: Neurobiología, Neuropsicología, Salud mental. Bases para la intervención en el aprendizaje, la conducta y el bienestar mental. Editorial CEPE, Madrid, España, 2015.
- Jacob T.C., Moss S.J., Jurd R. (2008). GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition: *Nature Reviews Neuroscience*, v.9, p.331-343.
- Jarrold C., Cocksey J., Dockerill E. (2008). Phonological similarity and lexicality effects in children's verbal short-term memory: concerns about the interpretation of probed recall data: *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, (Hove) v.61, p.324-40.
- Jensen S., Kirkegaard L., Anderson B.N. (1987). Randomized clinical investigation of Ro 15-1788, a benzodiazepine antagonist, in reversing the central effects of flunitrazepam: *European Journal of Anaesthesiology*, v.4, p.113-18.
- Jernigan T.L., Bellugi U., Sowell E., Doherty S., Hesselink J.R. (1993). Cerebral morphologic distinctions between Williams and Down syndromes: *Archives Neurology*, v.50, p.186-91.
- Jovanovic S.V., Clements D., MacLeod K. (1998). Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome: *Free Radical Biology and Medicine*, v.25, p.1044-1048.
- Kahlem P., Sultan M., Herwig R., Steinfath M., Balzereit D., Eppens B., Saran N.G., Pletcher M.T., South S.T., Stetten G., Lehrach H., Reeves R.H., Yaspo M.L. (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome: *Genome Research*, v.14, p.1258-67.

- Kasai H., Matsuzaki M., Noguchi J., Yasumatsu N., and Nakahara H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines: *Trends in Neuroscience*, v.26, p.360-68.
- Kava M.P., Tullu M.S., Muranjan M.N., Girisha K.M.(2004). Down syndrome: clinical profile from India: *Archives of Medical Research*, v.35, p.31-35.
- Kempermann G., Gast D., Gage F.H. (2002). Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment: *Annals of Neurology*, v.52, p.135-43.
- Kempermann G., Kuhn H.G. Gage F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment: *Nature*, v.386, p.493-95.
- Kim H.S., Suh Y.H. (2009). Minocycline and neurodegenerative diseases: *Behavioural Brain Research*, v.196, p.168-79.
- Kish S., Karlinsky H., Becker L., Gilbert J., Rebbetoy M., Chang L.J., DiStefano L., Hornykiewicz O. (1989). Down's syndrome individuals begin life with normal levels of brain cholinergic markers: *Journal of Neurochemistry*, v.52, p.1182-87.
- Klausberger T. (2009). GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus: *European Journal of Neuroscience*, v.30, p.947-957.
- Kleschevnikov A.M., Belichenko P.V., Gall J., George L., Nosheny R., Maloney M.T., Salehi A., Mobley W.C. (2012). Increased efficiency of the GABA_A and GABA_B receptor-mediated neurotransmission in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Neurobiology of Disease*, v.45, p.683-691.
- Kleschevnikov A.M., Belichenko P.V., Villar A.J., Epstein C.J., Malenka R.C., Mobley W.C. (2004). Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome: *Journal of Neuroscience*, v.24, p.8153-60.
- Knudsen E.I. (2007). Fundamental components of attention: *Annual Review of Neuroscience*, v.30, p.57-78.

- Knust H., Achermann G., Ballard T., Buettelmann B., Gasser R., Fischer H., Hernandez M.C., Knoflach F., Koblet A., Stadler H., Thomas A.W., Trube G., Waldmeier P. (2009). The discovery and unique pharmacological profile of RO4938581 and RO4882224 as potent and selective GABA_A alpha5 inverse agonists for the treatment of cognitive dysfunction: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.19, p.5940-44.
- Koo B.K., Blaser S., Harwood-Nash D., Becker L.E., and Murphy E.G. (1992). Magnetic resonance imaging evaluation of delayed myelination in Down syndrome: a case report and review of the literature: *Journal of Child Neurology*, v.7, p.417-21.
- Korbel J.O., Tirosh-Wagner T., Urban A.E., Chen X.N., Kasowski M., Dai L., Grubert F., Erdman C., Gao M.C., Lange K., Sobel E.M., Barlow G.M., Aylsworth A.S., Carpenter N.J., Clark R.D., Cohen M.Y., Doran E., Falik-Zaccai T., Lewin S.O., Lott I.T., McGillivray B.C., Moeschler J.B., Pettenati M.J., Puschel S.M., Rao K.W., Shaffer L.G., Shohat M., Van Riper A.J., Warburton D., Weissman S., Gerstein M.B., Snyder M., Korenberg J.R. (2009). The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.106, p.12031-36.
- Korenberg J. R., Chen X. N., Schipper R., Sun Z., Gonsky R., Gerwehr S., Carpenter N., Daumer C., Dignan P., Distechi C., Graham J.R., Hudgins L., McGillivray B., Miyazaki K., Ogasawara N., Park J.P., Pagon R., Puschel S., Sack G., Say B., Schuffenhauer S., Soukup S., Yamanaka T. (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 91, p.4997-5001.
- Krinsky-McHale S.J., Devenny D.A., Kittler P., Silverman W. (2008) Selective attention deficits associated with mild cognitive impairment and early stage Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: *American Journal of Mental Retardation*, v.113, p.369-86.
- Lal C., White D.R., Joseph J.E., van Bakergem K., LaRosa A. (2015). Sleep-disordered breathing in Down syndrome: *Chest Journal*, v.147, p.570-79.

