

GRADO EN MEDICINA



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE
CANTABRIA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Estrategias farmacológicas para paliar los déficits
cognitivos en el síndrome de Down**

Pharmacological approaches to improve cognitive
deficits in Down syndrome

Autor: Dña. M^a Paz Suárez Méndez

Director/es: Dña. Carmen Martínez-Cué Pesini

Santander, Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

A la directora de este trabajo, Carmen Martínez-Cué, por brindarme la oportunidad de terminar la carrera adentrándome un poco en otra rama de la Medicina, tan desconocida a veces, como es la investigación. Por su disponibilidad, su tiempo y por tener siempre en cuenta mi opinión.

A todo el equipo del Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de Santander por permitirme ver el trabajo real que existe detrás de cualquier investigación. En especial, gracias a Verónica, Eva y Sara por todo el tiempo que me habéis dedicado, por recibirme siempre con una sonrisa y hacerme sentir parte del equipo.

Gracias a Laura y Juan Manuel por toda su ayuda con la maquetación y por todas las revisiones, consultas y consejos a horas intempestivas.

ÍNDICE

1 RESUMEN.....	6
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Introducción.....	9
2.2 Modelos murinos del síndrome Down	10
2.3 Alteraciones en el SD	11
2.3.1 Alteraciones de comportamiento en el síndrome Down y en el ratón Ts65Dn.....	11
2.3.2 Alteraciones neuromorfológicas	12
2.3.2.1 Hipocelularidad y reducción del volumen.....	12
2.3.2.2 Neurogénesis	13
2.3.2.3 Apoptosis	14
2.3.2.4 Hipotrofia dendrítica	15
2.3.2.5 Sinapsis	16
2.3.3 Alteraciones electrofisiológicas.....	17
2.3.4 Alteración de la neurotransmisión y de los receptores	17
2.3.4.1 GABA.....	17
2.3.4.2 Neurotransmisores excitadores	18
2.3.4.3 Serotonina	18
2.3.4.4 Acetilcolina	18
2.3.4.5 Noradrenalina.....	19
2.3.4.6 Neurotrofinas	19
2.3.5 Neurodegeneración.....	20
2.3.5.1 Neuroinflamación	20
2.3.5.2 Estrés oxidativo.....	20
2.3.5.3 Enfermedad de Alzheimer (EA)	20
2.4 Aproximaciones farmacológicas para paliar el deterioro cognitivo en el SD.....	21
2.4.1 Ts65Dn y la evaluación preclínica de la eficacia de fármacos.....	21
2.4.2 Tratamiento farmacológico exitoso en ratones Ts65Dn	22
2.4.2.1 Estrógenos y minociclina	22
2.4.2.2 Antagonistas del receptor GABA _A	22
2.4.2.3 Memantina, un antagonista del receptor NMDA.....	23
2.4.2.4 Fluoxetina	23
2.4.2.5 Inhibidores de la acetilcolinesterasa	24
2.4.2.6 Agonistas del receptor β -adrenérgico	24

2.4.2.7 Litio	25
2.4.2.8 Melatonina	25
2.4.2.9 Sonic hedgehog	25
2.4.2.10 Epigallocatequina-3-galato (EGCG)	26
2.4.2.11 Antioxidantes.....	26
2.4.2.12 Inhibición de la producción A β	26
2.4.2.13 Neuropeptidos.....	26
2.4.2.14 Colina	27
2.4.2.15 Antagonistas del receptor GABA _B	27
2.4.3 Tratamientos fallidos en Ts65Dn.....	27
2.4.3.1 Análogo cíclico de GABA: piracetam	27
2.4.3.2 Etosuximida	27
2.4.3.3 Antagonista específico de la subunidad 2B de receptor NMDA: RO256981 ...	28
2.5 Estado actual de los ensayos clínicos para mejorar el déficit cognitivo en el SD	28
3 ESTANCIA EN EL LABORATORIO: MATERIAL Y MÉTODOS	32
3.1 Animales	33
3.2 Estudios conductuales	33
3.2.1 Estudios cognitivos	33
3.2.1.1 Aprendizaje espacial: laberinto acuático de Morris.....	33
3.2.1.2 Condicionamiento de miedo: test de condicionamiento del miedo a un contexto.....	34
3.2.2 Estudios sensorimotrices, de actividad locomotora y ansiedad.....	35
3.2.2.1 Pruebas sensorimotoras.....	35
3.2.2.2 Coordinación motora: rotarod	36
3.2.2.3 Actividad espontánea: actimetría	37
3.2.2.4 Actividad exploratoria: tabla de agujeros	37
3.2.2.5 Ansiedad	38
3.3 Estudios neuromorfológicos.....	39
3.3.1 Preparación de tejidos.....	40
3.3.2 Tinción Nissl y cuantificación de neuronas granulares	40
3.3.3 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	41
3.3.4 Cuantificación	42
4 ANEXOS.....	43
Anexo I	44
5 BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de Hsa21 y las regiones sintéticas de Mmu16, Mmu17, Mmu10 y el modelo de ratón Ts65Dn. Modificado de [(Rueda et al., 2012)].....	10
Figura 2: Prueba del laberinto acuático de Morris. (A) Secuencia de una sesión de adquisición en la que el animal nada hasta encontrar la plataforma. (B) Secuencia en una sesión de aprendizaje guiado en la que la plataforma se encuentra visible, señalada con una bandera.	34
Figura 3: Aparato de condicionamiento del miedo.	35
Figura 4: Prueba de equilibrio sobre barra de madera (A) y de aluminio (B) y prueba de la percha (C).....	36
Figura 5: Prueba de coordinación motora en el Rotarod.....	37
Figura 6: Prueba de la tabla de agujeros. En la imagen se observa un animal realizando una exploración o head-dipping.	37
Figura 7: Prueba del campo abierto. En la imagen de la izquierda se observa al animal realizando actividad horizontal en la periferia y en la de la derecha una incorporación (actividad vertical).	38
Figura 8: Prueba del laberinto elevado en cruz. (A) En la imagen se observa al animal realizando un head-dipping, (B) entrando en un brazo abierto y (C) realizando una conducta de aproximación-retirada.	39
Figura 9: Fases de la neurogénesis en el hipocampo adulto y relación con la expresión de los marcadores utilizados en el estudio. Modificada de (Corrales et al., 2014).	39

1 RESUMEN

Abstract: Down syndrome (DS), the most common genetic cause of intellectual disability, is due to the total or partial triplication of human chromosome 21. Despite numerous efforts, the mechanisms whereby gene triplication leads to the different DS phenotypes have not been elucidated and there are no pharmacological treatments available for the cognitive alterations in DS. Over the last years, the most accepted murine model of DS, the Ts65Dn mouse, has been widely used to investigate the neural mechanisms underlying the intellectual disabilities of DS individuals. Furthermore, a number of pharmacological therapies have been shown to partially restore neuromorphological anomalies concomitantly with cognition in these mice. This review is focused on the major alterations found in the brains of DS individuals and of mouse models of this condition. Information from the preclinical evaluations in the Ts65Dn mouse and state of human clinical trials performed in individuals with DS are also summarized. In the second part of this work, the methods used in the preclinical assessment performed during my stay in the Laboratory of Neurobiology of Learning of the Department of Physiology and Pharmacology of the Faculty of Medicine of Santander are described.

Keywords: Ts65Dn, intellectual disability, pharmacotherapy, clinical trials.

Resumen: El síndrome de Down (SD), la causa genética más común de discapacidad intelectual, se debe a la triplicación total o parcial del cromosoma 21. A pesar de los esfuerzos realizados, los mecanismos por los que la triplicación genética conduce a los diferentes fenotipos del SD no han sido aclarados y actualmente no existen tratamientos farmacológicos para paliar las alteraciones cognitivas del SD. En los últimos años, el modelo murino más aceptado de SD, el ratón Ts65Dn, ha sido ampliamente utilizado para investigar los mecanismos neuronales subyacentes a la discapacidad intelectual del SD. Además, se ha demostrado que varias terapias farmacológicas restauran parcialmente anomalías neuromorfológicas y la cognición en estos ratones. Esta revisión, describe las principales alteraciones encontradas en el cerebro de personas con SD y en modelos animales de esta condición. También se resume la información de las evaluaciones preclínicas de distintas farmacoterapias en el ratón Ts65Dn y el estado actual de los ensayos clínicos realizados en personas con SD. En la segunda parte de este trabajo se describen los métodos utilizados en la evaluación preclínica realizada durante mi estancia en el Laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de Santander.

Palabras clave: Ts65Dn, discapacidad intelectual, farmacoterapia, ensayos clínicos.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUCCIÓN

El Síndrome Down (SD) es debido a la trisomía total o parcial del cromosoma 21 (Hsa21). Es la causa más frecuente de discapacidad mental de origen genético (Bartesaghi et al., 2011). Afecta a 1 de cada 850-1000 nacimientos y se caracteriza por diferentes fenotipos, entre los que se incluyen alteraciones cardíacas, esqueléticas y motoras. Sin embargo, la característica más común del SD es la discapacidad intelectual que afecta al 100 % de los individuos con este síndrome. Las personas con SD presentan típicamente un cociente intelectual (CI) de 50 (rango: 30-70) y muestran diferentes alteraciones cognitivas y de comportamiento. Entre los que se incluyen una adquisición incompleta y tardía de habilidades motoras, lingüísticas y visuo-espaciales, el deterioro en el aprendizaje y la memoria, y alteraciones neurocomportamentales. Además, la población SD tiene mayor riesgo de desarrollar demencia tipo Alzheimer a edades tempranas (Rueda et al., 2012).

Gracias a los adelantos médicos, la esperanza de vida de los individuos con SD ha aumentado notablemente, lo que hace cada vez más necesaria una estrategia para paliar los déficits cognitivos de estas personas. Sin embargo, los mecanismos exactos mediante los cuales esta triplicación genética da lugar a los diferentes fenotipos aún no son totalmente conocidos y, en la actualidad no hay terapias que mejoren, reduzcan o palien estos déficits (Bartesaghi et al., 2011). Se han propuesto dos hipótesis para explicar cómo la trisomía del Hsa21 es capaz de generar toda esa serie de fenotipos. La primera hipótesis, la del “aumento de la inestabilidad del desarrollo”, propone que la trisomía del Hsa21 produce una alteración general de la homeostasis durante el desarrollo. La segunda, la llamada “efecto de la dosis genética”, mantiene que estas alteraciones son la consecuencia de la sobreexpresión de un grupo de genes y las proteínas que estos codifican, así como la interacción de estos genes sobreexpresados con genes de otros cromosomas (Rueda et al., 2012).

Los modelos de ratón que tratan de mimetizar las patologías humanas se han convertido en una herramienta de valor incalculable a la hora de descubrir los mecanismos subyacentes a una determinada enfermedad, así como para estudiar el efecto de nuevas terapias en ellas (Bartesaghi et al., 2011).

Para considerar un modelo animal de un trastorno humano como válido éste debe cumplir una serie de criterios: validez de constructo, aparente y predictiva. La validez de constructo se refiere a la similitud entre la etiología del trastorno humano y animal. En el caso de los modelos murinos de SD, se trataría de la triplicación de los genes del Hsa21. La validez aparente hace referencia a en qué medida el modelo animal es capaz de mimetizar a nivel molecular, celular, fisiológico y comportamental los diferentes fenotipos observados en humanos. La validez predictiva requiere que el nuevo conocimiento obtenido en los modelos animales haga predicciones precisas sobre lo que se encontrará en el trastorno humano. Esta última es particularmente importante debido a que los mecanismos neurobiológicos que desencadenan los déficits cognitivos en el SD no pueden estudiarse directamente en personas tanto por razones éticas como prácticas (Rueda et al., 2012).

2.2 MODELOS MURINOS DEL SÍNDROME DOWN

El brazo largo del Hsa21 contiene aproximadamente 552 genes, 166 de los cuales son ortólogos a genes localizados en regiones sintéticas de tres cromosomas de ratón: Mmu16 (110 genes ortólogos), Mmu17 (19 genes ortólogos) y Mmu10 (37 genes ortólogos) (Sturgeon y Gardiner, 2011). Se han desarrollado diferentes modelos de ratón trisómicos para diferentes grupos de genes de Hsa21. El primer ratón creado como modelo animal del SD se denominó Ts16 y era trisómico para todo Mmu16 (Gropp et al., 1975).

En 1993, Davisson et al. crearon el ratón Ts65Dn, que es actualmente el modelo de SD más estudiado y mejor caracterizado. Este ratón porta una trisomía parcial de un segmento de Mmu16 que se extiende entre los *Mrpl39* y *Znf295* y contiene aproximadamente 92 genes ortólogos a los del Hsa21 (Sturgeon y Gardiner, 2011). Además, los ratones Ts65Dn portan una trisomía de ~10Mb de Mmu17 que contiene 60 genes no-homólogos a los del Hsa21 (Duchon et al., 2011). Por tanto, este modelo no tiene una validez de constructo perfecta debido a que muchos de estos genes ortólogos encontrados en Hsa21 no están triplicados en este ratón y otros genes no triplicados en el SD sí lo están en este modelo animal. A pesar de esto, el ratón Ts65Dn es actualmente el modelo que presenta la mejor validez aparente. Se han desarrollado otros modelos murinos de SD, sin embargo, la comparación fenotípica de los ratones Ts65Dn con otros modelos con trisomías parciales sugiere que el conjunto de genes triplicados en éste contribuyen más al desarrollo de los fenotipos del SD, incluyendo alteraciones cognitivas y neuroanatómicas (Rueda et al., 2012). Por tanto, en esta revisión nos centraremos en el modelo Ts65Dn.

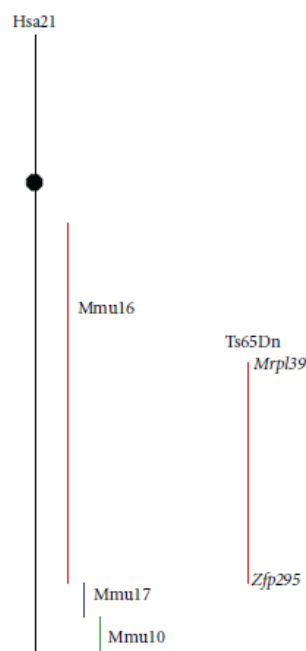


Figura 1: Representación esquemática de Hsa21 y las regiones sintéticas de Mmu16, Mmu17, Mmu10 y el modelo de ratón Ts65Dn. Modificado de [(Rueda et al., 2012)]

2.3 ALTERACIONES EN EL SD

2.3.1 Alteraciones de comportamiento en el síndrome Down y en el ratón Ts65Dn

SD

Aunque existen casos de individuos SD con un CI en el rango de la normalidad, lo habitual es que el CI descienda hasta un rango de discapacidad moderada-severa (CI=25-55) y raramente la edad mental supera los 8 años. El CI va disminuyendo progresivamente según avanza en edad y suele disminuir bruscamente entre los 6 meses y los 2 años y producirse, un declive adicional en la adolescencia. Los niños con SD muestran un retraso y una adquisición incompleta de las funciones motoras, lingüísticas, cognitivas y adaptativas en comparación con niños de la misma edad (Bartesaghi et al., 2011).

Una de las características más comunes del SD es la disfunción motora. Desde la infancia presentan hipotonía, hiporreflexia, reducción de la fuerza muscular, fallos en el control del músculo estriado, y retrasos en la adquisición de habilidades motoras finas y gruesas (Davis y Kelso, 1982; Latash y Corcos, 1991; Shumway-Cook y Woollacott, 1985). Los niños con SD no son capaces de rodar hasta los 5-6.4 meses y son incapaces de sentarse solos hasta los 8.5-11.7 meses. Este retraso es mayor en el posterior desarrollo de habilidades motoras. Por ejemplo, no suelen ser capaces de caminar hasta los 15-74 meses (Vicari, 2006).

En cuanto al desarrollo de habilidades lingüísticas, mientras que estos niños no presentan alteraciones en la vocalización, sí que exhiben una transición más lenta del balbuceo al habla (Chapman y Hesketh, 2000; Stoel-Gammon, 2001), así como un retraso en el léxico expresivo y en la sintaxis. En general los adolescentes y adultos jóvenes muestran unas capacidades lingüísticas pobres (Dykens et al., 1994; Chapman y Hesketh, 2000; Vicari, 2006).

Por otro lado, los individuos con SD responden peor que los de su misma edad mental a la hora de procesar material de percepción visual e imágenes, aunque no suelen tener alterada la capacidad de procesar datos espaciales (Vicari, 2006).

En lo que se refiere a los distintos procesos de aprendizaje y memoria, muchos estudios han documentado un deterioro en la memoria de trabajo así como en la verbal a corto plazo (revisado por Vicari, 2006). Los niños con SD tienen una habilidad normal para aprender tareas que implican memoria implícita, pero exhiben un deterioro selectivo de la memoria explícita, probablemente debido a sus dificultades para codificar y recuperar nueva información almacenada, así como a déficits de atención (Carlesimo et al, 1997; Vicari et al., 2000). Tanto los niños como los adultos con SD presentan un deterioro severo de cualquier tarea cognitiva que depende del correcto funcionamiento del hipocampo y la corteza prefrontal (Nadel, 2003).

Respecto a los trastornos neurocomportamentales, los niños con SD tienen más posibilidades de presentar un incremento de la actividad motora e impulsividad, desobediencia y rabietas, agitación, ansiedad y procesamiento neurocognitivo atípico (Capone et al., 2006).

Otra característica del SD es el alto riesgo de desarrollo de demencia tipo Alzheimer alrededor de los 35 años de edad. Aunque no todo desarrollan este tipo de demencia, el 100% de las personas con SD presentan neuropatología idéntica a la de la enfermedad de Alzheimer (EA) en

la tercera década de vida, incluyendo muerte neuronal, acumulación de placas seniles y ovillos neurofibrilares (Dalton y Crapper-McLachlan, 1986).

Ts65Dn

Los ratones Ts65Dn muestran numerosas características fenotípicas similares a las encontradas en las personas con SD. En primer lugar, estos animales presentan hiperactividad especialmente en ambientes que provocan cautela e inmovilidad en los ratones normales como en las pruebas del campo abierto del laberinto en cruz (Escorihuela et al., 1995; Coussons-Read y Crnic, 1996; Martínez-Cué et al., 2005; Stewart et al., 2007). Se ha propuesto que esta hiperactividad está relacionada con una menor capacidad de reconocer estímulos potencialmente peligrosos debido a un déficit de atención (Crnic y Pennington, 2000; Escorihuela et al., 1998; Driscoll et al., 2004; Martínez-Cué et al., 2006).

Al igual que las personas con SD, los ratones Ts65Dn muestran una reducción notable en el nivel de desempeño de tareas que requieren la integridad del hipocampo, como la alternancia espontánea en el laberinto en T, la memoria contextual en el test de condicionamiento del miedo y el aprendizaje y la memoria espacial en las pruebas del laberinto radial, del laberinto acuático de Morris (MWM) y del reconocimiento de objetos (Belichenko et al., 2009; Bianchi et al., 2010; Demas et al., 1996; Fernandez y Garner, 2008; Belichenko et al. 2009). Esto indica que la memoria declarativa que, en los roedores se corresponde con los dominios de la memoria espacial y de reconocimiento, está deteriorada en el ratón Ts65Dn de forma similar a lo que ocurre en los individuos con SD.

2.3.2 Alteraciones neuromorfológicas

Se han propuesto diferentes mecanismos responsables del deterioro cognitivo que presentan las personas con SD. En los siguientes párrafos se resumen los mecanismos neuromorfológicos más importantes, comparando los hallazgos en los individuos con SD y los modelos animales.