- Lana-Elola E., Watson-Scales S.D., Fisher E.M., and Tybulewicz V.L. (2011). Down syndrome: searching for the genetic culprits: *Disease Models & Mechanisms*, v.4, p.586-95.
- Lanfranchi S., Baddeley A., Gathercole S., Vianello, R. (2012). Working memory in Down syndrome: is there a dual task deficit?: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.56, p.157-66.
- Lanfranchi S., Jerman O., Dal Pont E., Alberti A., Vianello, R. (2010). Executive function in adolescents with Down Syndrome: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.54, p.308-19.
- Lattal K.M, Abel T. (2001). Different Requirements for Protein Synthesis in Acquisition and Extinction of Spatial Preferences and Context-Evoked Fear: *The Journal of Neuroscience*, v.21, p.5773-80.
- Laurie D.J., Wisden W., Seeburg P.H. (1992). The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development: *The Journal of Neuroscience*, v.12, p.4151-72.
- Laws G., Bishop D.V. (2003). A comparison of language abilities in adolescents with Down syndrome and children with specific language impairment: *Journal of Speech Language and Hearing Research*, v.46, p.1324-39.
- Lemons C.J., Fuchs D. (2010). Phonological awareness of children with Down syndrome: its role in learning to read and the effectiveness of related interventions: *Research in Developmental Disabilities*, v.31, p.316-30.
- Letourneau A., Antonarakis S.E. (2012). Genomic determinants in the phenotypic variability of Down syndrome: *Progress in Brain Research*, v.197, p.15-28.
- Lingford-Hughes A., Hume S.P., Feeney A., Hirani E., Osman S., Cunningham V.J., Pike V.W., Brooks D.J., Nutt D.J. (2002). Imaging the GABA-benzodiazepine receptor subtype containing the alpha5-subunit in vivo with [¹¹C]Ro15 4513 positron emission tomography: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, v.22, p.878-89.

Bibliografia

- Lister R.G. (1985). The amnesic action of benzodiazepines in man: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.9, p.87-94.
- Liu D.P., Schmidt C., Billings T., and Davisson M.T. (2003). Quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Biotechniques*, v.35, p.1170-74.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method: *Methods*, v.25, p.402-08.
- Lorenzi H.A., Reeves R.H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development: *Brain Research*, v.1104, p.153-59.
- Lott I.T. (2012). Neurological phenotypes for Down syndrome across the life span: *Progress in Brain Research*, v.197, p.101-21.
- Lott I.T., Dierssen M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome: *The Lancet. Neurology*, v.6, p.623-33.
- Lu Q.R., Sun T., Zhu Z., Ma N., Garcia M., Stiles C.D., Rowitch D.H. (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection: *Cell*, v.109, p.75-86.
- Lubec B., Yoo B.C., Dierssen M., Balic N., Lubec G. (2001). Down syndrome patients start early prenatal life with normal cholinergic, monoaminergic and serotonergic innervation: *Journal of Neural Transmission Supplementa*, v.61, p.303-10.
- Lyle R., Béna F., Gagos S., Gehrig C., Lopez G., Schinzel A., Lespinasse J., Bottani A., Dahoun S., Taine L., Doco-Fenzy M., Cornillet-Lefèbvre P., Pelet A., Lyonnet S., Toutain A., Colleaux L., Horst J., Kennerknecht I., Wakamatsu N., Descartes M., Franklin J.C., Florentin-Arar L., Kitsiou S., Aït Yahya-Graison E., Costantine M., Sinet P.M., Delabar J.M., Antonarakis S.E. (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21: *European Journal of Human Genetics*, v.4, p.454-66.
- Lyle R., Gehrig C., Neergaard-Henrichsen C., Deutsch S., Antonarakis S.E. (2004). Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of down syndrome: *Genome Research*, v.14, p.1268-74.