2.3.2.1 Hipocelularidad y reducción del volumen

En los individuos con SD el volumen cerebral se encuentra reducido (Pinter et al., 2001). Esta disminución comienza en los primeros estadios de desarrollo (Olson et al., 2007; Winter et al., 2000; Guihard-Costa et al., 2006; Guidi et al., 2008; Guidi et al., 2011; Golden y Hyman, 1994), alcanzando en los adultos una reducción de aproximadamente el 20% del volumen normal de un adulto (Jernigan et al., 1993; Pinter et al., 2001). Con la edad y la neurodegeneración este escenario empeora (Teipel y Hampel, 2006). Diferentes estudios han demostrado que esta reducción de volumen no es simétrica, sino que afecta más a ciertas áreas. El hipocampo las cortezas entorrinal, frontal, prefrontal y temporal, la amígdala, el cerebelo, los núcleos cerebrales y los cuerpos mamilares del hipocampo se ven más afectados que el resto de estructuras (Jernigan et al., 1993; Pinter et al., 2001; Wisniewski et al., 1984; Kesslak et al., 1994; Raz et al., 1995; Pine et al., 1997; Aylward et al., 1997; Aylward et al., 1999; Pinter et al., 2001; Teipel et al., 2003; Teipel et al., 2004).

En los individuos con SD la densidad celular no está comprometida en la gestación temprana (Guidi et al., 2008; Golden y Hyman 1994; Weitzdoerfer et al., 2001), pero el número de células se ve reducido en la gestación tardía (después de las semanas 19-23). El número de neuronas del hipocampo, giro parahipocampal, cerebelo y neocórtex está reducido en los fetos (Golden y

Hyman 1994; Guidi et al., 2008; Guidi et al., 2011; Larsen et al., 2008), recién nacidos (Guidi et al., 2008; Weitzdoerfer et al., 2001), niños y adultos (Gandolfi et al., 1981) con SD.

Además, debido a la aparición de patología tipo EA, el cerebro adulto SD muestra una pérdida de neuronas colinérgicas (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997).

Ts65Dn

El volumen cerebral de los ratones Ts65Dn está reducido durante el periodo embrionario, pero no después del nacimiento o durante la edad adulta. Sin embargo, en estas edades sí se observan alteraciones en el tamaño y anatomía de algunas estructuras como el cerebelo y el hipocampo (Bartesaghi et al., 2011). Estas alteraciones se deben a la hipocelularidad encontrada en distintas áreas del encéfalo de los ratones Ts65Dn. Durante la etapa prenatal y en los primeros estadios estos animales muestran una disminución en la densidad celular en el neocórtex (Chakrabarti et al., 2007). En el hipocampo los ratones trisómicos adultos presentan una densidad neuronal menor (Insausti et al., 1998; Kurt et al., 2004), mientras que en el cerebelo el número de células granuladas y de Purkinje está reducido desde los primeros estadios postnatales hasta la edad adulta (Baxter, Moran, Richtsmeier, Troncoso, & Reeves, 2000; Contestabile, Fila, Capellini, Bartesaghi, & Ciani, 2009; Roper et al., 2006).

Además, a medida que los ratones Ts65Dn envejecen presentan una pérdida de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal (Contestabile et al., 2008; Granholm et al., 2000; Cooper et al., 2001; Hunter et al., 2003; Hunter et al., 2004).

Por lo tanto, el cerebro de los individuos con SD presenta alteraciones desde etapas tempranas del desarrollo, tales como una reducción de volumen y una alteración en la configuración. De forma similar, los ratones Ts65Dn muestran alteraciones de forma y tamaño de distintas áreas del cerebro y cerebelo. Estos cambios parecen ser una de las causas de las alteraciones cognitivas de los individuos con trisomía del Hsa21.

2.3.2.2 Neurogénesis

La hipocelularidad encontrada en el cerebro SD podría ser debida a una menor neurogénesis o a una mayor apoptosis.

La neurogénesis está severamente comprometida en las personas con SD desde el inicio del desarrollo debido a la ralentización del ciclo celular y a alteraciones en la proliferación de precursores neuronales y en los procesos de diferenciación (Rueda et al., 2012).

Hay evidencias de que en los fetos con SD la proliferación celular se encuentra severamente deteriorada en la matriz germinal del cuerno inferior del cuarto ventrículo, en las zonas germinales del hipocampo y en la capa granular externa del cerebelo. Estas alteraciones en proliferación son debidas a que la copia extra del Hsa21 en el SD retrasa el ciclo celular de los precursores neuronales (Contestabile et al., 2007; Guidi et al., 2008).

Se han propuesto varios genes que se encuentran en trisomía en el SD como responsables del deterioro en la proliferación detectada en este trastorno. Uno de estos genes sobreexpresados es *DYRK1A* (dual specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A) (Guimerá et al., 1996), que es esencial para el desarrollo normal de la neurogénesis postembrionaria (Tejedor et

al., 1995; Guimera et al., 1999). Este gen juega un papel importante en la proliferación de precursores neuronales, neurogénesis, neurodiferenciación, y regula el desarrollo neuronal, el volumen cerebral y la densidad celular en diferentes áreas cerebrales (Guimera et al., 1999; Kentrup et al., 1996; Yang et al., 2001; Hämmerle et al., 2003). La proteína DYRK1A modula a su vez la actividad de CREB (cAMP response element-binding protein) que participa en las vías de transducción de señales de plasticidad neuronal (Yang et al., 2001).

Los genes *OLIG1* y *OLIG2* también están sobreexpresados en los individuos con SD. Estos genes codifican factores de transcripción que están implicados en la neurogénesis y la oligodendrogénesis (Takebayashi et al., 2000; Lu et al., 2002; Zhou y Anderson, 2002). Chakrabarti et al. (2010) demostraron la implicación de estos genes en la regulación del número de neuronas durante el desarrollo embrionario.

Ts65Dn

En los ratones Ts65Dn se ha detectado una reducción de la proliferación en todos los estadios en las zonas ventricular, subventricular (Chakrabarti et al., 2007; Chakrabarti et al., 2010) y subgranular (Insausti et al., 1998; Lorenzi y Reeves, 2006; Contestabile et al., 2007; Bianchi et al., 2010). Así mismo, se ha demostrado una reducción en la proliferación de las células precursoras de las células granulares cerebelosas en la capa granular externa del cerebelo (Roper et al., 2006).

Al igual que ocurría en el SD, las alteraciones en neurogénesis encontradas en el ratón Ts65Dn son debidas a una reducción de la proliferación de precursores neuronales tanto en la corteza como en la zona ventricular del cerebelo, como resultado del alargamiento del ciclo celular (Chakrabarti et al., 2007). Aunque estos animales también tienen alterados la diferenciación y supervivencia neuronal (Bartesaghi et al., 2011).

Al igual que en las personas con SD, los ratones Ts65Dn sobreexpresan determinados genes que tienen un papel fundamental en la neurogénesis. La normalización de la expresión del gen *Dyrk1A* (García-Cerro et al., 2014) o de los genes *Olig1* y *Olig2* (Chakrabarti et al., 2010) en los ratones Ts65Dn normaliza la producción anormal de neuronas.

Por tanto, el deterioro de la neurogénesis en el SD y en el ratón Ts65Dn se debe a reducciones en el número de precursores neuronales, en el tiempo del ciclo celular y en alteraciones en la diferenciación. Estas alteraciones, responsables de la hipocelularidad dan lugar a una alteración de la sinaptogénesis, conectividad, plasticidad sináptica y por tanto tienen un importante papel en los déficits cognitivos encontrados en el SD (Rueda et al., 2012).

2.3.2.3 Apoptosis

Los diferentes estudios sobre procesos apoptóticos en el cerebro del SD han llegado a resultados contradictorios. Algunos grupos han descrito un incremento en el número de células apoptóticas en el cerebro SD (Guidi et al., 2008; Anderson et al., 2000) y en los ratones Ts65Dn (Contestabile et al., 2007). Además se han encontrado cambios en las proteínas que regulan la apoptosis en diferentes estructuras cerebrales (Sawa et al., 1997; Gulesserian et al., 2001a; Gulesserian et al., 2001b; Helguera et al., 2005; Engidawork et al., 2001). Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias o incluso han descrito una disminución en la tasa de apoptosis celular tanto en humanos como en ratones con esta trisomía (Contestabile et al.,

2007; Seidl et al., 1999). Recientemente se ha demostrado una disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-XI en el hipocampo de los ratones Ts65Dn, sin otros cambios en otras proteínas antiapoptóticas en la corteza o en el hipocampo (Rueda et al., 2011). Además, no se encontraron cambios en los marcadores moleculares y celulares de la apoptosis, lo que sugiere que no es probable que la muerte celular programada juegue un papel en la hipocelularidad que se encuentran en los cerebros de estos ratones (Rueda et al., 2012).

Por tanto, la apoptosis no parece ser un factor determinante en la reducción del número de neuronas que presentan los cerebros con SD.

2.3.2.4 Hipotrofia dendrítica

Para que una adecuada plasticidad sináptica tenga lugar es necesario que se produzcan modificaciones en el número y las características funcionales de las sinapsis, que se localizan principalmente en las dendritas y las espinas dendríticas (Kasai et al., 2003; Newpher y Ehlers, 2009). Por tanto, la menor plasticidad sináptica encontrada en las personas con SD (ver más adelante) puede deberse a alteraciones en las características histológicas, funcionales o en el número de dendritas, espinas y sinapsis.

Numerosos estudios han demostrado que la morfología dendrítica está alterada en las personas con SD. A pesar de que se ha descrito una ramificación dendrítica normal o incluso aumentada en fetos y neonatos (Takashima et al., 1994; Vuksić et al., 2002; Becker et al., 1986), en los niños con SD las neuronas de la corteza motora (Prinz et al., 1997), visual (Becker et al., 1986; Takashima et al., 1981) y parietal (Schulz y Scholz, 1992) muestran una hipotrofia dendrítica. Estas anomalías continúan a lo largo de la vida. En los adultos con SD la corteza visual y las áreas CA1 y CA3 del hipocampo se caracterizan por la presencia de dendritas más cortas y arboles dendríticos con menor ramificación que, además, degeneran progresivamente (Takashima et al., 1994; Takashima et al., 1981; Takashima et al., 1989; Suetsugu y Mehraein, 1980). Así mismo, las personas con SD tienen alteraciones en la morfología de las espinas dendríticas. En la infancia sus espinas son más pequeñas y menos numerosas (Suetsugu y Mehraein, 1980; Marin-Padilla, 1976) y su densidad se reduce en mayor medida en los adultos con SD y EA (Takashima et al., 1989; Ferrer y Gullotta, 1990).

Ts65Dn

Este modelo murino presenta una patología dendrítica muy similar a la encontrada en el SD. En los ratones Ts65Dn adultos, las neuronas piramidales neocorticales muestran una reducción de la longitud y la ramificación de las dendritas así como de la densidad de las espinas (Dierssen et al., 2003). La densidad de las espinas también se encuentra disminuida en las células granulares del giro dentado hipocampal. Además, estas espinas se caracterizan por varias anomalías morfológicas, entre las que se incluyen un incremento en el tamaño de las cabezas y una disminución de la longitud de los cuellos (Belichenko et al., 2007; Belichenko et al., 2004).

Por lo tanto, desde la infancia tanto las personas con SD como los ratones Ts65Dn presentan atrofia de los arboles dendríticos, reducción de la densidad de las espinas y alteraciones en la morfología de las espinas. Todas estas alteraciones tendrán un papel fundamental en la disfunción sináptica que se observa en el cerebro con SD y serán parcialmente responsable de los déficits cognitivos encontrados en esta condición.

2.3.2.5 Sinapsis

Como se puede predecir a partir de la reducción de la longitud de las dendritas, del número de ramificaciones dendríticas y de la densidad de las espinas, la trisomía 21 se caracteriza por un número reducido de sinapsis así como alteraciones en la plasticidad sináptica (Rueda et al., 2012).

Las personas con SD presentan cambios en diversas proteínas sinápticas. En primer lugar, Septin 6, una proteína relacionada con las vesículas sinápticas, está presente en los sujetos controles y ausente en la mayoría de los cerebros con SD (Cheon et al., 2001). Además, los individuos con SD presentan en diferentes áreas cerebrales una disminución de los niveles de las proteínas presinápticas, sinaptofisina y SNAP-25 (Downes et al., 2008). Dado que estas proteínas juegan un papel importante en la liberación de los neurotransmisores, su disminución podría comprometer la función sináptica. Por último, la sinaptojanina es una proteína sináptica que se codifica en Hsa21. Por tanto, la triplicación de este cromosoma da lugar a una expresión excesiva de esta última proteína, en los cerebros de SD desde las etapas fetales hasta la edad adulta (Arai et al., 2002).

Ts65Dn

Los ratones Ts65Dn muestran una reducción de la densidad sináptica en el neocórtex y en el área CA1 del hipocampo en etapas postnatales tempranas (Chakrabarti et al., 2007) y en las regiones CA1, CA3 y en el giro dentado del hipocampo cuando son adultos (Kurt et al., 2004). Sin embargo, el tamaño de los botones presinápticos y la longitud de las hendiduras sinápticas están incrementados en la corteza y en el hipocampo (Belichenko et al., 2007; Belichenko et al., 2009; Belichenko et al., 2004).

En el ratón Ts65Dn no solo se ven afectados el número y las características de las sinapsis sino también la relativa distribución de los diferentes tipos de sinapsis, dejando el balance entre sinapsis inhibitorias y excitadoras inclinado a favor de las inhibitorias. Los ratones Ts65Dn presentan menor número de sinapsis excitadoras en la corteza temporal, giro dentado, CA1 y CA3 (Kurt et al., 2004; Kurt et al., 2000). Además, estos animales tienen un mayor número de neuronas GABAérgicas en la corteza somatosensorial (Pérez-Cremades et al., 2010), y un incremento de la neurogénesis de neuronas inhibitorias (Chakrabarti et al., 2010) lo que implica un incremento de la transmisión inhibitoria.

De manera similar a lo descrito en el SD, los ratones Ts65Dn presentan alteraciones en la cantidad de algunas proteínas sinápticas. Los ratones Ts65Dn de 4-5 meses muestran un incremento en los niveles de sinaptofisina en la corteza somatosensorial (Pérez-Cremades et al., 2010) y una reducción en el hipocampo (Pollonini et al., 2008). Por lo tanto, parece que la expresión de las proteínas sinápticas en los cerebros trisómicos puede diferir según la edad y la región cerebral estudiada.

Todos estos cambios morfológicos, funcionales y proteicos comprometen las propiedades fisiológicas de las sinapsis, lo que contribuye al deterioro cognitivo presente en el SD.

2.3.3 Alteraciones electrofisiológicas

Los individuos con SD presentan pequeñas anomalías en el EEG. La actividad alfa del EEG está relativamente conservada en los jóvenes, pero los individuos mayores con demencia presentan una actividad anormal (Devinsky et al., 1990). Por otro lado, las personas con SD presentan diferencias de coherencia en el EEG y alteraciones en los potenciales cerebrales relacionados con eventos (ERPs) (Karrer et al., 1998).

Ts65Dn

En los ratones Ts65Dn la actividad basal de transmisión sináptica en el giro dentado es normal, mientras que la potenciación a largo plazo (LTP) se ve alterada como resultado de la reducción de activación de los receptores NMDA y de la mayor activación de los receptores GABA_A y GABA_B (Kleschevnikov et al., 2004; O'Doherty et al., 2005; Belichenko et al., 2007; Belichenko et al., 2009).

Por lo tanto, existe un desequilibrio entre el número de sinapsis inhibitorias y excitadoras, con un incremento de las inhibitorias que comprometen la generación de potenciación a largo plazo y, como consecuencia, dan lugar a alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Bartesaghi et al., 2011).

2.3.4 Alteración de la neurotransmisión y de los receptores

Además del sistema colinérgico, que sufre degeneración en etapas avanzadas de la vida, los sistemas glutamatérgico, serotoninérgico, noradrenérgico y GABAérgico están profundamente alterados tanto en los individuos con SD como en los ratones trisómicos. Estas alteraciones incluyen modificaciones en los niveles de neurotransmisores y defectos en la expresión/función de los receptores (Bartesaghi et al., 2011).

A continuación, se describirán las alteraciones de los neurotransmisores y receptores más importantes encontradas en estas condiciones.

2.3.4.1 GABA

Los niveles de GABA están reducidos en los fetos con SD (Whittle et al., 2007). Además, la expresión de varias subunidades de los receptores GABA_A está alterada en neuroesferas de fetos con SD, incluyendo una mayor expresión de la unidad $\alpha 2$ y una disminución de las de $\alpha 5$ y $\beta 3$ (Bhattacharyya et al., 2009).

Sin embargo, en lugar de una reducción los ratones Ts65Dn presentan un incremento del número de neuronas inhibitorias (Chakrabarti et al., 2010; Pérez-Cremades et al., 2010). Estos ratones también presentan alteraciones en la expresión de distintas subunidades del receptor GABA_A, tales como la reducción de la expresión de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ (Belichenko et al., 2009) y $\alpha 1$ del receptor GABA_A (Bhattacharyya et al., 2009). En estos animales también se han encontrado cambios en la subunidad R1 de GABA_B (Belichenko et al., 2009).

2.3.4.2 Neurotransmisores excitadores

El incremento de la inhibición en este trastorno trisómico está también causado por alteraciones en la transmisión excitadora. Aunque los fetos con y sin SD presentan niveles similares de glutamato (Sairanen et al., 2005), los niveles de aspartato y de glutamato se encuentran reducidos en diversas áreas de los cerebros adultos con SD (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997; Schneider et al., 1997).

Por otro lado, la alteración de la LTP del hipocampo sugiere la existencia de alteraciones en la señalización del receptor NMDA (Vink et al., 2009).

Los ratones Ts65Dn exhiben hipersensibilidad al efecto estimulador que produce MK-801, un bloqueador de canal del receptor NMDA (Siddiqui et al., 2008). Además, en estos animales se han descrito anomalías en los mecanismos de señalización del receptor NMDA en el hipocampo, incluyendo alteraciones en CaMKII, PIP3K/Akt, ERK, PKA y PKC, todos ellos implicados en la plasticidad sináptica (Siarey et al., 2006).

2.3.4.3 Serotonina

Los niveles de serotonina (5-HT) están reducidos en la corteza frontal de los cerebros de fetos (Whittle et al., 2007) y adultos con SD (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997; Yates et al., 1986). Por otro lado, la densidad del receptor 5-HT_{1A}, que está implicado en la regulación de la neurogénesis (Malberg et al., 2000; Santarelli et al., 2003; Encinas et al., 2006) está reducido en el momento del nacimiento en el hipocampo de personas con SD (Bar-Peled et al., 1991).

Los ratones Ts65Dn no muestran cambios en los niveles de 5-HT en el hipocampo (Bianchi et al., 2010) o en las características de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal ni medial (Megías et al., 1997). Sin embargo, estos animales presentan en el momento del nacimiento una reducción del número de receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo (Bar-Peled et al., 1991).

2.3.4.4 Acetilcolina

Como se ha mencionado anteriormente, los cerebros de las personas con SD presentan degeneración de neuronas colinérgicas, probablemente relacionadas con la aparición de patología tipo EA. Pero, además, ya desde etapas fetales, el sistema colinérgico de los cerebros SD está afectada (Whittle et al., 2007) y, en adultos, la actividad de la colinacetiltransferasa (ChAT) está reducida (Godridge et al., 1987; Risser et al., 1997).

A pesar de que el número de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (BFCNs) es normal en los ratones Ts65Dn jóvenes, esta población neuronal degenera con la edad de manera similar a lo encontrado en el SD (Granholm et al., 2000; Cooper et al., 2001; Hunter et al., 2003; Hunter et al., 2004). Sin embargo, la actividad de ChAT está incrementada en la corteza y el hipocampo de los ratones de 10 meses, lo que parece que sucede en un intento de compensar la reducción del número de neuronas colinérgicas (Contestabile et al., 2008; Cooper et al., 2001; Chen et al., 2009; Contestabile et al., 2006).

2.3.4.5 Noradrenalina

Los niveles de noradrenalina (NA) son normales en los fetos con SD (Whittle et al., 2007) pero están reducidos en los cerebros SD adultos, probablemente como consecuencia de la degeneración del *locus coeruleus* (Mann et al., 1985; Coyle et al., 1986). La NA juega un papel importante en la neurogénesis, puesto que la proliferación neuronal aumenta o disminuye tras el incremento o la reducción de la transmisión noradrenérgica, respectivamente (Duman et al., 2001). Por tanto, la alteración de la transmisión NA en este trastorno trisómico puede tener un importante papel en el deterioro de la neurogénesis que presentan los individuos adultos con esta patología. Además, se ha demostrado una relación entre las aferencias noradrenérgicas del *locus coeruleus* a las neuronas del hipocampo y el aprendizaje contextual (Murchison et al., 2004). Este proceso cognitivo dependiente del hipocampo está deteriorado en los individuos con SD (Nadel, 2003) y en los ratones Ts65Dn (Saleh et al., 2009).

Los ratones TS65Dn muestran, al igual que las personas con SD, una degeneración del *locus coeruleus* que, en su caso, comienza a los 6 meses de edad (Saleh et al., 2009). Aunque estos animales no muestran cambios en el número de adrenoreceptores- β en la corteza o en el hipocampo, su función está alterada (Dierssen et al., 1997).

2.3.4.6 Neurotrofinas

Está bien documentado el papel de las neurotrofinas (NT) en la supervivencia neuronal, migración, diferenciación y plasticidad sináptica (Chao et al., 2006; Sofroniew et al., 2001; Campenot y MacInnis, 2004). Consecuentemente, alteraciones en su expresión podrían dar lugar a alteraciones en diferentes aspectos del neurodesarrollo.

Los fetos con SD presentan una expresión reducida del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo y la corteza (Guedj et al., 2009; Toiber et al., 2010). Además, en esta última estructura, los fetos con SD también muestran una menor densidad del receptor de BDNF tirosin-kinasa-B (TrkB) (Toiber et al., 2010).

Los ratones Ts65Dn jóvenes y adultos muestran, al igual que las personas con SD, una reducción en los niveles de BDNF en el hipocampo y en la corteza frontal (Bianchi et al., 2010; Fukuda et al., 2010).

Los niveles de la neurotrofina-3 (NT-3) están incrementados en el hipocampo de los ratones TS65Dn recién nacidos y adultos (Pollonini et al., 2008), posiblemente en un intento de compensar la pérdida neuronal que se aprecia en estos roedores.

Por último, el factor de crecimiento nervioso (NGF) se genera en el hipocampo y es transportado retrógradamente al soma de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Sofroniew et al., 2001). Los niveles de NGF están reducidos en el hipocampo de los ratones Ts65Dn jóvenes (Salehi et al., 2006) y el transporte retrógrado de NGF al prosencéfalo basal está obstaculizado en los ratones adultos. La administración de NGF a estos ratones permite normalizar el tamaño y número de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Salehi et al., 2006; Cooper et al., 2001).

2.3.5 Neurodegeneración

En etapas más avanzadas de la vida de las personas con SD tienen lugar numerosos procesos neurodegenerativos que deterioran aún más las habilidades cognitivas de estos individuos. Entre estos mecanismos los más relevantes son la atrofia de algunas estructuras, como el hipocampo, amígdala, cuerpo calloso, cortezas frontal y occipital, la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la aparición de los hitos histopatológicos característicos de la EA.

2.3.5.1 Neuroinflamación

El SD y la EA se caracterizan por un incremento en la neuroinflamación debido a la sobreactivación de la microglía y al incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias. Se ha demostrado el papel de estos procesos en la degeneración temprana del cerebro SD (Griffin et al., 1989; Wenk et al., 2000). Además, en el ratón Ts65Dn la activación de la microglía parece jugar un papel en la pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Kim y Suh, 2009).

2.3.5.2 Estrés oxidativo

Tanto en los individuos con SD como en los ratones Ts65Dn, el gen *SOD1/Sod1* (Cu/Zn-superóxido dismutasa-1) que codifica un enzima que transforma los radicales de oxígeno en peróxido de hidrógeno, está triplicado. En ambas condiciones trisómicas la sobreproducción del peróxido de hidrógeno da lugar a un gran incremento de la producción de radicales libres de oxígeno reactivos. Éstos dañan las membranas celulares, incluyendo las membranas mitocondriales, y deterioran los lípidos, proteínas y ADN mitocondrial. Este conjunto de alteraciones se denomina estrés oxidativo. Existen numerosas evidencias del incremento de la producción de superóxido mitocondrial en los individuos con SD (Capone et al., 2002; Jovanovic et al., 1998). Por lo tanto, en esta patología, algunas células están constantemente expuestas a estrés oxidativo, lo que produce daño mitocondrial, facilitando el envejecimiento y la muerte celular. Estos procesos tienen lugar durante toda la vida del individuo desde etapas prenatales. El incremento del estrés oxidativo en los estados fetales puede modificar procesos como la neurogénesis, diferenciación, migración y conexión de redes, así como la supervivencia celular (Capone et al., 2002; Busciglio y Yankner, 1995; Kim et al., 2000; Pelsman et al., 2003).

2.3.5.3 Enfermedad de Alzheimer (EA)

Las características histopatológicas más típicas de la EA son la presencia de placas neuríticas extracelulares de péptidos β -amiloides y los ovillos neurofibrilares intracelulares de proteína tau hiperfosforilada (Mucke, 2009). El 100 % de los individuos con SD presentan estos hitos histopatológicos antes de los 40 años de edad. Dado que uno de los genes que está triplicado en el SD es el que codifica la proteína precursora del β -amiloide (APP), se ha propuesto que la sobreexpresión de este gen podría ser responsable del incremento de la producción de β -amiloide y de la degeneración de las neuronas colinérgicas.

Los ratones Ts65Dn, que también tienen triplicado el gen *App*, presentan una elevación a partir de los 6 meses, de la expresión de la proteína App (Seo y Isacson, 2005) y de los péptidos β -amiloides en el hipocampo y en la corteza cerebral (Netzer et al., 2010). En estos ratones se ha demostrado que la sobreexpresión de App tiene un importante papel en la degeneración de neuronas colinérgicas y noradrenérgicas que proporcionan aferencias moduladoras al

hipocampo (Millan et al., 2012). Estas desaferencias comprometen la función del hipocampo, estructura fundamental en numerosos procesos de aprendizaje y memoria, y podrían ser responsables del deterioro de funciones cognitivas en la condición trisómica en edades avanzadas.

2.4 APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS PARA PALIAR EL DETERIORO COGNITIVO EN EL SD

Actualmente no hay ningún tratamiento disponible para tratar el deterioro cognitivo o la demencia tipo Alzheimer que presentan los individuos con esta patología. Sin embargo, durante los últimos años, se han obtenido resultados muy prometedores en los estudios realizados en el ratón Ts65Dn.

El ratón es el modelo animal de elección para la evaluación preclínica de la eficacia de un fármaco. Como se ha comentado en apartados anteriores, a pesar de que el ratón Ts65Dn no es un modelo ideal, ha resultado extremadamente valioso para el estudio de las bases etiopatológicas de varios fenotipos similares a los que presentan los humanos. En concreto, en este modelo animal están muy bien documentados los déficits en tareas de aprendizaje/memoria que requieren una buena actividad del hipocampo, incluyendo diferentes pruebas como las del laberinto de agua de Morris, de reconocimiento de objetos y de condicionamiento del miedo (Rueda et al., 2012; Roubertoux y Carlier, 2010).

Durante los últimos años, diferentes estudios han demostrado que es posible paliar farmacológicamente los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn. Hasta la fecha, más de 20 fármacos y pequeñas moléculas han rescatado exitosamente los déficits cognitivos dependientes del hipocampo del ratón Ts65Dn. Gracias a estos estudios se han llevado a cabo varios ensayos clínicos y otros están actualmente en progreso. El entusiasmo por estos ensayos es alto: fármacos que puedan mejorar la función cognitiva, por ejemplo, incrementando el cociente intelectual en 10-20 puntos, supondría una mejoría enorme en la calidad de vida de los individuos con SD. Permitiría que estas personas pudieran participar en la sociedad más activa e independientemente (Gardiner, 2015).

En esta revisión, se describirá el efecto de 29 fármacos cuya eficacia se ha evaluado en el ratón Ts65Dn. También se expondrá el actual estado de los ensayos clínicos sobre el efecto de distintos fármacos en la cognición de las personas SD y las características del Ts65Dn que pueden limitar su valor predictivo en el contexto de evaluaciones preclínicas.

2.4.1 Ts65Dn y la evaluación preclínica de la eficacia de fármacos:

Al igual que para otros modelos murinos de diferentes enfermedades, no existe un estándar para la evaluación de la eficacia farmacológica en el ratón Ts65Dn. La mayoría de los estudios analiza los efectos de los diferentes fármacos sobre la cognición en al menos una prueba y, en muchos casos, sobre la neurogénesis del adulto, la LTP, y la degeneración dependiente de la edad de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y/o las noradrenérgicas del *locus coeruleus*.

Los resultados de estos ensayos se han obtenido usando protocolos que varían en diferentes aspectos (sexo, edad, tratamiento agudo o crónico, métodos de administración del fármaco). Además, algunos estudios no incluyen los análisis estadísticos adecuados. En conjunto, todas estas variaciones hacen que comparar los estudios resulte complicado.

Los fármacos se exponen en el orden cronológico de realización del estudio. La mayoría de estos fármacos tienen dianas terapéuticas muy diferentes. Solamente tres de ellos (memantina, epigallocatechin-3-gallate [EGCG] y etosuximida) tienen una relación directa conocida con la sobreexpresión de uno o más genes codificados por el Hsa21 (Gardiner, 2015).

En el Anexo I se resumen los efectos de todos los fármacos evaluados sobre las alteraciones cognitivas, de neurogénesis o de la LTP de los ratones Ts65Dn. Así mismo, se explica brevemente las condiciones del estudio y las conclusiones que se obtuvieron.

En los siguientes apartados se amplía la información sobre estos tratamientos expuestos en el Anexo I

2.4.2 Tratamiento farmacológico exitoso en ratones Ts65Dn

2.4.2.1 Estrógenos y minociclina

La primera demostración de mejoría cognitiva tras un tratamiento farmacológico a ratones Ts65Dn tuvo lugar hace 15 años (Granholm et al., 2002). En este estudio se decidió probar la eficacia de los estrógenos basándose en la observación de la aparición de menopausia prematura e inicio temprano de deterioro cognitivo en mujeres con SD. El estudio se realizó en ratones Ts65Dn hembra adultas (11-14 meses), cuyas habilidades cognitivas se evaluaron en el laberinto de agua en T, una prueba dependiente de la adecuada función del hipocampo. La administración de estrógenos mejoró el aprendizaje de las hembras trisómicas, sin llegar normalizarlo completamente. Así mismo, este tratamiento evitó la pérdida de neuronas colinérgicas y la reducción de los niveles de NGF. Sin embargo, en los machos Ts65Dn la administración de estrógenos no produjo ningún beneficio funcional o neuromorfológico (Hunter et al., 2004).

Por otro lado, la minociclina es un antibiótico que tiene efectos neuroprotectores por su capacidad para modular la actividad de la interleukina 1 β (proinflamatoria) y de inhibir las caspasas (proapoptóticas) (Plane, Shen, Pleasure, & Deng, 2010). En este estudio se trató a ratones Ts65Dn adultos (10 meses) con minociclina y se observó una mejoría en su aprendizaje espacial en el laberinto radial acuático. Pero, al igual que ocurría tras la administración de estrógenos, la minociclina no normalizó el aprendizaje de los ratones Ts65Dn aunque sí evitó la pérdida de neuronas colinérgicas (Hunter et al., 2004).

2.4.2.2 Antagonistas del receptor GABA_A

Varios estudios han demostrado anomalías electrofisiológicas en la capacidad para producir LTP en los ratones Ts65Dn (Siarey et al., 1999; Kleschevnikov et al., 2004; Costa y Grybko, 2005) que, como se detalló en apartados anteriores, es debido al desequilibrio entre neurotransmisión excitadora e inhibidora. Dado que la LTP es la base electrofisiológica del aprendizaje, se propuso que la sobreinhibición encontrada en el ratón TS65Dn podría ser responsable de sus déficits cognitivos. Basándose en estas observaciones, se probó la eficacia

de los antagonistas del receptor GABA_A: picrotoxina, bilobalida y pentilenetrazol (PTZ). Se sometió a ratones Ts65Dn de 3-4 meses de edad a la prueba de reconocimiento de un objeto nuevo (NOR) y al laberinto en T (Fernandez et al., 2007). El tratamiento crónico con los tres fármacos normalizó el aprendizaje y memoria de los ratones Ts65Dn en la prueba del NOR y la administración de PTZ también recuperó las habilidades cognitivas de estos animales en la prueba del laberinto en T. Además, estos efectos beneficiosos seguían presentes hasta dos meses después de finalizar el tratamiento.

Sin embargo, la propuesta del PTZ para ensayos clínicos en el SD ha sido controvertida porque es un conocido agente convulsionante (Wetmore y Garner, 2010) y actualmente no está aprobado por la FDA (US Food Drug Administration).

Para evitar los efectos adversos del antagonismo del receptor GABA_A (incremento de la posibilidad de sufrir convulsiones y aumento de la ansiedad) en personas con SD, se comenzó a estudiar otros fármacos que modulaban negativamente la actividad de este receptor de manera más específicas. Los receptores GABA_A tienen una gran heterogeneidad, tanto de composición (19 subunidades) como de función (Deidda et al., 2014). Numerosos estudios han relacionado la activación de la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A con sus efectos sobre la cognición (Collinson et al., 2002). Además, la subunidad $\alpha 5$ está altamente expresada en el hipocampo pero menos comúnmente en otras regiones del cerebro (Sur et al., 1998). Basándose en estos datos, se llevaron a cabo varios estudios con moduladores alostéricos negativos (NAM) selectivos para la subunidad $\alpha 5$ del receptor GABA_A. El tratamiento crónico con estos compuestos ($\alpha 5$ IA y RO4938581) mejoró el aprendizaje de los ratones trisómicos en distintas pruebas de aprendizaje espacial (Braudeau et al., 2011; Martínez-Cué et al., 2013). Además, los ratones Ts65Dn tratados con RO4938581 mostraron una neurogénesis y una LTP completamente normal (Martínez-Cué et al., 2013). Ninguno de los dos tratamientos produjo convulsiones o incrementó la ansiedad de los animales.

2.4.2.3 Memantina, un antagonista del receptor NMDA

La memantina es un antagonista no competitivo del receptor NMDA, que es capaz de recuperar el aprendizaje y la memoria en modelos murinos de EA y de derrame cerebral (Lipton, 2007). Actualmente está aprobada por la FDA para el uso en la EA moderada o severa. El mecanismo de acción de la memantina está relacionado con al menos 9 proteínas codificadas por el Hsa21 (Lieberman y Mody, 1994) que interactúan directa o indirectamente con el receptor NMDA. Entre ellas se encuentran el regulador de CaN, RCAN1 (Siddiqui et al., 2008).

Costa et al. (2008) demostraron que una única administración de memantina paliaba los déficits cognitivos de los ratones Ts65Dn en la prueba de condicionamiento del miedo (CFC). El tratamiento crónico con memantina también mejoró la ejecución de estos animales en una prueba de aprendizaje espacial (Rueda et al., 2010)in embargo, al contrario que los antagonistas del GABA_A, la memantina no produce efectos beneficiosos a largo plazo.

2.4.2.4 Fluoxetina

En roedores el tratamiento con varios antidepresivos y en especial con el inhibidor de la recaptación de la serotonina, fluoxetina, estimula la producción de nuevas neuronas y su incorporación en las redes de trabajo (Malberg et al., 2000). La administración de fluoxetina a

ratones Ts65Dn incrementó su neurogénesis (Clark et al., 2006). Además, el tratamiento con este fármaco a ratones trisómicos recién nacidos consiguió normalizar los niveles del receptor de serotonina 5HT_{2A}, y de la neurotrofina BDNF (Bianchi et al., 2010).

Adicionalmente, se ha demostrado que la fluoxetina produce una disminución de la inhibición GABAérgica (Vetencourt et al., 2008; Choi et al., 2010; Caiati y Cherubini, 2013). Sin embargo, Heinen et al. (2012) trataron a ratones Ts65Dn de 5-7 meses de edad con fluoxetina durante un total de 6 semanas. Los ratones tratados no mostraron mejoría en el laberinto acuático de Morris y no presentaron cambios en la densidad de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. Los autores reportaron un gran número de convulsiones y muertes (3/9 y 4/9 respectivamente) en los animales tratados con fluoxetina. Estos resultados chocaban con los estudios realizados hasta ese momento (Clark et al., 2006; Bianchi et al., 2010). Otros estudios (Begenisic et al., 2014) confirmaron los resultados negativos observados en el último. Las razones más probables de estos resultados negativos son que en estos estudios se administró una dosis de fluoxetina de mayor concentración durante mucho más tiempo.

Se han seguido realizando estudios con fluoxetina a dosis menores en ratones Ts65Dn, que aparecen registradas en el Anexo I y que han mostrado resultados favorables.

2.4.2.5 Inhibidores de la acetilcolinesterasa

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son un grupo de fármacos utilizados en el tratamiento de la EA, que aumentan la actividad del sistema colinérgico y por tanto reducen los déficits funcionales asociados a la pérdida de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal.

La administración de fisostigmina a ratones Ts65Dn no consiguió paliar sus déficits cognitivos pero, a los 4 meses de edad, produjo un ligero aumento en los niveles de acetilcolinesterasa (Chang y Gold, 2008).

Por otro lado, el inhibidor de la acetilcolinesterasa donepezilo ha mostrado efectos positivos mínimos en pequeños ensayos clínicos con niños y adultos con SD (Heller et al., 2004). El tratamiento crónico con este fármaco no recuperó las alteraciones en aprendizaje espacial del ratón Ts65Dn en la prueba del laberinto acuático de Morris (Rueda et al., 2008). Sin embargo, dado que el donepezilo en modelos animales de EA tiene un efecto dosis dependiente es posible que en este estudio no se utilizara la dosis adecuada para producir beneficios.

Por último, el tratamiento con galantamina a ratones trisómicos adultos consiguió revertir sus déficits cognitivos (De Souza et al., 2011).

2.4.2.6 Agonistas del receptor β -adrenérgico

Los niveles del precursor de monoaminas, tirosina hidroxilasa (TH) y de marcadores de neuronas noradrenérgicas (NA) en el *locus coeruleus* (LC) de los ratones Ts65Dn son normales a los 3 meses de edad, pero disminuyen, al igual que ocurre con los marcadores de neuronas colinérgicas, cuando los ratones alcanzan los 6 meses (Salehi et al., 2009; Lockrow et al., 2011). Además, estos ratones son más sensibles a una neurotoxina noradrenérgica (Lockrow et al., 2011). Estos resultados indican que en los ratones Ts65Dn también hay una degeneración dependiente de la edad de las neuronas noradrenérgicas (NA). La disminución de la influencia noradrenérgica al hipocampo podría contribuir al deterioro observado en las pruebas de

aprendizaje dependientes del hipocampo. Para evaluar el efecto del incremento de la actividad noradrenérgica sobre la cognición de los ratones Ts65Dn se les administró un precursor de la NA, L-DOPS, o el agonista parcial del receptor β 1-adrenérgico, xamoterol. Ambos fármacos normalizaron el aprendizaje y memoria de asociación de estímulos de los ratones Ts65Dn en la prueba de condicionamiento de miedo (Salehi et al., 2009; Faizi et al., 2011).

Por otro lado, la administración del agonista β 2-adrenérgico, formoterol, mejora parcialmente este tipo de aprendizaje (Dang et al., 2014).

2.4.2.7 Litio

El litio es un tratamiento habitual para los desórdenes anímicos que se ha usado desde 1970. Mientras que los mecanismos moleculares por los que estabiliza el ánimo no se conocen con detalle, sí se sabe que el litio actúa en parte inhibiendo la actividad de GS3K β y modulando la señalización de las vías Wnt/ β -catenina. Así mismo, inhibe la actividad de las inositol fosfatasas. La capacidad del litio para competir con el Mg⁺⁺ en la unión de proteínas implica que pueda tener un amplio rango de efectos. El litio tiene propiedades neuroprotectoras e incrementa la neurogénesis en ratones normales (Pasquali et al., 2010; Wada, 2009).

La administración de litio durante un mes a hembras adultas y a machos Ts65Dn jóvenes normalizó su neurogénesis (Bianchi et al., 2010). Además, en el caso del tratamiento a ratones Ts65Dn jóvenes, este tratamiento también normalizó su LTP, los niveles de β -catenina fosforilada y mejoró la cognición en las pruebas de condicionamiento de miedo y de reconocimiento de objetos pero no en la del laberinto en T (Contestabile et al., 2013).