- Maei H. R., Zaslavsky K., Teixeira C. M., and Frankland P. W. (2009). What is the most sensitive measure of water maze probe test performance?: *Frontiers in Integrative Neuroscience*, v.3, p.4.
- Malberg J.E., Eisch A.J., Nestler E.J., and Duman R.S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus: *Journal of Neuroscience*, v.20, p.9104-10.
- Maltese A., Pepi A., Scifo L., Roccella M. (2014). Referential communication skills in children with Down Syndrome: *Minerva Pediatrica*, v.66, p.7-16.
- Mann D.M., Yates P.O., Marcyniuk B., Ravindra C.R. (1985). Pathological evidence for neurotransmitter deficits in Down's syndrome of middle age: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.29, p.125-35.
- Mao R., Wang X., Spitznagel E.L., Frelin L.P., Ting J.C., Ding H., Kim J.W., Ruczinski I., Downey T.J., Pevsner J. (2005). Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart: *Genome Biology*, v.6, R107.
- Martínez-Cué C., Baamonde C., Lumbreras M., Paz J., Davisson M. T., Schmidt C., Dierssen M., Flórez J. (2002). Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: *Behavioural Brain Research*, v.134, p.185-200.
- Martínez-Cué C., Delatour B., Potier M.C. (2014). Treating enhanced GABAergic inhibition in Down syndrome: use of GABA α 5-selective inverse agonists: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.2, p.218-27.
- Martínez-Cué C., Martínez P., Rueda N., Vidal R., García S., Vidal V., Corrales A., Montero J.A., Pazos Á., Flórez J., Gasser R., Thomas A.W., Honer M., Knoflach F., Trejo J.L., Wettstein J.G., Hernández M.C. (2013). Reducing GABA_A α 5 receptor-mediated inhibition rescues functional and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome: *Journal of Neuroscience*, v.33, p.3953-66.
- Martínez-Cué C., Rueda N., García E., Davisson M.T., Schmidt C., Flórez J. (2005). Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental

Bibliografía

- conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome: *Behavioural Brain Research*, v.163, p.174-85.
- Martínez-Cué C., Rueda N., García E., Flórez J. (2006). Anxiety and panic responses to a predator in male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: *Genes Brain and Behavior*, v.5, p.413-22.
- Megías M., Verduga R., Dierssen M., Flórez J., Insausti R., Crespo D. (1997). Cholinergic, serotonergic and catecholaminergic neurons are not affected in Ts65Dn mice: *Neuroreport*, v.8, p.3475-78.
- Miles R., Blaesse P., Huberfeld G., Wittner L., Kaila K. (2012). Chloride homeostasis and GABA signaling in temporal lobe epilepsy. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, J.L. Noebels, M. Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, A.V. Delgado-Escueta, eds. (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)
- Milojevich H., Lukowski A. (2016). Recall memory in children with Down syndrome and typically developing peers matched on developmental age: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.60, p.89-100.
- Miyashita T., Kubik S., Lewandowski G., Guzowski J.F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation: *Neurobiology of Learning and Memory*, v.89, p.269-84.
- Möhler H., Fritschy J.M., Lüscher B., Rudolph U., Benson J., Benke D. (1996). The GABA_A receptors. From subunits to diverse functions: *Ion Channels*, v.4, p.89-113.
- Möhler H. (2007). Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABA_A receptors: *Journal of Neurochemistry*, v.102, p.1-12.
- Moldrich R.X., Dauphinot L., Laffaire J., Rossier J., Potier M.C. (2007). Down syndrome gene dosage imbalance on cerebellum development: *Progress in Neurobiology*, v.82, p.87-94.
- Molloy C.A., Murray D.S., Kinsman A., Castillo H., Mitchell T., Hickey F.J., Patterson B. (2009). Differences in the clinical presentation of Trisomy 21 with and without autism: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.53, p.143-51.