2.4.2.8 Melatonina

Es bien conocido el papel de la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) en la regulación de los ciclos circadianos, en concreto en relación con los patrones de sueño (Singh y Jadhav, 2014; Wade et al., 2014). Estudios recientes en modelos animales de EA han demostrado que la melatonina tiene muchos efectos beneficiosos como antioxidante, antiapoptótico, anti-inflamatorio y ofrece protección frente a la degeneración y el deterioro cognitivo (Singh y Jadhav, 2014).

El tratamiento crónico con melatonina a ratones Ts65Dn de avanzada edad mejoró su aprendizaje espacial, LTP y neurogénesis hipocampal (Corrales et al., 2013; Corrales et al., 2014).

2.4.2.9 Sonic hedgehog

En 2006 Roper et al. demostraron que una única administración a los 6 días del nacimiento del agonista de Sonic Hedgehog, SAG 1.1, normaliza completamente el número de células de la capa de células granulares del cerebelo de los ratones Ts65Dn. Además, la administración de SAG 1.1 a ratones Ts65Dn el día del nacimiento o a los 4 meses de edad también corrige este déficit en densidad celular, mejora la LTP hipocampal y el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Das et al., 2013).

2.4.2.10 Epigallocatequina-3-galato (EGCG)

La epigallocatequina-3-galato (EGCG) es una catequina que se encuentra en el té verde. La EGCG es un inhibidor altamente específico para dos kinasas codificadas por Hsa21, DYRK1A y MAPKAPK5, inhibiendo su actividad en un 90 % (Bain et al., 2003). Además, también inhibe otras kinasas aunque en menor medida. Los primeros estudios en modelos de SD demostraron que la preincubación con EGCG normaliza la LTP en rodajas de hipocampo de ratones Ts65Dn (Xie et al., 2008). Más recientemente se ha demostrado que la administración crónica de EGCG a ratones Ts65Dn de 3 meses normaliza su aprendizaje espacial (De la Torre et al., 2014).

Los beneficios del EGCG no sólo se limitan a la inhibición de la actividad de DYRK1A, sino que también es un potente antioxidante y agente antitumoral (Singh et al., 2011; Patra et al., 2008). El efecto de la administración de EGCG se ha estudiado en muchas otras enfermedades como la obesidad, diferentes tipos de tumores, la enfermedad de Huntington, el síndrome de la X-frágil y la EA, dando lugar a varios ensayos clínicos (<https://clinicaltrials.gov/>).

2.4.2.11 Antioxidantes

Como ya se ha descrito en apartados anteriores, los niveles de especies reactivas de oxígeno se encuentran aumentados en los cerebros con SD, por lo que el uso de antioxidantes podría ser una buena estrategia terapéutica. Los ratones Ts65Dn muestran al igual que los individuos con SD, un incremento del estrés oxidativo. La administración a estos ratones de una dieta elevada en vitamina E desde los 4 meses hasta los 8-10 meses reduce el estrés oxidativo, mejora el aprendizaje espacial y previene la pérdida de TRKA en las neuronas colinérgicas (Lockrow et al., 2009).

En otro estudio la administración a hembras Ts65Dn embarazadas y a su descendencia con una dieta enriquecida en vitamina E mejoró su aprendizaje espacial aunque no llegó a normalizarlo completamente (Shichiri et al., 2011).

2.4.2.12 Inhibición de la producción A β

Como se describió anteriormente, la sobreexpresión del gen *APP/App* en individuos con SD y en el ratón Ts65Dn produce un incremento en los niveles de esta proteína y de los péptidos amiloides, procesos implicados en la aparición de la histopatología tipo EA. La administración de un inhibidor de β -secretasas redujo el nivel de fragmentos β -amiloides y mejoró la ejecución en el laberinto acuático de Morris sin modificar los niveles de APP de los ratones Ts65Dn (Netzer et al., 2010).

2.4.2.13 Neuropéptidos

Los péptidos NAP y SAL derivados de los factores neurotróficos ADPN y ADNF han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* proteger de la toxicidad inducida por los péptidos β -amiloides, por la hiperfosforilación tau y por la exposición fetal a alcohol (Shiryaev et al., 2011). La administración de ambos péptidos a ratones Ts65Dn adultos durante 9 días normalizó el aprendizaje y memoria espacial de estos animales en el laberinto acuático de Morris (Incerti et al., 2011), aunque ese efecto pro-cognitivo había desaparecido 10 días después de terminar el tratamiento. En un segundo grupo de experimentos se trató a hembras de Ts65Dn embarazadas con NAP/SAL diariamente desde el día embrionario 8 hasta el 12 y se evaluó su

efecto sobre la descendencia a los 8-10 meses de edad. Estos animales mostraron una mejoría en sus habilidades cognitivas, aunque éstas no llegaron a normalizarse completamente (Incerti et al., 2012).

Por otro lado, la administración del péptido 6, que deriva del factor neurotrófico ciliar, ha demostrado mejorar la neurogénesis en distintos modelos animales (Chohan et al., 2011; Blanchard et al., 2011).

2.4.2.14 Colina

Existen considerables evidencias de que la suplementación con colina puede suponer un beneficio a largo plazo en distintos procesos cognitivos (McCann et al., 2006), así como en la neurogénesis adulta (Glenn et al., 2007). Dada la pérdida de neuronas colinérgicas en los ratones Ts65Dn y en el cerebro de los individuos con SD se examinaron los efectos de una dieta enriquecida con colina tanto durante el periodo prenatal como el perinatal en ratones Ts65Dn. Ambas dietas rescataron el aprendizaje espacial, mejoraron la neurogénesis, sin llegar a normalizarla, e incrementaron los marcadores de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal en los ratones Ts65Dn (Moon et al., 2010; Velazquez et al., 2013; Ash et al., 2014).

2.4.2.15 Antagonistas del receptor GABA_B

Las corrientes de K⁺ inducidas por el receptor GABA_B están incrementadas en el ratón Ts65Dn (Best et al., 2012; Best et al., 2007), lo que contribuye a la sobre-inhibición encontrada en estos ratones. La administración de CGP55845, un antagonista del receptor GABA_B, normalizó totalmente las habilidades cognitivas de los ratones Ts65Dn en la prueba de reconocimiento de objetos pero no en la del laberinto en T (Kleschevnikov et al., 2012).

2.4.3 Tratamientos fallidos en Ts65Dn

En este apartado se describirán los efectos de distintos fármacos que no produjeron beneficios sobre las habilidades cognitivas de los ratones Ts65Dn.

2.4.3.1 Análogo cíclico de GABA: piracetam

A pesar de que el piracetam fue considerado durante años un fármaco nootrópico, varios estudios clínicos en humanos han demostrado que no mejora la cognición (Malykh y Sadaie, 2010). Así mismo, la administración de piracetam a ratones Ts65Dn no mejoró su aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (Moran et al., 2002).

Por otro lado, el SGS-111, un análogo del piracetam ha mostrado tener propiedades antioxidantes y prevenir la apoptosis en cultivos de neuronas de la corteza cerebral de fetos con SD (Pelsman et al., 2003). Sin embargo, su administración *in vivo* a ratones Ts65Dn desde la gestación hasta la edad adulta no ejerció ningún beneficio sobre el aprendizaje espacial de estos animales (Rueda et al., 2008).

2.4.3.2 Etosuximida

El gen KCNJ6, localizado en el Hsa21, codifica el canal GIRK2 y, por tanto, podría tener un papel en la sobreinhibición mediada por los receptores GABA_B encontrada en el ratón Ts65Dn

(Cramer et al., 2010). La etosuximida es un antiepiléptico que actúa como inhibidor de la actividad de varios canales GIRK, incluyendo el GIRK2. Para evaluar si el bloqueo de este canal y, por tanto, la reducción de la inhibición, conseguía revertir los déficits cognitivos del ratón Ts65Dn se administró etosuximida a estos animales. El tratamiento con este antiepiléptico no mejoró el aprendizaje de los ratones trisómicos en el laberinto acuático de Morris o en la prueba de condicionamiento de miedo (Vidal et al., 2012). Dada la diversidad de funciones que tienen los genes del Hsa21, no es sorprendente observar que la normalización de tan sólo uno de los genes de este cromosoma, en un contexto de sobreexpresión de muchos más genes, no llegue a mostrar beneficio alguno sobre el aprendizaje.

2.4.3.3 Antagonista específico de la subunidad 2B de receptor NMDA: RO256981

Basándose en la elevada actividad del receptor NMDA en los ratones Ts65Dn, se llevaron a cabo estudios con antagonistas específicos de este receptor, en particular con RO256971. La administración de este compuesto no mejoró las habilidades cognitivas de los ratones trisómicos en el laberinto en Y y las deterioró en el laberinto de Barnes (Hanson et al., 2013).

2.5 ESTADO ACTUAL DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS PARA MEJORAR EL DÉFICIT COGNITIVO EN EL SD

Recientemente se han completado o están en progreso varios ensayos clínicos para evaluar el efecto de distintos fármacos, que probaron ser beneficiosos en estudios preclínicos, sobre el déficit cognitivo del SD. Estos ensayos son complicados, los resultados que se obtienen son complejos y no están estandarizados. Además, mejoras en una prueba específica se pueden no traducir directamente en beneficios en distintos aspectos de la calidad de vida como la confianza, la independencia, o la satisfacción laboral (Gardiner, 2015).

Basándose en las anomalías en los niveles de acetilcolinesterasa que presentan los cerebros de los individuos con SD, algunos pequeños ensayos clínicos (con menos de 10 participantes) han evaluado los efectos de los inhibidores de la acetilcolinesterasa donepezilo y rivastigmina. Aunque estos fármacos produjeron algunos resultados positivos, en general estos tratamientos se han considerado inefectivos y los ensayos no han continuado (Kishnani et al., 2010; Johnson et al., 2003; Heller et al., 2010).

Dado que siete genes del Hsa21 están implicados en el metabolismo del ácido fólico o su sobreexpresión da lugar a alteraciones en las concentraciones de los componentes de las vías del folato, se realizó un ensayo clínico para probar la eficacia de los suplementos de folato en niños con SD de entre 3-30 meses de edad. La administración de leucovorina (un derivado del ácido fólico) diariamente durante 12 meses produjo un incremento del desarrollo general de estos niños. Aunque la administración de folato produjo pocos efectos, sus beneficios fueron mayores en niños que estaban recibiendo tiroxina como tratamiento para el hipotiroidismo (Blehaut et al., 2010). Solamente 2 de los 7 genes que afectan al metabolismo del folato en el SD están triplicados en los ratones Ts65Dn, haciendo que estos animales no sean adecuados para las evaluaciones preclínicas de la suplementación con folatos. La conexión del Hsa21 con la hormona tiroidea puede implicar al gen *NR1P1*, que tampoco está en trisomía en los ratones Ts65Dn (Hanney et al., 2012). Actualmente se encuentra en progreso un ensayo más grande con folato y tiroxina.

(ver:

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00294593?term=Down+syndrome+and+cognitive+deficits&rank=10>).

Otros ensayos están basados, al menos en parte, en resultados positivos de estudios preclínicos realizados en ratones Ts65Dn. Entre ellos, basándose en los beneficios obtenidos tras la administración de antioxidantes en estos ratones se diseñó un ensayo de 2 años que evaluó los efectos del consumo diario de antioxidantes (900 UI de alfa-tocoferol, 200 mg de ácido ascórbico y 600 mg de ácido alfa-lipoico) en 53 personas con SD y demencia. Se concluyó que la suplementación con antioxidantes es segura, aunque ineficaz como tratamiento para la demencia en individuos con SD y demencia tipo EA (Lott et al., 2011).

Por otro lado, los beneficios demostrados en la cognición del ratón Ts65Dn tras la administración de memantina y el hecho de que actualmente se use este fármaco para el tratamiento de la demencia tipo EA en la población normal propició el desarrollo de un estudio en la población SD. En este ensayo, randomizado y de doble ciego, se evaluó el efecto del tratamiento con memantina en adultos con SD (>40 años). Durante 52 semanas 88 pacientes recibieron memantina y 85 recibieron placebo. No se observaron resultados significativamente diferentes entre los dos grupos, ya que ambos grupos empeoraron en términos de nivel cognitivo y función. No puede ignorarse que en este grupo de edad, la neurodegeneración ya estaba demasiado avanzada como para que el tratamiento con antioxidantes o memantina pudieran provocar algún beneficio (Hanney et al., 2012).

En ensayo randomizado, más pequeño, se evaluó el efecto de la administración de memantina o placebo durante 16 semanas a 20 adultos jóvenes con SD (18-32 años). En un primer análisis no se observó ninguna diferencia en cuanto a memoria espacial y episódica entre el grupo que recibía el tratamiento y el del placebo. Sin embargo, un análisis más detallado de los resultados desveló una pequeña mejoría en la memoria de los pacientes tratados con memantina (Boada et al., 2012).

En cuanto al inhibidor de la quinasa DYRK1A, EGCG, primero se realizó un pequeño ensayo en el que 15 participantes con SD de entre 14 y 29 años recibieron este compuesto o placebo durante 3 meses. Las personas que recibieron EGCG mostraron una mejoría significativa en las pruebas de memoria visual (De la Torre et al., 2014). En un segundo ensayo de fase II realizado entre 2012 y 2014 se incluyeron 84 pacientes con SD que fueron tratados durante 12 meses (43 en el grupo de EGCG y 41 en el grupo placebo, ambos con entrenamiento cognitivo adyacente). El grupo tratado con EGCG mostró una mejoría significativa en las pruebas de memoria visual, control inhibitorio y comportamiento adaptativo (De la Torre et al., 2016).

Entre los ensayos clínicos que se han terminado recientemente se incluye un ensayo en fase II con el modulador alostérico negativo selectivo para la subunidad $\alpha 5$ GABA_A, RG1662 (Hoffman-la Roche Ltd., Basel, Suiza), un compuesto similar a los que habían demostrado efectos procognitivos en el ratón Ts65Dn. Este fue un ensayo internacional realizado simultáneamente en Estados Unidos, Francia, Italia y España en el que no se demostraron efectos pro-cognitivos de este compuesto en la población SD estudiada. (ver: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Down+syndrome+RG1662&Search=Search>),

En la actualidad, existen tres ensayos clínicos activos en procesos de reclutamiento de pacientes:

1. Tratamiento del deterioro cognitivo del Síndrome Down con nicotina (Nicotine Treatment of Cognitive Decline in Down Syndrome)

Este ensayo comenzó en abril de 2013 y se estimó que la fecha final del estudio sería en junio de 2016. Es un estudio intervencional, con la asignación de un solo grupo, sin enmascaramiento. El procedimiento se basa en administrar parches de nicotina a personas con SD durante un total de 28 días. Todos los participantes en el estudio comenzaron con el parche de 7 mg, variando desde 2h/día hasta un total de 16h/día durante los primeros 7 días (basándose en la tolerancia individual). Del día 7 al 28 del estudio, los participantes se aplicaron un nuevo parche diariamente. Los investigadores evalúan los cambios diarios producidos por el tratamiento con nicotina a través de marcadores electrofisiológicos del estado cognitivo, así como marcadores clínicos, biológicos y cognitivos de genes como la apolipoproteína E (APOE)/CYP2A6 y medidas conductuales. El objetivo de este estudio es determinar si la nicotina es segura y tolerada por pacientes con SD y buscar evidencias de mejorías en el funcionamiento cognitivo, así como establecer pruebas de correlaciones biológicas y conductuales de los efectos de la estimulación con nicotina en estos pacientes.

(Ver: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01778946>)

2. Estudio longitudinal de fenotipaje clínico y con biomarcadores en el Centro Rocky Mountain de la enfermedad de Alzheimer (Rocky Mountain Alzheimer's Disease Center Longitudinal Biomarker and Clinical Phenotyping Study)

Se trata de un estudio observacional prospectivo que pretende reclutar 800 personas con SD, EA, y Deterioro Cognitivo Leve (DCL), controles sanos y padres de personas con SD a las que se les haría un seguimiento durante aproximadamente 15 años o hasta su muerte. El estudio comenzó en febrero de 2016 y tiene como fecha estimada de final de recogida de datos diciembre de 2030. Este ensayo planea crear un gran banco de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, pruebas de neuroimagen y datos clínicos que se usarán para diferentes estudios sobre las causas de la EA, el SD, así como otros trastornos que cursen con alteraciones cognitivas.

(Ver: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02612376>)

3. Seguridad, tolerancia e inmunogenicidad de la vacuna ACI-24 en adultos con SD (Safety, Tolerability and Immunogenicity of ACI-24 Vaccine in Adults With Down Syndrome)

Se trata de un estudio multicéntrico prospectivo, controlado con placebo, doble ciego y randomizado sobre el efecto de la administración durante 24 meses de la vacuna ACI-24. Esta vacuna genera anticuerpos contra los péptidos β -amiloides agregados sin que se produzca la respuesta pro-inflamatoria de las células T. Todos los sujetos recibirán el medicamento del estudio (ACI-24 o placebo) 7 veces a través de inyecciones s.c. (12 meses) y se hará un seguimiento durante 12 meses después de la última dosis con una evaluación final de seguridad y eficacia. Este estudio comenzó en marzo de 2016 y tiene una fecha estimada de fin de recogida de datos de agosto de 2019.

(Ver: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02738450>)

Para más información sobre ensayos clínicos en la población SD ver:
https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Down+syndrome+and+cognitive+deficits&type=&rslt=&recr=&age_v=&gndr=&cond=&intr=&titles=&outc=&spons=&lead=&id=&state1=&cntry1=&state2=&cntry2=&state3=&cntry3=&locn=&rcv_s=&rcv_e=&lup_s=&lup_e

3 ESTANCIA EN EL LABORATORIO:

MATERIAL Y MÉTODOS

La segunda parte de este trabajo consistió en una estancia en el Laboratorio de Neuropsicobiología del Aprendizaje del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de Santander. Durante este tiempo se participó en el estudio pre-clínico de los efectos de distintos fármacos sobre los fenotipos cognitivo-conductuales y neuromorfológicos alterados en el ratón Ts65Dn.

A continuación se describirá la metodología utilizada para realizar tales experimentos.

Dado que se participó en distintos estudios en los que se valoraron fármacos de naturaleza diversa, no se describirán las características de estos compuestos, los protocolos de tratamiento o las vías de administración de cada fármaco.

3.1 ANIMALES

Se utilizaron ratones trisómicos parciales Ts65Dn (TS) y sus hermanos euploides (CO). Dado que los ratones TS y CO no son distinguibles mediante su aspecto externo, los animales fueron cariotipados para poder así conocer su carga genética. El ADN genómico necesario para el cariotipado de los animales se consiguió mediante la digestión de fragmentos de cola de ratón. Se genotiparon los ratones a las 6-8 semanas de edad mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el protocolo de Liu et al., (2003).

3.2 ESTUDIOS CONDUCTUALES

3.2.1 Estudios cognitivos

3.2.1.1 Aprendizaje espacial: laberinto acuático de Morris

La valoración del aprendizaje espacial se realizó utilizando el laberinto acuático de Morris, (Morris Water Maze, MWM) que consiste en un tanque metálico circular, lleno de agua teñida con leche. Dentro del tanque se colocó una plataforma.

El experimento constó de varias sesiones (Figura 2): 12 sesiones de adquisición, una sesión en la que se retira la plataforma y cuatro de aprendizaje guiado. Todos los ensayos fueron grabados por una cámara de vídeo. Las trayectorias de los ratones fueron analizadas mediante un programa de seguimiento automatizado, para obtener los siguientes datos: latencia de escape, distancia recorrida y velocidad de natación de cada animal y en cada ensayo.

- a) Sesiones de adquisición: en estas sesiones la plataforma permanece oculta, sumergida en el agua. Durante las 8 primeras sesiones la posición de la plataforma varió cada día entre cuatro posiciones posibles, este, suroeste, centro y noroeste (E, SO, centro, NO). En las sesiones 9 a 12 la plataforma permaneció en la misma posición. Al inicio de cada ensayo se introducía a cada ratón en el agua y se le permitía nadar hasta que alcanzara la plataforma o hasta un período máximo de 60 segundos.

- b) Sesión de retirada de la plataforma: en esta sesión se retiró la plataforma, se introdujo al ratón por la posición más alejada y se permitió a cada animal nadar por el tanque durante 60 segundos. En esta sesión se registró el tiempo que pasaba cada ratón en el cuadrante donde había estado la plataforma los 4 días anteriores, la distancia que recorría en ese cuadrante y el número de veces que cruzaba por encima del sitio exacto en el que había estado la plataforma.
- c) Sesiones de aprendizaje guiado: en estas 4 sesiones la plataforma era visible, su posición estaba indicada con una flecha. Se realizaron varios ensayos en los que el procedimiento experimental fue el mismo empleado en las sesiones de adquisición.

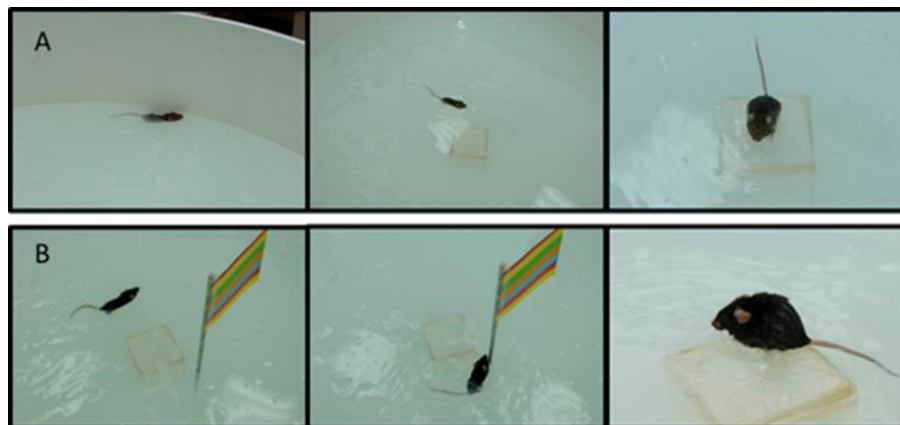


Figura 2: Prueba del laberinto acuático de Morris. (A) Secuencia de una sesión de adquisición en la que el animal nada hasta encontrar la plataforma. (B) Secuencia en una sesión de aprendizaje guiado en la que la plataforma se encuentra visible, señalada con una bandera.

3.2.1.2 Condicionamiento de miedo: test de condicionamiento del miedo a un contexto

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

Para realizar esta prueba se siguió el protocolo descrito por Salehi et al. (2009) y se utilizó el sistema de condicionamiento de miedo de Stoelting (IL, USA) y el programa de seguimiento de vídeo ANY-maze.

El aparato es una urna de metacrilato con un suelo de rejilla metálica, a través de la cual se pueden administrar descargas eléctricas, colocada dentro de una cámara insonorizada con una fuente de sonido en su interior (Figura 3). La prueba constó de tres sesiones: una de entrenamiento, una de test de la asociación tono-descarga y una de test de la asociación contexto-descarga. En la sesión de entrenamiento se dejó que los animales deambulasen libremente por el aparato durante 3 minutos.

A continuación, se realizaron 5 ensayos de asociación entre el tono y descarga en un contexto con unas características visuales específicas (paredes de franjas blancas y negras). En cada uno de estos ensayos se emitió un sonido durante 20 segundos y 18 segundos después se administró la descarga. En la segunda sesión (prueba de la asociación tono-descarga) los animales fueron colocados en el mismo aparato con nuevas características visuales (paredes lisas) durante 3 minutos y se emitieron 3 tonos de las mismas características que el día del entrenamiento pero sin descargas eléctricas. En la última sesión se colocó a los animales en el mismo contexto que durante la sesión de entrenamiento durante 5 minutos sin ningún tono o descargas. Durante las sesiones 2 y 3 se cuantificó el tiempo de inmovilidad de los animales como medida de asociación entre el estímulo incondicionado (descarga) y los condicionados (tono en la sesión 2 y contexto en la sesión 3).



Figura 3: Aparato de condicionamiento del miedo.

3.2.2 Estudios sensorimotores, de actividad locomotora y ansiedad

3.2.2.1 Pruebas sensorimotoras

En primer lugar, se analizó la agudeza visual y la sensibilidad olfatoria de los animales. Además, se valoró la función del cerebelo y el sistema vestibular mediante la respuesta de alcance. La sensibilidad táctil se valoró cuantificando la reacción refleja al roce de los bigotes. Se utilizó la prueba de respuesta de sobresalto para evaluar la respuesta a un estímulo auditivo. Para evaluar posibles alteraciones vestibulares se analizó el reflejo de enderezamiento. También se analizó la fuerza de agarre del animal y el equilibrio en las barras de madera y de aluminio. Por último, se valoró el reflejo prensil y la capacidad de tracción de los ratones en la prueba de la percha (ver Escorihuela et al., 1995).

- a) Respuesta de alcance: en esta prueba se sujetaba suavemente al ratón por la cola y se le acercaba a una superficie lisa. Se valoró que el momento en que el animal extendía las patas delanteras.
- b) Prueba de respuesta de sobresalto: esta prueba consistió en colocar al animal en una jaula limpia y golpear unos elementos metálicos unos centímetros por encima de su

cabeza. Se valoró si el animal saltaba o si aparecía el reflejo de sobresalto (reflejo de Preyer), que consiste en retraer el pabellón auditivo.

- c) Reflejo de enderezamiento: se colocó al animal sobre una superficie a 10 cm de altura. Se coge al animal por la cola y se le realiza un giro de 180 ° dejándole caer sobre una superficie blanda. Se evaluó la capacidad del ratón de enderezarse en el aire y la forma de caer (sobre las cuatro patas, de lado, de espaldas, ...) y si no se daba la vuelta al ser colocado de espaldas sobre una superficie plana (enderezamiento en superficie).
- d) Fuerza de agarre: se utilizó una rejilla de barras situada de manera que presentaba 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 sujetaba con las patas delanteras.
- e) Equilibrio: se utilizaron dos tipos de barra que suponen diferentes grados de dificultad, una de madera (Figura 4A) y otra de aluminio (Figura 4B). Ambas se situaron a 40 cm del suelo. Se realizaron dos ensayos de 20 segundos en cada barra empezando por la de madera. El ratón se depositaba en el centro de la barra con las cuatro patas sobre ella y se valoró su reacción (latencia caída, tiempo en zona central y si llegaba a los extremos de las barras).
- f) Reflejo prensil y capacidad de tracción (Figura 4C): se colocaba al ratón colgado por las patas delanteras en el centro de una percha metálica, a una altura de 32 cm del suelo. Se realizaron 3 ensayos de 5 segundos de duración cada uno. En la prueba de reflejo prensil se evaluó si el ratón se caía o si aguantaba los 5 segundos colgado. En la prueba de capacidad de tracción se evaluó si el ratón sube alguna de las patas a la barra o si es capaz de alcanzar el extremo de la percha.



Figura 4: Prueba de equilibrio sobre barra de madera (A) y de aluminio (B) y prueba de la percha (C).

3.2.2.2 Coordinación motora: Rotarod

Esta prueba se utiliza para evaluar la coordinación motora de los animales. Para ello se utilizó un Rotarod (UGO BASILE, Comerio, Varese, Italia) (Figura 5). El aparato consta de un rodillo de plástico que gira a distintas velocidades. En una única sesión se realizaron 4 ensayos. Los 3 primeros ensayos, de un máximo de 60 segundos, fueron a velocidades constantes.

El último ensayo consistió en un ciclo de aceleración en el que el rodillo iba girando progresivamente a más velocidad y el animal tenía que adaptarse a las crecientes exigencias de la prueba.



Figura 5: Prueba de coordinación motora en el Rotarod

3.2.2.3 Actividad espontánea: actimetría

En esta prueba se evaluó la variación circadiana de la actividad locomotora de los animales durante un ciclo completo luz-oscuridad. Para ello se utilizó un actímetro (Acti-system II, Panlab, Barcelona) que detecta los cambios producidos por el movimiento de los ratones en un campo magnético. Se registraron los movimientos realizados por los animales durante un ciclo continuo de 24 horas (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad).

3.2.2.4 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 6). 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 midió: el número de exploraciones, el tiempo que explora cada agujero y la actividad general en el aparato (distancia recorrida y número de incorporaciones). Para evaluar la atención de los animales se calculó el número de repeticiones de exploraciones de agujeros previamente explorados (índice ABA).

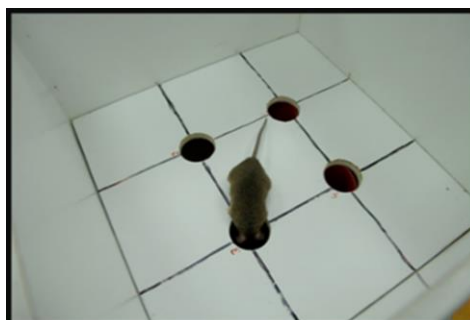


Figura 6: Prueba de la tabla de agujeros. En la imagen se observa un animal realizando una exploración o head-dipping.

3.2.2.5 Ansiedad

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, tiempo en ambas zonas y velocidad del animal durante la prueba) y vertical (incorporaciones o número de veces que el ratón se endereza sobre sus patas traseras). El aparato se iluminó con dos fuentes de luz para someter al animal a una situación estresante. Todos los ensayos fueron grabados en video y posteriormente analizados con un programa de análisis de imagen.



Figura 7: Prueba del campo abierto. En la imagen de la izquierda se observa al animal realizando actividad horizontal en la periferia y en la de la derecha una incorporación (actividad vertical).

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). El laberinto elevado en cruz consiste en dos brazos cerrados y dos brazos abiertos elevados del suelo (Figura 8). En un único ensayo de 5 min, se colocó a los ratones en el centro del aparato y se registró el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, el tiempo en brazos abiertos y cerrados y el número de posturas de estiramiento y de veces que el animal asomaba la cabeza por el lateral de los brazos (head dippings). Las entradas en los brazos abiertos y el tiempo y distancia recorrido en estos brazos están negativamente correlacionados con la ansiedad. El número de posturas de estiramiento y las veces que el animal asoma la cabeza por el lateral de los brazos constituyen una medida de la evaluación de riesgo que realizan los ratones y, por tanto, son un componente cognitivo de la ansiedad (Rodgers y Johnson, 1995). Se grabaron los ensayos en vídeo y se midió la velocidad y la distancia recorrida por cada animal en los brazos abiertos y cerrados mediante un programa de análisis de imágenes.



Figura 8: Prueba del laberinto elevado en cruz. (A) En la imagen se observa al animal realizando un head-dipping, (B) entrando en un brazo abierto y (C) realizando una conducta de aproximación-retirada.

3.3 ESTUDIOS NEUROMORFOLÓGICOS

Para valorar el efecto de distintos tratamientos farmacológicos sobre las alteraciones neuromorfológicas del ratón Ts65Dn se utilizaron distintas técnicas de tinción, inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia.

En primer lugar, se estudió la neurogénesis hipocampal adulta determinando el número de células que proliferaban, se diferenciaban y alcanzaban la etapa adulta.

Ki67 es una proteína nuclear que se expresa en las células proliferativas en todas las fases del ciclo celular activo, por lo que permite identificar la densidad de células en proliferación en la SGZ. La DCX es una proteína asociada a microtúbulos que se expresa en los estadios iniciales de diferenciación, cuando las neuronas comienzan a migrar. Por otro lado, la CLR es una proteína de unión al calcio que se expresa durante un período muy breve en células granulares post-mitóticas antes de alcanzar el fenotipo de neurona madura (Figura 9).

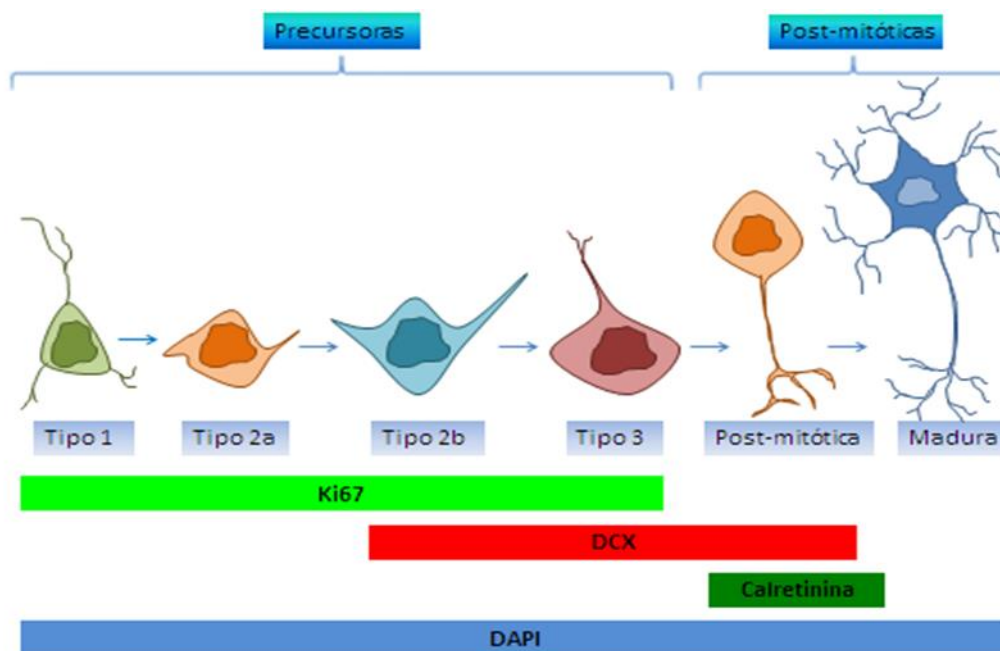


Figura 9: Fases de la neurogénesis en el hipocampo adulto y relación con la expresión de los marcadores utilizados en el estudio. Modificada de (Corrales et al., 2014).

Por tanto, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia de Ki67 para valorar la proliferación celular y de doblecortina (DCX) y calretinina (CLR) para cuantificar el número de neuronas en diferentes estadios de diferenciación. El número de neuronas granulares adultas en el hipocampo de los distintos grupos de ratones se evaluó utilizando la técnica de tinción de DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato). Por último, se utilizó la tinción de Nissl para valorar el área del giro dentado, capa de células granulares y zona subgranular del hipocampo y así poder calcular la densidad de células de cada población (ver más adelante).

Por otro lado, para evaluar los efectos de los distintos fármacos sobre el balance inhibitor-excitador de las aferencias que conectan con las células granulares a nivel de la capa molecular del hipocampo, se realizó una doble inmunofluorescencia y se determinó la densidad de sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas a través del marcaje de las proteínas VGluT1 y VGAT respectivamente. La proteína VGluT (Transportador Vesicular de Glutamato 1), se utiliza como marcador de vesículas de secreción glutamatérgica de naturaleza excitadora. La proteína VGAT (Transportador Vesicular de GABA) se utiliza para valorar la densidad de sinapsis de naturaleza inhibitora.

3.3.1 Preparación de tejidos

Los ratones fueron perfundidos por vía intracardiaca primero con salino (con el fin de eliminar todos los componentes sanguíneos) y luego con paraformaldehído (solución fijadora). Los cerebros se mantuvieron en el mismo fijador durante 24 h y luego se transfirieron a sacarosa para su deshidratación. A continuación, se congelaron en hielo seco y se cortaron secciones coronales de 40 μ m de grosor de un bloque congelado con un microtomo. Por último, se almacenaron las secciones en una solución crioprotectora.

Se seleccionó aleatoriamente una sección de cada serie de 9 de cada cerebro y se sometió a la tinción de Nissl. El resto de las 9 secciones se utilizaron para la inmunohistoquímica de BrdU, la inmunofluorescencia de DCX o CLR, de sinapsis Gabérgicas y glutamatérgicas y la tinción DAPI.

3.3.2 Tinción Nissl y cuantificación de neuronas granulares

Se utilizó una sección de cada serie de 9 para la cuantificación de neuronas granulares. Se seleccionó una serie aleatoriamente y se realizó la tinción de **Nissl**.

Para ello, los cortes de hipocampo se lavaron en PB 0.1N (PB 0.1N: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.65 g/l; K_2HPO_4 14 g/l) y se montaron en portaobjetos polarizados. Tras secarse durante 48 horas, los portaobjetos fueron sumergidos durante 12 minutos en azul de toluidina 0.01 % (Panreac, Barcelona, España), un colorante que se une al RNA contenido en los ribosomas y por tanto tiñe el núcleo, el nucléolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso. A continuación, se realizó un lavado breve en agua destilada y se procedió a la fase deshidratación en la que se sumergieron las muestras durante 2 minutos en cubetas de alcoholes con concentraciones ascendentes (70 °C, 96 °C y dos baños de 100 °C respectivamente). Después se pasaron por dos baños sucesivos con el disolvente orgánico xileno, también durante 2 minutos. Finalizada la exposición, las muestras se cubrieron con la resina sintética DPX (distrene 80, plastificante, xileno, Panreac) y un cubreobjetos y se dejaron secar durante 2 días.

Las células granulares maduras en la capa de células granulares se cuantificaron en secciones teñidas con DAPI.

Para ello se lavaron los cortes de hipocampo en PB 0.1N (PB 0.1N: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.65 g/l; K_2HPO_4) durante 10 minutos. A continuación, se preincubaron con PBTBSA: PB 0.1N con tritón al 1 % para permeabilizar el tejido y se incubaron las secciones con la tinción nuclear DAPI (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 1:100 en PB 0.1N en agitación orbital durante 12 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones de tejido con PB 0.1N. Por último, se montaron los cortes en portaobjetos polarizados, se cubrieron con un cubreobjetos utilizando como resina Gerbatol (Glicerol 0.3 g/ml; Mowiol 0.13 g/ml; Tris-HCl 0.2 M pH 8.5 al 66 %) y se almacenaron a 4 °C y en oscuridad.

La cuantificación de células se realizó utilizando un sistema de disector físico asociado a un microscopio confocal (Llorens-Martín et al., 2006). En cada sección se dibujó la capa de células granulares con un software de análisis de imágenes (NIH ImageJ) incluyendo los filos supra- e infra-piramidales, y se midió la longitud basándose en el lado interno de los filos que están cara al hilus. Se generaron números aleatorios para seleccionar los puntos donde localizar los disectores. En cada punto seleccionado el microscopio confocal se dirigió hacia una posición previamente establecida aleatoriamente dentro de la capa de células granulares. A continuación, en cada punto, se grabó serialmente una serie de imágenes confocales manteniendo las reglas generales del disector físico y de la estereología. Las imágenes confocales fueron analizadas en el ordenador con el programa ImageJ. El software genera el número total de células cuando se completa el bloque disector. Para contar las neuronas granulares maduras en la capa de células granulares el marco del disector consistió en un cuadrado situado aleatoriamente dentro del GCL. El número de células se refirió al volumen de referencia del disector (este parámetro es el volumen de un prisma formado por el área del marco multiplicado por la altura del disector) para obtener el número de células por volumen de unidad (densidad celular).

3.3.3 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Para realizar cada uno de los experimentos de inmunofluorescencia (ki67, DCX, CLR, VGluT y VGAT) se seleccionó aleatoriamente, para cada marcador, una de las nueve series que se habían cortado previamente en cada animal. Los cortes se lavaron con PB 0.1N durante 10 minutos. A continuación, se preincubaron con PBTBSA: PB 0.1N con tritón al 1 % para permeabilizar el tejido y con albúmina de suero bovino (Bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich) al 1 %, para bloquear las uniones inespecíficas. Se incubaron las secciones con ambos anticuerpos primarios (Tabla 1) en PBTBSA durante 1 hora a temperatura ambiente y 72 horas a 4 °C en agitación orbital. En el caso de la doble inmunohistoquímica los tejidos se incubaron con ambos anticuerpos primarios a la vez. A continuación, se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PBTBSA y se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 2) 1:1000 en PBTBSA en agitación orbital durante 1 hora a temperatura ambiente y 24 horas a 4 °C. Después se realizaron 5 lavados de 10 minutos con PB 0.1N.

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados para la inmunofluorescencia.