- Moon J., Chen M., Gandhi S.U., Strawderman M., Levitsky D.A., Maclean K.N., Strupp B.J. (2010) Perinatal choline supplementation improves cognitive functioning and emotion regulation in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: *Behavioral Neuroscience*, v.124, p.346-61.
- Moore C.S. (2006). Postnatal lethality and cardiac anomalies in the Ts65Dn Down syndrome mouse model: *Mammalian Genome*, v.17, p.1005-12.
- Morris R. G., Garrud P., Rawlins J.N., O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions: *Nature*, v.297, p.681-83.
- Morris R.G., Schenk F., Tweedie F., Jarrard L.E. (1990). Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning: *European Journal of Neuroscience*, v.2, p.1016-28.
- Murchison C.F., Zhang X.Y., Zhang W.P., Ouyang M., Lee A., Thomas S.A. (2004). A distinct role for norepinephrine in memory retrieval: *Cell*, v.117, p.131-43.
- Nadel L. (2003). Down`s syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective: *Genes Brain Behavior*, v.2, p.156-66.
- Nash H., Heath J. (2011). The role of vocabulary, working memory and inference making ability in reading comprehension in Down syndrome: *Research in Developmental Disabilities*, v.32, p.1782-91.
- Navarro J.F., Burón E., Martín-López M. (2002). Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective ligand for the benzodiazepine site of GABA_A receptors which contain the alpha-5 subunit, in the elevated plus-maze test: *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v.26, p.1389-92.
- Newpher T.M., Ehlers M.D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity: *Trends in Cell Biology*, v.19, p.218-27.
- O'Doherty A., Ruf S., Mulligan C., Hildreth V., Errington M.L., Cooke S., Sesay A., Modino S., Vanes L., Hernandez D., Linehan J.M, Sharpe P.T., Brandner S., Bliss T.V., Henderson D.J., Nizetic D., Tybulewicz V.L., Fisher E.M. (2005). Genetics: an aneuploid mouse

Bibliografía

- strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes: *Science*, v.309, p.2033-37.
- Ofen N., Kao Y.C., Sokol-Hessner P., Kim H., Whitfield-Gabrieli S., Gabrieli J.D. (2007). Development of the declarative memory system in the human brain: *Nature Neuroscience*, v.10, p.1198-205.
- Olsen R.W., Sieghart W. (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology: *Neuropharmacology*, v.56, p.141-48.
- Olson L.E., Richtsmeier J.T., Leszl J., Reeves R.H. (2004) A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes: *Science*, v.306, p.687-90.
- Olson L.E., Roper R.J., Sengstaken C.L., Peterson E.A., Aquino V., Galdzicki Z., Siarey R., Pletnikov M., Moran T.H., Reeves R.H. (2007). Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice: *Human Molecular Genetics*, v.16, p.774-82.
- Olton D.S., Papas B.C. (1979). Spatial memory and hippocampal function: *Neuropsychologia*, v.17, p.669-82.
- Oster J., Mikkelsen M., Nielsen A. (1975). Mortality and life-table in Down's syndrome: *Acta Paediatrica*, v.64, p.322-26.
- Parisotto E., Vidal V., García-Cerro S., Lantigua S., Wilhelm D., Sánchez-Barceló E.J., Martínez-Cué C., Rueda N. (2016). Chronic melatonin administration reduced oxidative damage and cellular senescence in the hippocampus of a mouse model of Down syndrome: *Neurochemistry Research*, v.41, p.2904-13.
- Patterson D. (2009). Molecular genetic analysis of Down syndrome: *Human Genetics*, v.129, p. 195-214.
- Paz-Miguel J.E., Flores R., Sánchez-Velasco P., Ocejo-Vinyals G., Escribano de Diego J., López de Rego J., Leyva-Cobián F. (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: *The Journal of Immunology*, v.163, p.5399-410.

- Pennington B.F., Moon J., Edgin J., Stedron J., Nadel L. (2003). The neuropsychology of Down syndrome: evidence for hippocampal dysfunction: *Child development*, v.74, p.75-93.
- Pereira P.L., Magnol L., Sahún I., Brault V., Duchon A., Prandini P., Gruart A., Bizot J.C., Chadeaux-Vekemans B., Deutsch S., Trovero F., Delgado-García J.M., Antonarakis S.E., Dierssen M., Herault Y. (2009). A new mouse model for the trisomy of the *Abcg1-U2af1* region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of down syndrome: *Human Molecular Genetics*, v.18, p.4756-69.
- Pérez-Cremades D., Hernández S., Blasco-Ibáñez J.M., Crespo C., Nacher, J., Varea, E. (2010). Alteration of inhibitory circuits in the somatosensory cortex of Ts65Dn mice, a model for Down's syndrome: *Journal of Neural Transmission*, v.117, p.445-55.
- Petrosini L., Molinari M., Dell'Anna M.E. (1996). Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze: *European Journal of Neuroscience*, v.8, p.1882-96.
- Pinal C.S., Tobin A.J. (1998). Uniqueness and redundancy in GABA production: *Perspectives on Developmental Neurobiology*, v.5, p.109-18.
- Pinter J. D., Brown W. E., Eliez S., Schmitt J. E., Capone G. T., Reiss A. L. (2001a). Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study: *Neurology*, v.56, p972-74.
- Pinter J.D., Eliez S., Schmitt J.E., Capone G.T., Reiss A.L. (2001b). Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study: *The American Journal of Psychiatry*, v.158, p.1659-65.
- Porter M. A., Coltheart M., Langdon R. (2007). The neuropsychological basis of hypersociability in Williams and Down syndrome: *Neuropsychologia*, v. 45, p. 2839-49.

- Potier M.C., Braudeau J., Dauphinot L., Delatour B. (2014). Reducing Gabaergic Inhibition Restores Cognitive Functions in a Mouse Model of Down Syndrome: *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v.13, p.8-15.
- Prandini P., Deutsch S., Lyle R., Gagnebin M., Delucinge Vivier C., Delorenzi M., Gehrig C., Descombes P., Sherman S., Dagna Bricarelli F., Baldo C., Novelli A., Dallapiccola B., Antonarakis S.E. (2007). Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance: *The American Journal of Human Genetics*, v.81, p.252-63.
- Prenosil G.A., Schneider Gasser E.M., Rudolph U., Keist R., Fritschy J.M., Vogt K.E. (2006). Specific subtypes of GABAA receptors mediate phasic and tonic forms of inhibition in hippocampal pyramidal neurons: *Journal of Neurophysiology*, v.96, p.846-57.
- Pritchard A.E., Kalback S., McCurdy M., Capone G.T. (2015). Executive functions among youth with Down Syndrome and co-existing neurobehavioural disorders: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.59, p.1130-41.
- Pritchard M. A., Kola I. (1999). The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome: *Journal of Neural Transmission*, v.57, p.293-303.
- Purser H.R., Jarrold C. (2013). Poor phonemic discrimination does not underlie poor verbal short-term memory in Down syndrome: *Journal of Experimental Child Psychology*, v.115, p.1–15.
- Rahmani Z., Blouin J.L., Creau-Goldberg N., Watkins P. C., Mattei J. F., Poissonnier M., Prieur M., Chettouh Z., Nicole A., Aurias A., Sinet P.M., Delabar J.M. (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 86, p. 5958-62.
- Reeves R.H. (2000). Recounting a genetic story: *Nature*, v.405, p.283-84.
- Reeves R.H. (2006). Down syndrome mouse models are looking up: *Trends in Molecular Medicine*, v.12, p.237-40.

- Reeves R.H., Irving N.G., Moran T.H., Wohn A., Kitt C., Sisodia S.S., Schmidt C., Bronson R.T., Davisson M.T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits: *Nature Genetics*, v.11, p.177-84.
- Reynolds G.P., Warner C.E. (1988). Amino acid neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue: *Neuroscience Letters*, v.94, p.224-27.
- Reynolds L.E., Watson A.R., Baker M., Jones T.A., D'Amico G., Robinson S.D., Joffre C., Garrido-Urbani S., Rodriguez-Manzaneque J.C., Martino-Echarri E., Aurrand-Lions M., Sheer D., Dagna-Bicarelli F., Nizetic D., McCabe C.J., Turnell A.S., Kermorgant S., Imhof B.A., Adams R., Fisher E.M., Tybulewicz V.L., Hart I.R., Hodivala-Dilke K.M. (2010). Tumour angiogenesis is reduced in the Tc1 mouse model of Down's syndrome: *Nature*, v.465, p.813-17.
- Richtsmeier J.T., Zumwalt A., Carlson E.J., Epstein C.J., Reeves R.H. (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome: *American Journal of Medical Genetics*, v.107, p.317-24.
- Riedel G., Micheau J., Lam A.G.M., Roloff E.V.L., Martin S.J., Bridge H., De Hoz L., Poeschel B., McCulloch J., Morris R.G.M. (1999). Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature Neuroscience*, v.2, p.898-905.
- Risser D., Lubec G., Cairns N., Herrera-Marschitz M. (1997). Excitatory amino acids and monoamines in parahippocampal gyrus and frontal cortical pole of adults with Down syndrome: *Life Science*, v.60, p.1231-37.
- Roizen N.J., Patterson D. (2003). Down's syndrome: *Lancet*, v.361, p.1281-89.
- Roper R.J., Reeves R.H. (2006). Understanding the basis for Down syndrome phenotypes: *PLoS Genetics*, v.2, p.e50.
- Roper R.J., St John H.K., Philip J., Lawler A., Reeves R.H. (2006). Perinatal loss of Ts65Dn Down syndrome mice: *Genetics*, v.172, p.437-43.
- Roubertoux P.L., Carlier M. (2010). Mouse models of cognitive disabilities in trisomy 21 (Down syndrome): *American Journal of Medical Genetics*, v.154C, p.400-16.