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Dilución	Origen
Anti-Ki67	Thermo-scientific	1:750	Conejo
Anti-DCX	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	1:250	Cabra
Anti-CLR	Swant (Marly, Suiza)	1:3000	Conejo
Anti-VGAT	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Cabra
Anti-VGluT1	Millipore	1:2500	Cobaya

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunofluorescencia.

Anticuerpo Secundario	Casa Comercial	Origen
Anti-conejo Alexa Fluor® 488	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Burro
Anti-cabra Alexa Fluor® 594	Invitrogen	Burro
Anti-cobaya Alexa Fluor® 488	Invitrogen	Cabra

3.3.4 Cuantificación

Las secciones fueron analizadas y fotografiadas con un microscopio óptico y otro confocal (Leica TCS 4D).

Se cuantificaron las poblaciones de células en proliferación y las de las neuronas inmaduras en la capa de células subgranulares y la población de células maduras en la capa de células granulares del hipocampo. Para ello se obtuvieron imágenes de microscopía confocal. Se cuantificaron las células BrdU positivas en secciones teñidas con DAB utilizando el principio del disector físico. Para determinar tanto el número de células inmaduras (inmunohistoquímica de DCX y CLR) y el número total de neuronas maduras en el giro dentado del hipocampo (DAPI) se utilizó un método estereológico basado en el disector físico con microscopía confocal, ya que se ha revelado como el método más eficiente y fiable para determinar el número de células en una población de células altamente densa (Llorens-Martín et al., 2006). Para obtener el volumen total del giro dentado o del área de la zona subgranular se utilizó un sistema semiautomático en las secciones teñidas con Nissl.

En los estudios de densidad de sinapsis gabérgicas y glutamatérgicas se realizaron las mediciones en imágenes obtenidas en un microscopio confocal. De cada animal se utilizaron cuatro secciones que cubrían toda la extensión del hipocampo y de la corteza y se midió un área aleatoria en la corteza y en el hipocampo de cada animal. El análisis de las imágenes se realizó con el software NIH ImageJ. Los botones con inmunofluorescencia positiva (VGluT1 o VGAT) se midieron mediante la aplicación separada del mismo umbral a todas las fotografías. Las imágenes habían sido convertidas previamente a escala de grises para mejorar el contraste entre la señal y el ruido. Se midieron las áreas dentro de un círculo de referencia con un tamaño estandarizado de 325 μm^2 . El espacio de referencia se localizó en la capa molecular interna del giro dentado del hipocampo, alineado en la capa más externa de neuronas granulares de la capa de neuronas granulares. También se calculó el porcentaje de área de referencia ocupada por botones VGluT1⁺ o VGAT⁺.

4 ANEXOS

ANEXO I

Fármaco	Mecanismo	Sexo, edad, dosis, método y duración de administración	Consecuencias fenotípicas
Estrógenos		Hembras, 11-14 meses de edad, 0.25 mg comprimidos de liberación retardada. Durante 2 meses	Mejoría parcial en el laberinto en T (Granholm et al., 2002)
		Machos, 6 meses de edad, 0.25 mg en comprimidos de liberación retardada de administración subcutánea. Durante 3 meses	No mejora en el laberinto acuático radial (Hunter et al., 2004)
Minociclina	Derivado de tetraciclina neuroprotector antiinflamatorio	Machos, 7 meses de edad, 10 mg/kg diarios de comprimidos de liberación retardada subcutáneos. Durante 3 meses	Mejoría parcial en el laberinto acuático radial. Se evita la pérdida de ChAT en las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Hunter et al., 2004)
Picrotoxina	Antagonista del receptor GABA _A	3-4 meses de edad, 1 mg/kg vía intraperitoneal diariamente. Durante 2 semanas	Mejoría en la prueba de reconocimiento de objetos (Fernandez et al., 2007)
PTZ	Antagonista del receptor GABA _A	Machos, 3-4 meses de edad, 3 mg/kg diariamente por vía oral voluntaria. Durante 2 semanas	Mejoría en la prueba de reconocimiento de objetos, en el laberinto en T. Los beneficios se mantienen dos meses después de parar la administración (Fernandez et al., 2007)
		Machos, 4 meses de edad, 3 mg/kg, diariamente por vía oral voluntaria. Durante 4 semanas	Mejoría en la prueba del laberinto acuático de Morris (Rueda et al., 2008)
		Machos, 2-3 meses y 12-15 meses de edad, 0.3 mg/kg vía intraperitoneal, diariamente. Durante 2 semanas	Mejoría en la prueba del reconocimiento de objetos cuando el fármaco se administra en fase de luz. Los beneficios duran 2 semanas más sin fármacos (Colas et al., 2013)
α51A	Inhibidor selectivo de la subunidad α5 GABA _A	Machos, 3 meses de edad, 5 mg/kg por vía intraperitoneal diariamente durante pruebas de comportamiento de 6 días	Mejoría en la prueba del reconocimiento de objetos y del laberinto acuático de Morris (Braudeau et al., 2011)
RO4938581	Inhibidor selectivo de la subunidad α5 GABA _A	Machos, 3-4 meses de edad, 20 mg/kg diariamente por vía oral voluntaria. Durante 6 semanas	Mejoría en la prueba del laberinto acuático de Morris, en la LTP y neurogénesis (Martínez-Cué, et al., 2013)
Memantina	Antagonista no competitivo del receptor NMDA	Machos, 4-6 meses y 10-14 meses de edad, 5 mg/kg por vía intraperitoneal, diariamente 15 minutos antes del ensayo de comportamiento	Mejoría en la prueba de condicionamiento del miedo (Costa et al., 2008)
		Machos, 9 meses de edad, 30 mg/kg diariamente por vía oral. Durante 9 semanas	Mejoría en el laberinto acuático de Morris (Rueda et al., 2010)
		Machos, 4 meses de edad, 20	Mejora parcial en el laberinto

Fármaco	Mecanismo	Sexo, edad, dosis, método y duración de administración	Consecuencias fenotípicas
		mg/kg diariamente por vía oral. Durante 6 meses	acuático radial y en la prueba de reconocimiento de objetos. Los beneficios se pierden tras 1 semana sin fármaco (Lockrow et al., 2011)
Fluoxetina	Inhibidor de la recaptación de serotonina	Machos, 2-5 meses de edad, 5 mg/kg diariamente por vía intraperitoneal. Durante 2 semanas	Incremento de la neurogénesis (Clark et al., 2006)
		Machos y hembras de 3-7 días de edad, 5 mg/kg; 8-15 días de edad 10 mg/kg diariamente por vía subcutánea	Mejoría en la prueba de condicionamiento de miedo e incremento de la neurogénesis (Bianchi, Ciani, Guidi, et al., 2010)
		Machos y hembras, 5-7 meses de edad, 0.2 mg/mL por vía oral. Durante 6 semanas	No mejora el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris ni aumenta los marcadores de BFCN. Convulsiones y muerte (Heinen et al., 2012)
		Machos y hembras, 2 meses de edad, 10 mg/kg por vía oral. Durante 8 semanas	Mejoría en el laberinto en Y y la LTP (Begenisic et al., 2014)
		Hembras embarazadas. Día embrionario 10-21 y crías macho y hembra hasta el día postnatal 45, 10 mg/kg diariamente por vía subcutánea	Mejoría en la prueba de miedo condicionado y aumento de la neurogénesis (Guidi et al., 2014)
Fisostigmina	Inhibidor de acetilcolinesterasa	Machos, 4 meses, 10 meses, y 16 meses de edad, 0.05 mg/kg en inyección única	Mejoría en el laberinto de cuatro brazos sólo a los 4 meses de edad (Chang y Gold, 2008)
Galantamina	Inhibidor de acetilcolinesterasa	Machos y hembras, 3-6 meses de edad, 3 mg/kg diariamente por vía intraperitoneal. Durante 10 días	Mejoría en el test olfativo (De Souza et al., 2011)
L-DOPS	Profármaco de norepinefrina	Machos, 6 meses de edad, 1 g/kg por vía subcutánea, 5 horas antes del ensayo de conducta. Durante 3 días	Mejoría en la prueba de condicionamiento del miedo (Salehi et al., 2009)
Xamoterol	Agonista parcial del receptor adrenérgico β_1	Machos, 9-12 meses de edad, 3 mg/kg por vía subcutánea diariamente 1 hora antes del ensayo de conducta	Mejoría en el laberinto en T y en las pruebas de condicionamiento de miedo y reconocimiento de objetos (Faizi et al., 2011)
Formoterol	Agonista del receptor adrenérgico β_2	Machos, 5-6 meses de edad, 2 mg/kg diariamente por vía intraperitoneal 4 horas antes del ensayo de conducta	Mejoría parcial en la prueba de condicionamiento de miedo. No mejora la neurogénesis (Dang et al., 2014)
Litio	Inhibe GSK3 β neuroprotección	Hembras, 12 meses de edad, 2.4 g Li/kg en la comida. Durante 1 mes	Incremento de la neurogénesis (Bianchi et al., 2010)
		Machos, 5-6 meses de edad, 2.4 g Li/kg en la comida. Durante 1 mes	Mejoría en las pruebas de condicionamiento de miedo y reconocimiento de objetos e

Fármaco	Mecanismo	Sexo, edad, dosis, método y duración de administración	Consecuencias fenotípicas
			incremento de la neurogénesis. No mejora en el laberinto en T (Contestabile et al., 2013)
Melatonina	Regulador circadiano neuroprotector	Machos, 5 meses de edad, ≈ 0.5 mg diariamente por vía oral. Durante 5 meses	Mejoría en la prueba del laberinto acuático de Morris y en el número de neuronas colinérgicas (Corrales et al., 2013)
		Machos, 6 meses de edad, ≈ 0.5 mg diariamente por vía oral. Durante 5-6 meses	Mejoría en la LTP y la neurogénesis (Corrales et al., 2014)
SAG 1.1	Agonista de Sonic hedgehog	Machos y hembras. Día del nacimiento inyección única de 20 $\mu\text{g/g}$ por vía subcutánea. Análisis a las 16 semanas	Mejoría en el laberinto acuático de Morris y aumento de la LTP. No produce mejoría en el laberinto en Y o en la LTD cerebelosa (Das et al., 2013)
EGCG	Antioxidante Inhibidor quinasa DYRK1A	Rodajas de hipocampo de 10 μM	Mejora la LTP (Xie et al., 2008)
		Machos, 3 meses de edad, 2-3 mg diariamente por vía oral. Durante 30 días	Mejoría en la prueba del laberinto acuático de Morris (De la Torre et al., 2014)
Vitamina E	Antioxidante	Machos, 4 meses de edad, 50 mg/kg diariamente en la comida (0.04 % w/w). Durante 4 meses y 6 meses	Mejoría parcial en el laberinto acuático radial a los 8 meses. Aumento de TRKA en BFCN a los 10 meses (Shichiri et al., 2011)
		Hembras embarazadas-lactantes y descendientes machos (0.1 % w/w) en la comida. Durante 3 meses	Mejoría parcial en la adquisición en el laberinto acuático de Morris (Netzer et al., 2010)
DAPT	Inhibidor de γ secretasa	Hembras, 4 meses de edad, 100 mg/kg por vía subcutánea, dos veces al día durante 2 días antes o durante el ensayo de conducta	Mejoría en la prueba del laberinto acuático de Morris y disminución en los niveles de β -amiloide (Shiryaev et al., 2011)
NAP/SAL	Péptidos neuroprotectores ADNP/ADNF	Machos y hembras, 10 meses de edad, 40 μg por cada sonda oral diariamente. Durante 9 días	Mejoría en la prueba del laberinto acuático de Morris (Incerti et al., 2011)
		Hembras embarazadas desde el día embrionario 8 hasta el 12, 20 μg diariamente por vía intraperitoneal. Descendientes machos y hembras. Durante 8-10 meses	Mejoría parcial en el laberinto acuático de Morris (Chohan et al., 2011)
Péptido 6	Once aminoácidos del factor neurotrófico ciliar	Hembras, 11-15 meses de edad, 50 nmol diariamente por vía implante. Durante 1 mes	Mejoría parcial en el laberinto acuático de Morris (McCann et al., 2006)
Colina	Precursor de la acetilcolina	Hembras embarazadas-lactantes, 5 g/kg en la comida. Descendientes machos. Durante 13-17 meses	Mejoría en el laberinto acuático radial y aumento parcial de la neurogénesis y de la densidad de neuronas colinérgicas (Ash et al., 2014; Cramer et al., 2010)
CGP55845	Antagonista del receptor GABA _B	Machos, 2-3 meses de edad, inyección única 2-3 horas o diariamente durante 3 semanas	Mejoría en la prueba de reconocimiento de objetos pero no en la de condicionamiento de

Fármaco	Mecanismo	Sexo, edad, dosis, método y duración de administración	Consecuencias fenotípicas
			miedo o el laberinto en T (Heller et al., 2004)
Donepezilo	Inhibidor de la acetilcolinesterasa	Machos, 4 meses de edad, 3.3 mg/kg diariamente por vía oral voluntaria. Durante 4 semanas	No mejora en la prueba del laberinto acuático de Morris (Rueda et al., 2008)
Piracetam	Desconocido	Machos, 6 semanas de edad, 75 mg/kg, 150 mg/kg ó 300 mg/kg diariamente por vía intraperitoneal. Durante 8 semanas	No hay mejoría en el laberinto acuático de Morris (Rueda et al., 2008)
SGS-111	Análogo del piracetam	Machos, 4-6 meses de edad, 0.5 mg/kg diariamente por vía subcutánea. Durante 6 semanas. Hembras embarazadas y sus descendientes machos y hembras, 0.5 mg/kg diariamente por vía subcutánea. Desde el nacimiento hasta los meses de edad	No hay mejoría en el laberinto acuático de Morris (Coopera et al., 2012)
Etosuximida	(KCNJ6) Inhibidor de la subunidad $\alpha 1G$ del canal de Ca tipo-T voltaje-dependiente (GIRK2)	Machos, 5 meses de edad, 10 mg/kg por vía intraperitoneal. Durante 10 semanas	No mejoría en el laberinto acuático de Morris ni en la prueba de condicionamiento de miedo (Hanson et al., 2013)
Gabapentina	Inhibidor dependiente de voltaje de la subunidad $\alpha 2/\delta 1$ del canal de Ca^{++}	Machos, 5 meses de edad, 150 mg/kg por vía intraperitoneal. Durante 10 semanas	No mejoría en el laberinto acuático de Morris ni en la prueba de condicionamiento de miedo (Hanson et al., 2013)
RO256981	Antagonista de la subunidad 2B del receptor NMDA	Machos, 3-6 meses de edad, 10 mL/kg por vía intraperitoneal. Durante 2 semanas	No hay mejora en el laberinto en Y incrementa el deterioro en el laberinto Barnes (Paul et al., 2009)

5 BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, A. J., Stoltzner, S., Lai, F., Su, J., & Nixon, R. A. (2000). Morphological and biochemical assessment of DNA damage and apoptosis in Down syndrome and Alzheimer disease, and effect of postmortem tissue archival on TUNEL. *Neurobiol Aging*, 21, 511–524. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924764>
- Arai, Y., Ijuin, T., Takenawa, T., Becker, L. ., & Takashima, S. (2002). Excessive expression of synaptotagmin in brains with Down syndrome. *Brain Dev.*, 24, 67–72. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11891094>
- Ash, J. A., Velazquez, R., Kelley, C. M., Powers, B. E., Ginsberg, S. D., Mufson, E. J., & J., S. B. (2014). Maternal choline supplementation improves spatial mapping and increases basal forebrain cholinergic neuron number and size in aged Ts65Dn mice. *Neurobiol Dis.*, 70, 32–42. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4133151/>
- Aylward, E. H., Habbak, R., Warren, A. C., Pulsifer, M. B., Barta, P. E., Jerram, M., & Pearlson, G. D. (1997). Cerebellar volume in adults with Down syndrome. *Arch Neurol.*, 54, 209–212. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9041863>
- Aylward, E. H., Li, Q., Honeycutt, N. A., Warren, A. C., Pulsifer, M. B., Barta, P. E., ... Pearlson, G. D. (1999). MRI volumes of the hippocampus and amygdala in adults with Down's syndrome with and without dementia. *American Journal of Psychiatry*, 156(4), 564–568. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.4.564>
- Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., & Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J.*, 371, 199–204. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12534346>
- 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. *Neurosci Lett.*, 127, 173–176. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1831889>
- Bartesaghi, R., Guidi, S., & Ciani, E. (2011). Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Reviews in the Neurosciences*, 22(4), 419–455. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.037>
- 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. *Hum Mol Genet.*, 9, 195–202. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607830>
- Becker, L. E., Armstrong, D. L., & Chan, F. (1986). Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol.*, 20, 520–526. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.410200413/full>
- Begenisic, T., Baroncelli, L., Sansevero, G., Milanese, M., Bonifacino, T., Bonanno, G., ... Sale, A. (2014). Fluoxetine in adulthood normalizes GABA release and rescues hippocampal synaptic plasticity and spatial memory in a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis.*, 63, 12–19. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269730>

- Belichenko, N. P., Belichenko, P. V., Kleschevnikov, A. M., Salehi, A., Reeves, R. H., & Mobley, W. C. (2009). The "Down Syndrome Critical Region" Is Sufficient in the Mouse Model to Confer Behavioral, Neurophysiological, and Synaptic Phenotypes Characteristic of Down Syndrome. *J. Neurosci.*, *29*, 5938–5948. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3849469/>
- Belichenko, P. V., Kleschevnikov, A. M., Masliah, E., Wu, C., Takimoto-Kimura, R., Salehi, A., & Mobley, W. C. (2009). Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Comp Neurol.*, *512*, 453–466. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19034952>
- 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. *J Comp Neurol.*, *504*, 329–345. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663443>
- Belichenko, P. V., Masliah, E., Kleschevnikov, A. M., Villar, A. J., Epstein, C. J., Salehi, A., & Mobley, W. C. (2004). Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *J Comp Neurol.*, *480*, 281–298. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15515178>
- Belichenko, P. V., Wright, E. E., Belichenko, N. P., Masliah, E., Li, H. H., Mobley, W. C., & Francke, U. (2009). Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of Rett syndrome: evidence for disruption of neuronal networks. *J Comp Neurol.*, *514*, 240–258. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19296534>
- Best, T., Cramer, N., Chakrabarti, L., Haydar, T., & Galdzicki, Z. (2012). Dysfunctional hippocampal inhibition in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Exp Neurol.*, *233*, 749–757. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178330>
- Best, T. K., Siarey, R. J., & Galdzicki, Z. (2007). Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome, exhibits increased GABAB-induced potassium current. *J Neurophysiol.*, *97*, 892–900. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17093127>
- Bhattacharyya, A., McMillan, E., Chen, S. I., Wallace, K., & Svendsen, C. N. (2009). A Critical Period in Cortical Interneuron Neurogenesis in Down Syndrome Revealed by Human Neural Progenitor Cells. *Dev. Neurosci.*, *31*, 497–510. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2818457/>
- Bianchi, P., Ciani, E., Contestabile, A., Guidi, S., & Bartesaghi, R. (2010). Lithium restores neurogenesis in the subventricular zone of the Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Pathol.*, *20*, 106–118. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19298631>
- Bianchi, P., Ciani, E., Guidi, S., Trazzi, S., Felice, D., Grossi, G., ... Bartesaghi, R. (2010). Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. Bianchi P1, Ciani E, Guidi S, Trazzi S, Felice D, Grossi G, Fernandez M, Giuliani A, Calzà L, Bartesaghi R. *J Neurosci.*, *30*, 8769–8779. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592198>