Bibliografía

- Rowe J., Lavender A., Turk V. (2006). Cognitive executive function in Down's syndrome: The British Journal of Clinical Psychology, v.45, p.5-17.
- Rudolph U., Crestani F., Benke D., Brunig I., Benson J.A., Fritschy J.M., Martin J.R., Bluethmann H., Möhler H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific -aminobutyric acidA receptor subtypes: Nature, v.401, p.796-800.
- Rudolph U., Möhler H. (2006). GABA-based therapeutic approaches: GABA_A receptor subtype functions: Current Opinion in Pharmacology, v.6, p.18-23.
- Rueda N., Flórez J., Martínez-Cué C. (2008). Chronic pentylentetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome: Neuroscience Letters, v.433, p.22-27.
- Rueda N., Flórez J., Martínez-Cué C. (2012). Mouse models of Down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities: Neural Plasticity, v.2012, p.584071.
- Rueda N., Llorens-Martín M., Flórez J., Valdizán E., Banerjee P., Trejo J.L., Martínez-Cué C. (2010). Memantine normalizes several phenotypic features in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: Journal of Alzheimer's Disease, v.21, p.277–90.
- Sago H., Carlson E.J., Smith D.J., Kilbridge J., Rubin E.M, Mobley W.C., Epstein C.J., Huang T.T. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities: Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, v.95, p.6256-61.
- Sago H., Carlson E.J., Smith D.J., Rubin E.M., Crnic L.S., Huang T.T., Epstein C.J. (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome: Pediatric Research, v.48, p.606-13.
- Sairanen M., Lucas G., Ernfors P., Castrén M., Castrén E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus: Journal of Neuroscience, v.25, p.1089-94.
- Salehi A., Faizi M., Colas D., Valletta J., Laguna J., Takimoto-Kimura R., Kleschevnikov A., Wagner S.L., Aisen P., Shamloo M., Mobley W.C. (2009). Restoration of

- norepinephrine-modulated contextual memory in a mouse model of Down syndrome: *Science Translational Medicine*, v.1, p.7-17.
- Sánchez M.M, Heyn S.N., Das D., Moghadam S., Martin K.J., Salehi A. (2012). Neurobiological elements of cognitive dysfunction in Down syndrome: exploring the role of APP: *Biological Psychiatry*, v.71, p.403-9.
- Sarter M., Bruno J.P., Berntson G.G. (2001). Psychotogenic properties of benzodiazepine receptor inverse agonists: *Psychopharmacology (Berl)*, v.156, p.1-13.
- Scerif G., Steele A. (2011). Neurocognitive development of attention across genetic syndromes: inspecting a disorder's dynamics through the lens of another: *Progress in Brain Research*, v.189, p.285-301.
- Schliebs R., Arendt T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration: *Behavior Brain Research*, v.221, p.555-63.
- Schmahmann J. D. (2004). Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome: *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 16, p. 367-78.
- Schmidt-Sidor B., Wisniewski K.E., Shepard T.H., Sersen E.A. (1990). Brain growth in Down syndrome subjects 15 to 22 weeks of gestational age and birth to 60 months: *Clinical Neuropathology*, v. 9, p.181-90.
- Seidl R., Cairns N., Singewald N., Kaehler ST., Lubec G. (2001). Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down syndrome with Alzheimer-like neuropathology: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v.363, p.139-45.
- Sella F., Lanfranchi S., Zorzi M. (2013). Enumeration skills in Down syndrome: *Research in Developmental Disabilities*, v.34, p.3798-806.
- Seo H., Isacson O. (2005). Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice: *Experimental Neurology*, v.193, p.469-80.
- Shapiro B.L. (2001). Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome: *Journal of Neural Transmission: Supplementum*, v.61, p.11-34.