- Blanchard, J., Bolognin, S., Chohan, M., Rabe, A., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2011). Rescue of synaptic failure and alleviation of learning and memory impairments in a trisomic mouse model of down syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 70, 1070–1079. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082658>
- Blehaut, H., Mircher, C., Ravel, A., Conte, M., de Portzamparc, V., Poret, G., ... Sturtz, F. (2010). Effect of leucovorin (folinic acid) on the developmental quotient of children with Down's syndrome (trisomy 21) and influence of thyroid status. *PLoS One*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084109>
- Boada, R., Hutaff-Lee, C., Schrader, A., Weitzenkamp, D., Benke, T., Goldson, E., & Costa, A. (2012). Antagonism of NMDA receptors as a potential treatment for Down syndrome: a pilot randomized controlled trial. *Translational Psychiatry*, 2. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.66>
- Braudeau, J., Delatour, B., Duchon, A., Pereira, P. L., Dauphinot, L., de Chaumont, F., ... Potier, M. C. (2011). Specific targeting of the GABA-A receptor $\alpha 5$ subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J Psychopharmacol.*, 25, 1030–1042. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21693554>
- Busciglio, J., & Yankner, B. A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature.*, 378, 776–779. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524410>
- Caiati, M., & Cherubini, E. (2013). Fluoxetine impairs GABAergic signaling in hippocampal slices from neonatal rats. *Front Cell Neurosci.*, 7, 63. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23641199>
- Campenot, R. B., & MacInnis, B. L. (2004). Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J Neurobiol.*, 58, 217–229. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704954>
- Capone, G., Goyal, P., Ares, W., & Lannigan, E. (2006). Neurobehavioral disorders in children, adolescents, and young adults with Down syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.*, 142, 158–172. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16838318>
- Capone, G., Kim, P., Jovanovich, S., Payne, L., Freund, L., Welch, K., ... Trush, M. (2002). Evidence for increased mitochondrial superoxide production in Down syndrome. *Life Sci.*, 70, 2885–2895. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12269400>
- 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. *Neuropsychologia*, 35, 71–79. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8981379>
- Chakrabarti, L., Best, T. K., & Cramer et al., N. P. (2010). Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down Syndrome. *Nature Neuroscience*, 13, 927–934. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639873>
- 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. *J Neurosci.*, 27, 11483–11495. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959791>
- Chang, Q., & Gold, P. E. (2008). Age-related changes in memory and in acetylcholine functions in the hippocampus in the Ts65Dn mouse, a model of Down syndrome. *Neurobiol Learn Mem.*, 89, 167–177. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2246382/>
- Chao, M. V., Rajagopal, R., & Lee, F. S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond.)*, 110, 167–173. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16411893>
- Chapman, R. S., & Hesketh, L. J. (2000). Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 6, 84–95. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899801>
- Chen, Y., Dyakin, V. V., Branch, C. A., Ardekani, B., Yang, D., Guilfoyle, D. N., ... Nixon, R. A. (2009). In vivo MRI identifies cholinergic circuitry deficits in a Down syndrome model. *Neurobiol Aging.*, 30, 1453–1465. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180075>
- Cheon, M. S., Fountoulakis, M., Dierssen, M., Ferreres, J. C., & Lubec, G. (2001). Expression profiles of proteins in fetal brain with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.*, 61, 311–319. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11771754>
- Chohan, M. O., Li, B., Blanchard, J., Tung, Y. C., Heaney, A. T., Rabe, A., ... Grundke-Iqbal, I. (2011). Enhancement of dentate gyrus neurogenesis, dendritic and synaptic plasticity and memory by a neurotrophic peptide. *Neurobiol Aging.*, 32, 1420–1434. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19767127>
- Choi, H., Kim, Y., Song, H., Kim, J., Kim, D., & Kang, T. (2010). Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on GABAergic inhibition in the hippocampus of normal and pilocarpine induced epileptic rats. *Brain Res.*, 1357, 131–141. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20707986>
- Clark, S., Schwalbe, J., Stasko, M. R., Yarowsky, P. J., & Costa, A. C. (2006). Fluoxetine rescues deficient neurogenesis in hippocampus of the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *Exp Neurol.*, 200, 256–261. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16624293>
- Colas, D., Chuluun, B., Warriar, D., Blank, M., Wetmore, D. Z., Buckmaster, P., ... Heller, H. C. (2013). Short-term treatment with the GABAA receptor antagonist pentylentetrazole produces a sustained pro-cognitive benefit in a mouse model of Down's syndrome. *Br J Pharmacol.*, 169, 963–973. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489250>
- Collinson, N., Kuenzi, F., Jarolimek, W., Maubach, K., Cothliff, R., Sur, C., ... Rosahl, T. (2002). Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice

- lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci.*, 54, 928–933. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097508>
- Contestabile, A., Ciani, E., & A., C. (2008). The place of choline acetyltransferase activity measurement in the “cholinergic hypothesis” of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.*, 33, 318–327. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940885>
- Contestabile, A., Fila, T., Bartesaghi, R., Contestabile, A., & Ciani, E. (2006). Choline acetyltransferase activity at different ages in brain of Ts65Dn mice, an animal model for Down’s syndrome and related neurodegenerative diseases. *J Neurochem.*, 97, 515–523. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16539660>
- Contestabile, A., Fila, T., Capellini, A., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2009). Widespread impairment of cell proliferation in the neonate Ts65Dn mouse, a model for Down’s syndrome. *Cell Proliferation*, 42, 171–172.
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., ... 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.*, 17, 665–678. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546680>
- Contestabile, A., Greco, B., Ghezzi, D., Tucci, V., Benfenati, F., & Gasparini, L. (2013). Lithium rescues synaptic plasticity and memory in Down syndrome mice. *J Clin Invest.*, 123, 348–361. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202733>
- Cooper, J. D., Salehi, A., Delcroix, J. D., Howe, C. L., Belichenko, P. V., Chua-Couzens, 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 infusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10439–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.181219298>
- Coopera, A., Grigoryanb, G., Guy-Davida, L., Tsooryc, M. M., Chenb, A., & Reuvenya, E. (2012). Trisomy of the G protein-coupled K⁺ channel gene, *Kcnj6*, affects reward mechanisms, cognitive functions, and synaptic plasticity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109, 2642–2647. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/109/7/2642.full>
- Corrales, A., Martínez, P., García, S., Vidal, V., García, E., Flórez, J., ... Rueda, N. (2013). Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *J Pineal Res.*, 54, 346–358. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23350971>
- Corrales, A., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Martínez, P., García, E., ... Rueda, N. (2014). Chronic melatonin treatment rescues electrophysiological and neuromorphological deficits in a mouse model of Down syndrome. *Journal of Pineal Research*, 56(1), 51–61. <https://doi.org/10.1111/jpi.12097>
- Costa, A. C., Scott-McKean, J. J., & Stasko, M. R. (2008). Acute injections of the NMDA receptor

- antagonist memantine rescue performance deficits of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome on a fear conditioning test. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1624–1632. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700645>
- Costa, A., & Grybko, M. (2005). Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *Neurosci Lett*, 382, 317–322. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925111>
- 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. *Behav Genet*, 26, 7–13. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8852727>
- Coyle, J. T., Oster-Granite, M. L., & Gearhart, J. D. (1986). The neurobiologic consequences of Down syndrome. *Brain Res Bull*, 16, 773–787. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2875770>
- Cramer, N. P., Best, T. K., Stoffel, M., Siarey, R. J., & Galdzicki, Z. (2010). GABAB-GIRK2-mediated signaling in Down syndrome. *Adv Pharmacol*, 58, 397–426. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655490>
- Crnic, L. S., & Pennington, B. F. (2000). Down Syndrome: neuropsychology and animal models. *Progresss in Infancy Research*, 1, 69–111.
- Dalton, A. J., & Crapper-McLachlan, D. (1986). Clinical expression of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Psychiatr Clin North Am*, 9, 659–670. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2949202>
- Dang, V., Medina, B., Das, D., Moghadam, S., Martin, K. J., Lin, B., ... Salehi, A. (2014). Formoterol, a long-acting β_2 adrenergic agonist, improves cognitive function and promotes dendritic complexity in a mouse model of Down syndrome. *Biol Psychiatry*, 75, 179–188. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23827853>
- Das, I., Park, J. M., Shin, J. H., Jeon, S. K., Lorenzi, H., Linden, D. J., ... Reeves, R. H. (2013). Hedgehog agonist therapy corrects structural and cognitive deficits in a Down syndrome mouse model. *Sci Transl Med*, 5. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24005160>
- Davis, W. E., & Kelso, J. A. (1982). Analysis of "invariant characteristics" in the motor control of down's syndrome and normal subjects. *Journal of Motor Behavior*, 14, 194–211. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153410>
- 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. *Progresss in Clinical and Biological Research*, 384, 117–133. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8115398>
- de la Torre, R., de Sola, S., Hernandez, G., Farr??, M., Pujol, J., Rodriguez, J., ... Freixas, R. (2016). Safety and efficacy of cognitive training plus epigallocatechin-3-gallate in young adults with Down's syndrome (TESDAD): A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase

- 2 trial. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30034-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30034-5)
- De la Torre, R., De Sola, S., Pons, M., Duchon, A., de Lagran, M. M., Farré, M., ... Dierssen, M. (2014). Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol Nutr Food Res*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24039182>
- De Souza, F., Busquet, N., Blatner, M., Maclean, K. N., & Restrepo, D. (2011). Galantamine improves olfactory learning in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Sci. Rep*, 1, 137. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3216618/>
- Deidda, G., Bozarth, I., & Cancedda, L. (2014). Modulation of GABAergic transmission in development and neurodevelopmental disorders: investigating physiology and pathology to gain therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci.*, 8, 119. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904277>
- Demas, G. E., Nelson, R. J., Krueger, B. K., & Yarowsky, P. J. (1996). Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behavioural Brain Research*, 82, 85–92. Retrieved from <https://www.mysciencework.com/publication/show/d68ec39cb54a3fd9cb1cbfc0a2f24a4a>
- Devinsky, O., Sato, S., Conwit, R. A., & Schapiro, M. B. (1990). Relation of EEG alpha background to cognitive function, brain atrophy, and cerebral metabolism in Down's syndrome. Age-specific changes. *Arch Neurol.*, 47, 58–62. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2136791>
- 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. *Cereb Cortex*, 13(7), 758–764. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12816891>
- Dierssen, M., Vallina, I. F., Baamonde, C., García-Calatayud, S., Lumbreras, M. A., & Flórez, J. (1997). Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res.*, 749, 238–244. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9138724>
- Downes, E. C., Robson, J., Grailly, E., Abdel-All, Z., Xuereb, J., Brayne, C., ... Mukaetova-Ladinska, E. B. (2008). Loss of synaptophysin and synaptosomal-associated protein 25-kDa (SNAP-25) in elderly Down syndrome individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 34, 12–22. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005332>
- 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*, 118(6), 1196–1205. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.6.1196>
- Duchon, A., Raveau, M., Chevalier, C., Nalesso, V., Sharp, A. J., & Herault, Y. (2011). Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling down syndrome. *Mammalian Genome*, 22, 674–684. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224224/>

- Duman, R. S., Nakagawa, S., & Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology*, 25, 836–844. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750177>
- Dykens, E., Hodapp, R., & Evans, D. (1994). Profiles and development of adaptive behavior in children with Down syndrome. *American Journal on Mental Retardation*, 98, 580–587.
- Encinas, J. M., Vaahtokari, A., & Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 8233–8238. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702546>
- Engidawork, E., Balic, N., Juranville, J. F., Fountoulakis, M., Dierssen, M., & Lubec, G. (2001). Unaltered expression of Fas (CD95/APO-1), caspase-3, Bcl-2 and annexins in brains of fetal Down syndrome: evidence against increased apoptosis. *J Neural Transm Suppl.*, 61, 149–162. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11771740>
- Escorihuela, R., Vallina, I. ., Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett.*, 247, 171–174. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8852727>
- Escorihuela, R. M., Fernández-Teruel, A., Vallina, I. F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Dierssen, M., ... Flórez, J. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci Lett.*, 199, 143–146. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8584244>
- Faizi, M., Bader, P. L., Tun, C., Encarnacion, A., Kleschevnikov, A., Belichenko, P., ... Shamloo, M. (2011). Comprehensive behavioral phenotyping of Ts65Dn mouse model of Down syndrome: activation of β 1-adrenergic receptor by xamoterol as a potential cognitive enhancer. *Neurobiol Dis.*, 43, 397–413. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527343>
- Fernandez, F., & Garner, C. C. (2008). Episodic-like memory in Ts65Dn, a mouse model of Down syndrome. *Behav Brain Res.*, 188, 233–237. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950473>
- Fernandez, F., Morishita, W., Zuniga, E., Nguyen, J., Blank, M., Malenka, R. C., & Garner, C. C. (2007). No TitlePharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci.*, 10, 411–413. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17322876>
- Ferrer, I., & Gullotta, F. (1990). Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 79, 680–685. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2141748>
- Fukuda, Y., Berry, T. L., Nelson, M., Hunter, C. L., Fukuhara, K., Imai, H., ... Mutoh, T. (2010). Stimulated neuronal expression of brain-derived neurotrophic factor by Neurotrophin. *Mol Cell Neurosci.*, 45, 226–233. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600926>

- Gandolfi, A., Horoupian, D. S., & De Teresa, R. M. (1981). Pathology of the auditory system in autosomal trisomies with morphometric and quantitative study of the ventral cochlear nucleus. *J Neurol Sci.*, 51, 43–50. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6454763>
- García-Cerro, S., Martínez, P., Vidal, V., Corrales, A., Flórez, J., Vidal, R., ... 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*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106572>
- Gardiner, K. J. (2015). Pharmacological approaches to improving cognitive function in Down syndrome: current status and considerations. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 103–25. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S51476>
- Glenn, M., Gibson, E., Kirby, E., Mellott, T., Blusztajn, J., & Williams, C. (2007). No TitlePrenatal choline availability modulates hippocampal neurogenesis and neurogenic responses to enriching experiences in adult female rats. *Eur J Neurosci.*, 25, 2473–2482. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17445242>
- Godridge, H., Reynolds, G. P., Czudek, C., Calcutt, N. A., & Benton, M. (1987). Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, 50, 775–778. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440994>
- Golden, J. A., & Hyman, B. T. (1994). Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 50, 186–191. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083693>
- Granholm, A. C., Ford, K. A., Hyde, L. A., Bimonte, H. A., Hunter, C. L., Nelson, M., ... Crnic, L. S. (2002). Estrogen restores cognition and cholinergic phenotype in an animal model of Down syndrome. *Physiol Behav.*, 77, 371–385. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419414>
- 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. *Exp Neurol.*, 161, 647–663. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686084>
- Griffin, W. S., Stanley, L. C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L. J., ... Araoz, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86, 7611–7615. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2529544>
- Gropp, A., Kolbus, U., & Giers, D. (1975). Systematic approach to study of trisomy in the house. II. In *Cytogenetics and Cell Genetics*, vol. 14, no. 1 (pp. 42–62).
- Guedj, F., Sébrié, C., Rivals, I., Ledru, A., Paly, E., Bizot, J. C., ... Delabar, J. M. (2009). Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS One.*, 4. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19242551>
- Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtier, i 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 Pathol.*, 18, 180–197. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18093248>
- 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 Pathol.*, 21, 361–373. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21040072>
- Guidi, S., Stagni, F., Bianchi, P., Ciani, E., Giacomini, A., De Franceschi, M., ... Bartesaghi, R. (2014). Prenatal pharmacotherapy rescues brain development in a Down's syndrome mouse model. *Brain.*, 137, 380–401. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24334313>
- Guihard-Costa, A. M., Khung, S., Delbecque, K., Ménez, F., & Delezoide, A. L. (2006). Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21. *Pediatr Res.*, 59, 33–38. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16326987>
- Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., & Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics.*, 57, 407–418. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329007>
- Guimerá, J., Casas, C., Pucharcòs, C., Solans, A., Domènech, A., Planas, A. M., ... Pritchard, M. A. (1996). A human homologue of Drosophila minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet.*, 5, 1305–1310. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8872470>
- Gulesserian, T., Engidawork, E., Yoo, B. C., Cairns, N., & Lubec, G. (2001a). Alteration of caspases and other apoptosis regulatory proteins in Down syndrome. *J Neural Transm Suppl.*, 61, 163–179. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11771741>
- Gulesserian, T., Engidawork, E., Yoo, B. C., Cairns, N., & Lubec, G. (2001b). Comparable apoptotic pathways in frontal cortex and cerebellum in Down syndrome.
- Hämmerle, B., Carnicero, A., Elizalde, C., Ceron, J., Martínez, S., & Tejedor, F. J. (2003). Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur J Neurosci.*, 17, 2277–2286. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814361>
- Hanney, M., Prasher, V., Williams, N., Jones, E. L., Aarsland, D., Corbett, A., ... Ballard, C. (2012). Memantine for dementia in adults older than 40 years with Down's syndrome (MEADOWS): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61676-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61676-0)
- Hanson, J. E., Weber, M., Meilandt, W. J., Wu, T., Luu, T., Deng, L., ... Zhou, Q. (2013). GluN2B antagonism affects interneurons and leads to immediate and persistent changes in synaptic plasticity, oscillations, and behavior. *Neuropsychopharmacology.*, 38, 1221–1233. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340518>

- Heinen, M., Hettich, M. M., Ryan, D. P., Schnell, S., Paesler, K., & Ehninger, D. (2012). Adult-onset fluoxetine treatment does not improve behavioral impairments and may have adverse effects on the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neural Plast.*, (2012:467251). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848851>
- Helguera, P., Pelsman, A., Pigino, G., Wolvetang, E., Head, E., & Busciglio, J. (2005). Ets-2 promotes the activation of a mitochondrial death pathway in Down's syndrome neurons. *J Neurosci.*, 25, 2295–2303.
- Heller, J. H., Spiridigliozzi, G. A., Crissman, B., McKillop, J., Yamamoto, H., & Kishnani, P. (2010). Safety and efficacy of rivastigmine in adolescents with Down syndrome: long-term follow-up. *J Child Adolesc Psychopharmacol.*, 20, 517–520. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21186971>
- Heller, J. H., Spiridigliozzi, G. A., Doraiswamy, P. M., Sullivan, J. A., Crissman, B. G., & Kishnani, P. S. (2004). Donepezil effects on language in children with Down syndrome: results of the first 22-week pilot clinical trial. *Am J Med Genet A.*, 130A, 325–326. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378553>
- Hunter, C. L., Bachman, D., & Granholm, A. C. (2004). Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome. *Ann Neurol.*, 56, 675–688. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15468085>
- Hunter, C. L., Bimonte-Nelson, H. A., Nelson, M., Eckman, C. B., & Granholm, A. C. (2004). Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer's disease in Ts65Dn mice: effects of estrogen. *Neurobiol Aging.*, 25, 873–884. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212841>
- 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. *Behav Brain Res.*, 138, 121–131. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527443>
- Incerti, M., Horowitz, K., Roberson, R., Abebe, D., Toso, L., Caballero, M., & Spong, C. Y. (2012). Prenatal treatment prevents learning deficit in Down syndrome model. *PLoS One.*, (7(11):e50724.). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209818>
- Incerti, M., Toso, L., Vink, J., Roberson, R., Nold, C., Abebe, D., & Spong, C. (2011). Prevention of learning deficit in a Down syndrome model. *Obstet Gynecol.*, 117, 354–361. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252750>
- Insausti, A. M., Megías, M., Crespo, D., & Al., E. (1998). Hippocampal Volume and Neuronal Number in Ts65Dn Mice: A Murine Model of Down Syndrome. *Neurosci Lett.*, 253, 175–178. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/9792239/>
- Jernigan, T. L., Bellugi, U., Sowel, I. E., Doherty, S., & Hesselink, J. R. (1993). Cerebral morphologic distinctions between Williams and Down syndromes. *Arch Neurol.*, 50, 189–191. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8431138>

- Johnson, N., Fahey, C., Chicoine, B., Chong, G., & Gitelman, D. (2003). Effects of donepezil on cognitive functioning in Down syndrome. *Am J Ment Retard.*, 108, 367–72. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561111>
- Jovanovic, S. V., Clements, D., & MacLeod, K. (1998). Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med.*, 25, 1044–1048. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9870557>
- Karrer, J. H., Karrer, R., Bloom, D., Chaney, L., & Davis, R. (1998). Event-related brain potentials during an extended visual recognition memory task depict delayed development of cerebral inhibitory processes among 6-month-old infants with Down syndrome. *Int J Psychophysiol.*, 29, 167–200. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9664227>
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.*, 26, 360–368. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12850432>
- Kentrup, H., Becker, W., Heukelbach, J., Wilmes, A., Schürmann, A., Huppertz, C., ... Joost, H. G. (1996). Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII. *J Biol Chem.*, 271, 3488–3495. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631952>
- Kesslak, J. P., Nagata, S. F., Lott, I., & Nalcioglu, O. (1994). Magnetic resonance imaging analysis of age-related changes in the brains of individuals with Down's syndrome. *Neurology.*, 44, 1039–1045. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8208396>
- Kim, H. ., & Suh, Y. H. (2009). Minocycline and neurodegenerative diseases. *Behav Brain Res.*, 196, 168–179. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18977395>
- Kim, S. H., Yoo, B. C., Broers, J. L., Cairns, N., & Lubec, G. (2000). Neuroendocrine-specific protein C, a marker of neuronal differentiation, is reduced in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.*, 276, 329–334. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006125>
- Kishnani, P. S., Heller, J. H., Spiridigliozzi, G. A., Lott, I., Escobar, L., Richardson, S., ... McRae, T. (2010). Donepezil for treatment of cognitive dysfunction in children with Down syndrome aged 10–17. *Am J Med Genet A.*, 152A, 3028–35. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21108390>
- 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. *J Neurosci.*, 24, 8153–8160. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371516>
- Kurt, M. A., Davies, D. C., Kidd, M., Dierssen, M., & Flórez, J. (2000). Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain Res.*, 858, 191–197. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700614>

- Kurt, M. A., Kafa, M. I., Dierssen, M., & Davies, D. C. (2004). Deficits of neuronal density in CA1 and synaptic density in the dentate gyrus, CA3 and CA1, in a mouse model of Down syndrome. *Brain Res.*, 1022, 101–109. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353219>
- Larsen, K. B., Laursen, H., Graem, N., Samuelsen, G. B., Bogdanovic, N., & Pakkenberg, B. (2008). Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Ann Anat.*, 190, 421–427. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722098>
- Latash, M. L., & Corcos, D. M. (1991). Kinematic and electromyographic characteristics of single-joint movements of individuals with Down syndrome. *American Journal on Mental Retardation*, 96, 189–201. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1834096>
- Lieberman, D. N., & Mody, I. (1994). Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature.*, 369, 235–239. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514273>
- Liu, D. P., Schmidt, C., Billings, T., & Davisson, M. (2003). Quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Biotechniques*, 35, 1170–4. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14682051>
- Llorens-Martín, M., Torres-Alemán, I., & Trejo, J. . (2006). Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus.*, 16, 480–90. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16596582>
- Lockrow, J., Boger, H., Bimonte-Nelson, H., & Granholm, A. C. (2011). Effects of long-term memantine on memory and neuropathology in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res.*, 221, 610–622. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363261>
- Lockrow, J., Boger, H., Gerhardt, G., Aston-Jones, G., Bachman, D., & Granholm, A. (2011). A noradrenergic lesion exacerbates neurodegeneration in a Down syndrome mouse model. *J Alzheimers Dis.*, 23, 471–489. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098982>
- Lockrow, J., Prakasam, A., Huang, P., Bimonte-Nelson, H., Sambamurti, K., & Granholm, A. (2009). Cholinergic degeneration and memory loss delayed by vitamin E in a Down syndrome mouse model. *Exp Neurol.*, 216, 278–289. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135442>
- Lorenzi, H. A., & Reeves, R. H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain Res.*, 1104, 153–159. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16828061>
- Lott, I., Doran, E., Nguyen, V., Tournay, A., Head, E., & Gillen, D. (2011). Down syndrome and dementia: a randomized, controlled trial of antioxidant supplementation. *Am J Med Genet*

- A. . Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739598>
- 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*, 109, 75–86. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955448>
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, 20, 9104–9110. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124987>
- Malykh, A., & Sadaie, M. (2010). Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders. *Drugs*, 70, 287–312. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20166767>
- Mann, D. M., Yates, P. ., Marcyniuk, B., & Ravindra, C. . R. (1985). Pathological evidence for neurotransmitter deficits in Down syndrome of middle age. *Journal of Mental Deficiency Research*, 29, 125–135. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/20744042_Pathological_evidence_for_neurotransmitter_deficits_in_Down_syndrome_of_middle_age
- Marin-Padilla, M. (1976). Pyramidal cell abnormalities in the motor cortex of a child with Down's syndrome. A Golgi study. *J Comp Neurol*, 167, 63–81. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/131810>
- Martínez-Cué, Carmen Martínez, P., Rueda, N., Vidal, R., García, S., Vidal, V., Corrales, A., ... Maria-Clemencia, H. (2013). Reducing GABAA $\alpha 5$ Receptor-Mediated Inhibition Rescues Functional and Neuromorphological Deficits in a Mouse Model of Down Syndrome. *J Neurosci*, 33, 3953–3966. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/33/9/3953>
- Martínez-Cué, C., Rueda, N., García, E., Davisson, M. T., Schmidt, C., & Flórez, J. (2005). Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res*, 163, 174–185. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941601>
- 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 Behav*, 5, 413–422. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16879635>
- Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Lumbreras, M., Paz, J., Davisson, M. T., Schmidt, C., ... 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*, 134(1), 185–200. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00026-8)
- Maya Vetencourt, J., Sale, A., Viegi, A., Baroncelli, L., De Pasquale, R., O'Leary, O., ... Maffei, L. (2008). No TitleThe antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 320, 385–388. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420937>
- McCann, J. C., Hudes, M., & Ames, B. N. (2006). An overview of evidence for a causal

- relationship between dietary availability of choline during development and cognitive function in offspring. *Neurosci Biobehav Rev.*, 30, 696–712. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504295>
- 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.*, 8, 3475–3478. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427310>
- Millan Sanchez, M., Heyn, S. N., Das, D., Moghadam, S., Martin, K. J., & Salehi, A. (2012). Neurobiological elements of cognitive dysfunction in down syndrome: exploring the role of APP. *Biol Psychiatry.*, 71, 403–409. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945306>
- Moon, J., Chen, M., Gandhi, S., Strawderman, M., Levitsky, D., Maclean, K., & Strupp, B. (2010). Perinatal choline supplementation improves cognitive functioning and emotion regulation in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Behav Neurosci.*, 124, 346–361. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20528079>
- Moran, T., Capone, G., Knipp, S., Davisson, M., Reeves, R., & Gearhart, J. (2002). The effects of piracetam on cognitive performance in a mouse model of Down's syndrome. *Physiol Behav.*, 77, 403–409. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419416>
- Mucke, L. (2009). Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*, 461, 895–897. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19829367>
- 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.*, 117, 131–143. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066288>
- Nadel, L. (2003). Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes, Brain and Behavior*, 2, 156–166. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1601-183X.2003.00026.x/full>
- Netzer, W. J., Powell, C., Nong, Y., Blundell, J., Wong, L., Duff, K., ... Greengard, P. (2010). Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. *PLoS One.*, 5(Article ID e10943). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20532168>
- Newpher, T. M., & Ehlers, M. D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends in Cell Biology*, 19, 218–227.
- O'Doherty, A., Ruf, S., Mulligan, C., Hildreth, V., Errington, M. L., Cooke, S., ... Fisher, E. M. (2005). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes. *Science.*, 309, 2033–2037. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179473>
- Olson, L. E., Roper, R. J., Sengstaken, C. L., Peterson, E. A., Aquino, V., Galdzicki, Z., ... Reeves, R. H. (2007). Trisomy for the Down syndrome "critical region" is necessary but not sufficient

- for brain phenotypes of trisomic mice. *Human Molecular Genetics*, 16(7), 774–782. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm022>
- Pasquali, L., Busceti, C., Fulceri, F., Paparelli, A., & Fornai, F. (2010). Intracellular pathways underlying the effects of lithium. *Behav Pharmacol.*, 21, 473–492. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20700048>
- Patra, S., Rizzi, F., Silva, A., Rugina, D., & Bettuzzi, S. (2008). Molecular targets of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG): specificity and interaction with membrane lipid rafts. *J Physiol Pharmacol.*, 59(Suppl 9), 217–235. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261982>
- Paul, C. M., Magda, G., & Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.*, 203, 151–164. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467271>
- Pelsman, A., Hoyo-Vadillo, C., Gudasheva, T. A., Seredenin, S. B., Ostrovskaya, R. U., & Busciglio, J. (2003). GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons. *Int J Dev Neurosci.*, 21, 117–124. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711349>
- 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. *J Neural Transm (Vienna).*, 117, 445–455. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20157742>
- Pine, S. ., Landing, B. H., & Shankle, W. R. (1997). Reduced inferior olivary neuron number in early Down syndrome. *Pediatr Pathol Lab Med.*, 17, 537–545. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9211546>
- Pinter, J. D., Brown, W. E., Eliez, S., Schmitt, J. E., Capone, G. T., & Reiss, A. L. (2001). Amygdala and hippocampal volumes in children with Down syndrome: a high-resolution MRI study. *Neurology.*, 56, 972–974. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294940>
- Pinter, J. D., Eliez, S., Schmitt, J. E., Capone, G. T., & Reiss, A. L. (2001). Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. *Am J Psychiatry.*, 158, 1659–1665. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578999>
- Plane, J., Shen, Y., Pleasure, D., & Deng, W. (2010). Prospects for Minocycline Neuroprotection. *Arch Neurol.*, 67, 1442–1448. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127230/>
- Pollonini, G., Gao, V., Rabe, A., Palmiello, S., Albertini, G., & Alberini, C. M. (2008). Abnormal Expression of Synaptic Proteins and Neurotrophin-3 in the Down Syndrome Mouse Model Ts65Dn. *Neuroscience*, 156, 99–106. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2613315/>
- Prinz, M., Prinz, B., & Schulz, E. (1997). The growth of non-pyramidal neurons in the primary

- motor cortex of man: a Golgi study. *Histol Histopathol.*, 12, 895–900. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302548>
- Raz, N., Torres, I. J., Briggs, S. D., & Al., E. (1995). Selective neuroanatomic abnormalities in Dwn's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology.*, 45, 356–366.
- 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 Sci.*, 60, 1231–237. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096240>
- Rodgers, R. J., & Johnson, N. J. T. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(2), 297–303. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(95\)00138-M](https://doi.org/10.1016/0091-3057(95)00138-M)
- Roper, R. J., Baxter, L. L., Saran, N. G., Klinedinst, D. K., Beachy, P. A., & Reeves, R. H. (2006). Defective cerebellar response to mitogenic Hedgehog signaling in Down syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103, 1452–1456. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432181>
- Roubertoux, P. L., & Carlier, M. (2010). Mouse models of cognitive disabilities in trisomy 21 (Down syndrome). *Am J Med Genet C Semin Med Genet.*, 154, 400–416. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20981769>
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2008). Chronic pentylenetetrazole but not donepezil treatment rescues spatial cognition in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci Lett.*, 433, 22–27. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226451>
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2008). Effects of chronic administration of SGS-111 during adulthood and during the pre- and post-natal periods on the cognitive deficits of Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research*, 188, 355–367. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432807006316>
- Rueda, N., Flórez, J., & Martínez-Cué, C. (2011). The Ts65Dn mouse model of Down syndrome shows reduced expression of the Bcl-X(L) antiapoptotic protein in the hippocampus not accompanied by changes in molecular or cellular markers of cell death. *Int J Dev Neurosci.*, 29, 711–716. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684326>
- 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*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/584071>
- 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. *J Alzheimers Dis.*, 21, 277–290. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421694>
- 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. *J Neurosci.*, 25, 1089–1094. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689544>
- Saleh, i A., Faizi, M., Colas, D., Valletta, J., Laguna, J., Takimoto-Kimura, R., ... Mobley, W. C. (2009). Restoration of norepinephrine-modulated contextual memory in a mouse model of Down syndrome. *Sci Transl Med.*, 1, 7–17. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368182>
- Salehi, A. ., Delcroix, J. D., Belichenko, P. V., Zhan, K., Wu, C., Valletta, J. S., ... Mobley, W. C. (2006). Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron.*, 51, 29–42. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815330>
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., ... Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.*, 301, 805–809. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907793>
- Sawa, A., Oyama, F., Cairns, N. J., Amano, N., & Matsushita, M. (1997). Aberrant expression of bcl-2 gene family in Down's syndrome brains. *Brain Res Mol Brain Res.*, 48, 53–59. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379849>
- Schneider, C., Risser, D., Kirchner, L., Kitzmüller, E., Cairns, N., Prast, H., ... Lubec, G. (1997). Similar deficits of central histaminergic system in patients with Down syndrome and Alzheimer disease. *Neurosci Lett.*, 222, 183–186. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9148245>
- Schulz, E., & Scholz, B. (1992). Neurohistological findings in the parietal cortex of children with chromosome aberrations. *Journal Für Hirnforschung*, 33, 37–62. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/1447516>
- Seidl, R., Fang-Kircher, S., Bidmon, B., Cairns, N., & Lubec, G. (1999). Apoptosis-associated proteins p53 and APO-1/Fas (CD95) in brains of adult patients with Down syndrome. *Neurosci Lett.*, 260, 9–12. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027687>
- Seo, H., & Isacson, O. (2005). Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp Neurol.*, 193, 469–480. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869949>
- Shichiri, M., Yoshida, Y., Ishida, N., & Al, E. (2011). α -Tocopherol Suppresses Lipid Peroxidation and Behavioral and Cognitive Impairments in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *Free Radic Biol Med.*, 50, 1801–1811. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/21447382/>
- Shiryaev, N., Pikman, R., Giladi, E., & Gozes, I. (2011). Protection against tauopathy by the drug candidates NAP (davunetide) and D-SAL: biochemical, cellular and behavioral aspects. *Curr Pharm Des.*, 17, 2603–2612. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21728979>

- Shumway-Cook, A. Woollacott, M. H. (1985). Dynamics of postural control in the child with Down syndrome. *Physical Therapy*, 65, 1315–1322. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3162178>
- Siarey, R., Carlson, E., Epstein, C., Balbo, A., Rapoport, S., & Galdzicki, Z. (1999). Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology*, 38, 1917–1920. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608287>
- Siarey, R. J., Kline-Burgess, A., Cho, M., Balbo, A., Best, T. K., Harashima, C., ... Galdzicki, Z. (2006). Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J Neurochem*, 98, 1266–1277. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895585>
- Siddiqui, A., Lacroix, T., Stasko, M. R., Scott- McKean, J. ., Costa, A. C., & Gardiner, K. J. (2008). Molecular responses of the Ts65Dn and Ts1Cje mouse models of Down syndrome to MK-801. *Genes Brain Behav.*, 7, 810–820. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2677016/>
- Singh, B., Shankar, S., & Srivastava, R. (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol.*, 82, 1807–1821. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827739>
- Singh, M., & Jadhav, H. (2014). Melatonin: functions and ligands. *Drug Discov Today*, 19, 1410–1418. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24792719>
- Sofroniew, M. V., Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*, 24, 1217–1281. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520933>
- Stewart, L. S., Persinger, M. A., Cortez, M. A., & Snead, O. C. (2007). Chronobiometry of behavioral activity in the Ts65Dn model of Down syndrome. *Behavior Genetics*, 37(2), 388–398. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9119-y>
- Stoel-Gammon, C. (2001). Down syndrome phonology: developmental patterns and intervention strategies. *Downs Syndr Res Pract.*, 7, 93–100.
- Sturgeon, X., & Gardiner, K. J. (2011). Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. In *Mammalian Genome*, vol. 22 (pp. 261–227).
- Suetsugu, M., & Mehraein, P. (1980). Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol.*, 50, 207–210. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6447982>
- Takashima, S., Becker, L. E., Armstrong, D. L., & Chan, F. (1981). Abnormal neuronal development in the visual cortex of the human fetus and infant with down's syndrome. A quantitative and qualitative Golgi study. *Brain Res.*, 225, 1–21. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6457667>

- Takashima, S., Ieshima, A., Nakamura, H., & Becker, L. E. (1989). Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain Dev.*, 11, 131–133. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2523670>
- Takashima, S., Iida, K., Mito, T., & Arima, M. (1994). Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res.*, 38, 265–273.
- 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. *Mech Dev.*, 99, 143–148. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11091082>
- Teipel, S. ., 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*, 127, 811–824. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985261>
- Teipel, S. J., & Hampel, H. (2006). Neuroanatomy of Down syndrome in vivo: a model of preclinical Alzheimer's disease. *Behav Genet.*, 36, 405–4015. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16485178>
- Teipel, S. J., Schapiro, M. B., Alexander, G. E., Krasuski, J. S., Horwitz, B., Hoehne, C., ... Hampel, H. (2003). Relation of corpus callosum and hippocampal size to age in nondemented adults with Down's syndrome. *Am J Psychiatry.*, 160, 1870–1878. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514503>
- Tejedor, F., Zhu, X. R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., ... Pongs, O. (1995). minibrain: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in Drosophila. *Neuron.*, 14, 287–301. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7857639>
- Toiber, D., Azkona, G., Ben-Ari, S., Torán, N., Soreq, H., & Dierssen, M. (2010). Engineering DYRK1A overdosage yields Down syndrome-characteristic cortical splicing aberrations. *Neurobiol Dis.*, 40, 348–359. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600907>
- Velazquez, R., Ash, J., Powers, B., Kelley, C., Strawderman, M., Luscher, Z., ... Strupp, B. (2013). Maternal choline supplementation improves spatial learning and adult hippocampal neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis.*, 58, 92–101. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643842>
- Vicari, S. (2006). Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome. *Behavior Genetics*, 36, 355–364. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505965>
- Vicari, S., Bellucci, S., & Carlesimo, G. A. (2000). Implicit and explicit memory: a functional dissociation in persons with Down syndrome. *Neuropsychologia*, 36, 240–251. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678691>

- Vidal, V., García, S., Martínez, P., Corrales, A., Flórez, J., Rueda, N., ... 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*, 220, 158–168. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728103>
- Vink, J., Incerti, M., Toso, L., Roberson, R., Abebe, D., & Spong, C. Y. (2009). Prenatal NAP+SAL prevents developmental delay in a mouse model of Down syndrome through effects on N-methyl-D-aspartic acid and gamma-aminobutyric acid receptors. *Am J Obstet Gynecol*, 200, 521–524. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327737>
- Vuksić, M., Petanjek, Z., Rasin, M. R., & Kostović, I. (2002). Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatr Neurol*, 27, 36–38.
- Wada, A. (2009). Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and neurotrophin cascades. *J Pharmacol Sci*, 110, 14–28. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19423950>
- Wade, A., Farmer, M., Harari, G., Fund, N., Laudon, M., Nir, T., ... Zisapel, N. (2014). Add-on prolonged-release melatonin for cognitive function and sleep in mild to moderate Alzheimer's disease: a 6-month, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Clin Interv Aging*, 9, 947–961. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24971004>
- Weitzdoerfer, R., Dierssen, M., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2001). Fetal life in Down Syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, 61, 59–70. Retrieved from https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-7091-6262-0_5
- Wenk, G. L., McGann, K., Mencarelli, A., Hauss-Wegrzyniak, B., Del Soldato, P., & Fiorucci, S. (2000). Mechanisms to prevent the toxicity of chronic neuroinflammation on forebrain cholinergic neurons. *Eur J Pharmacol*, 402, 77–85. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940360>
- Wetmore, D., & Garner, C. (2010). Emerging pharmacotherapies for neurodevelopmental disorders. *J Dev Behav Pediatr*, 31, 564–581. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814256>
- Whittle, N., Sartori, S. B., Dierssen, M., Lubec, G., & Singewald, N. (2007). Fetal Down syndrome brains exhibit aberrant levels of neurotransmitters critical for normal brain development. *Pediatrics*, 120, 1465–1471.
- 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*, 214, 533–538. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10671607>
- 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. *N Engl J Med*, 311, 11887–1188. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6237262>

- Xie, W., Ramakrishna, N., Wieraszko, A., & Hwang, Y. W. (2008). Promotion of neuronal plasticity by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Neurochem Res.*, 33, 776–783. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943438>
- Yang, E. J., Ahn, Y. S., & Chung, K. C. (2001). Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem.*, 276, 39819–39824. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518709>
- 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. *Neurosci Lett.*, 65, 189–192. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2940479>
- Zhou, Q., & Anderson, D. J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell.*, 109, 61–73. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955447>