Bibliografia

- Shors T.J., Townsend D.A., Zhao M., Kozorovitskiy Y., Gould E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning: *Hippocampus*, v.12, p.578-84.
- Siarey R.J., Carlson E.J., Epstein C.J., Balbo A., Rapoport S.I., Galdzicki Z. (1999). Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome: *Neuropharmacology*, v.38, p.1917-20.
- Śmigielska-Kuzia J., Boćkowski L., Sobaniec W., Kułak W., Sendrowski K. (2010). Amino acid metabolic processes in the temporal lobes assessed by proton magnetic resonance spectroscopy (H MRS) in children with Down syndrome: *Pharmacological Reports*, v.62, p.1070-1077.
- Smigielska-Kuzia J., Sobaniec W. (2007). Brain metabolic profile obtained by proton magnetic resonance spectroscopy HMRS in children with Down syndrome: *Advances in Medical Sciences*, v.1, p.183-87.
- Smith K.S., Engin E., Meloni E.G., Rudolph U. (2012). Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABA_A receptor subtypes in mice: *Neuropharmacology*, v.63, p.250-58.
- Spinnler H., Tognoni G. (1987). Standardizzazione e taratura italiana di test neuropsicologici: *Italian Journal of Neurological Science*, v.8, p.44-46.
- Stagni F., Giacomini A., Guidi S., Ciani E., Bartesaghi R. (2015). Timing of therapies for Down syndrome: the sooner, the better: *Frontiers in Behavioural Neuroscience*, v.9, p.265. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00265.
- Sternfeld F., Carling R.W., Jelley R.A., Ladduwahetty T., Merchant K.J., Moore K.W., Reeve A.J., Street L.J., O'Connor D., Sohal B., Atack J.R., Cook S., Seabrook G., Wafford K., Tattersall F.D., Collinson N., Dawson G.R., Castro J.L., MacLeod A.M. (2004). Selective, orally active gamma-aminobutyric acidA alpha5 receptor inverse agonists as cognition enhancers: *Journal of Medicinal Chemistry*, v.47, p.2176-79.

- Stewart L.S., Persinger M.A., Cortez M.A, Snead O.C. (2007). Chronobiometry of behavioral activity in the Ts65Dn model of Down syndrome: *Behavior Genetics*, v. 37, p. 388-98.
- Sturgeon X., Gardiner K.J. (2011). Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions: *Mammalian Genome*, v.22, p.261-71.
- Sultan M., Piccini I., Balzereit D., Herwig R., Saran N.G., Lehrach H., Reeves R.H., Yaspo M.L. (2007). Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes: *Genome Biology*, v.8, p.R91.
- Sweatt J.D. (2016). Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances: *Journal of Neurochemistry*, v.139, p.179-99.
- Takashima S., Leshima A., Nakamura H., Becker L.E. (1989). Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain & Development*, v.11, p. 131-33.
- Takebayashi H., Yoshida S., Sugimori M., Kosako H., Kominami R., Nakafuku M., Nabeshima Y. (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: *Mechanisms of Development*, v.99, p.143-48.
- Teichmann M., Dupoux E., Kouider S., Bachoud-Lévi A.C. (2006). The role of the striatum in processing language rules: evidence from word perception in Huntington's disease: *Journal of Cognitive Neuroscience*, v.18, p.1555-69.
- Teipel S. J., Alexander G.E., Schapiro M.B., Möller H.J., Rapoport S.I., Hampel H. (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.
- Tozuka Y., Fukuda S., Namba T., Seki T., Hisatsune T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells: *Neuron*, v. 47, p.803-15.
- Trazzi S., Mitrugno V.M., Valli E., Fuchs C., Rizzi S., Guidi S., Perini G., Bartesaghi R., Ciani E. (2011). APP-dependent up-regulation of Ptch1 underlies proliferation impairment

Bibliografía

- of neural precursors in Down syndrome: *Human Molecular Genetics*, v.20, p.1560-73.
- Vacano G.N., Duval N., Patterson D. (2012). The use of mouse models for understanding the biology of Down syndrome and aging: *Current Gerontology and Geriatrics Research*, doi:10.1155/2012/717315.
- Van Praag H., Kempermann G., Gage F.H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus: *Nature Neuroscience*, v.2, p.266-70.
- Van Praag H., Schinder A.F., Christie B.R., Toni N., Palmer T.D., Gage F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus: *Nature*, v.415, p.1030-34.
- Venault P., Chapouthier G. (2007). From the behavioral pharmacology of beta-carbolines to seizures, anxiety, and memory: *The Scientific World Journal*, v.7, p.204-23.
- Venault P., Chapouthier G., Simiand J., Dodd R.H., Rossier J. (1987). Enhancement of performance by methyl beta-carboline-3-carboxylate, in learning and memory tasks: *Brain Research Bulletin*, v.19, p.365-70.
- Vicari S. (2006). Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome: *Behavior Genetics*, v.36, p.355-64.
- Vicari S., Bellucci S., Carlesimo G.A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome: *Neuropsychologia*, v.38, p.240-51.
- Vidal V., García S., Martínez P., Corrales A., Flórez J., Rueda N., Sharma A., Martínez-Cué C. (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., Belichenko P.V., Gillespie A.M., Kozy H.M., Mobley W.C., Epstein C.J. (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: *Mammalian genome*, v.16, p.79-90.

- Waller B.R., McQuinn T., Phelps A.L., Markwald R.R., Lo C.W., Thompson R.P., Wessels A. (2000). Conotruncal anomalies in the trisomy 16 mouse: an immunohistochemical analysis with emphasis on the involvement of the neural crest: *The Anatomical Record*, v.260, p.279-293.
- Ward C.P., McCarley R.W., Strecker R.E. (2009). Experimental sleep fragmentation impairs spatial reference but not working memory in Fischer/Brown Norway rats. *Journal of Sleep Research*, v.18, p.238-44.
- Watkins M.J., Michael J. (1974). Concept and measurement of primary memory: *Psychological Bulletin*, v. 81, p.695-711.
- Wetmore D.Z., Garner C.C. (2010). Emerging pharmacotherapies for neurodevelopmental disorders: *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v.31, p.564-81.
- Whitaker-Azmitia P.M. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin*, v.56, p.479-85.
- Whittle N., Sartori S.B., Dierssen M., Lubec G., Singewald N. (2007). Fetal Down syndrome brains exhibit aberrant levels of neurotransmitters critical for normal brain development: *Pediatrics*, v.120, p.1465-71
- Winter T.C., Ostrovsky A.A., Komarniski C.A., Uhrich S.B. (2000). Cerebellar and frontal lobe hypoplasia in fetuses with trisomy 21: usefulness as combined US markers: *Radiology*, v.214, p.533-38.
- Winters J.J, Semchuk M.T. (1986). Retrieval from long-term store as a function of mental age and intelligence: *American Journal of Mental Deficiency*, v.90, p.440-48.
- Wishart J.G. (2007). Socio-cognitive understanding: a strength or weakness in Down's syndrome?: *Journal of Intellectual Disability Research*, v.51, p.996-1005.
- Wisniewski H. M., Rabe A. (1986). Discrepancy between Alzheimer-type neuropathology and dementia in persons with Down's syndrome: *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.477, p.247-60.

- Wisniewski K.E. (1990). Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis: *American Journal of Medical Genetics Part A*, v.37, p.274-81.
- Wisniewski K.E., Kida E. (1994). Abnormal neurogenesis and synaptogenesis in Down syndrome: *Developmental Brain Dysfunction*, v.7, p.289-301
- Wisniewski K.E., Laure-Kamionowska M., Wisniewski H.M. (1984). Evidence of arrest of neurogenesis and synaptogenesis in brains of patients with Down's syndrome: *The New England Journal of Medicine*, v.311, p.1187-88.
- Wisniewski K.E., Schmidt-Sidor B. (1989). Postnatal delay of myelin formation in brains from Down syndrome infants and children: *Clinical Neuropathology*, v.8, p.55-62.
- Yamada J., Furukawa T., Ueno S., Yamamoto S., Fukuda A. (2007). Molecular basis for the GABAA receptor-mediated tonic inhibition in rat somatosensory cortex: *Cerebral Cortex*, v.17, p.1782-87.
- Yates C.M., Simpson J., Gordon, A. (1986). Regional brain 5-hydroxytryptamine levels are reduced in senile Down's syndrome as in Alzheimer's disease: *Neuroscience Letters*, v.65, p.189-92.
- Yee B.K., Hauser J., Dolgov V.V., Keist R., Möhler H., Rudolph U., Feldon J. (2004). GABA receptors containing the alpha5 subunit mediate the trace effect in aversive and appetitive conditioning and extinction of conditioned fear: *European Journal of Neuroscience*, v.20, p.1928-36.
- Yoder P., Woynaroski T., Fey M., Warren S. (2014). Effects of dose frequency of early communication intervention in young children with and without Down syndrome: *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities*, v.119, p.17-32.
- Yu T., Li Z., Jia Z., Clapcote S.J., Liu C., Li S., Asrar S., Pao A., Chen R., Fan N., Carattini-Rivera S., Bechard A.R. Spring S., Henkelman R.M., Stoica G., Matsui S., Nowak N.J., Roder J.C., Chen C., Bradley A., Yu Y.E. (2010a). A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions: *Human Molecular Genetics*, v.19, p.2780-91.

Yu T., Liu C., Belichenko P., Clapcote S.J., Li S., Pao A., Kleschevnikov A., Bechard A.R., Asrar S., Chen R., Fan N., Zhou Z., Jia Z., Chen C., Roder J.C., Liu B., Baldini A., Mobley W.C., Yu Y.E. (2010b). Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice: *Brain Research*, v.1366, p.162-71.

Zelazo P.D., Burack J.A., Benedetto E., Frye D. (1996). Theory of mind and rule use in individuals with Down's syndrome: a test of the uniqueness and specificity claims: *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v.37, p.479-84.

Zhou Q., Anderson D.J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification: *Cell*, v.109, p.61-73.

